

# 蜜蜂幼虫冷冻技术研究

赵占鳌

(黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041)

**摘要:**以西方蜜蜂幼虫为材料,采用玻璃化冷冻方法,研究了蜜蜂幼虫冷冻技术。结果表明:从多种抗冷冻保护液中筛选出的适宜蜜蜂幼虫的冷冻保护液为 15%甘油+0.2 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.2 mol·L<sup>-1</sup>木糖+3%聚乙二醇+15%乙二醇。冷冻剂类为纱布包裹型。冷冻程序:预冷时间为 5 min,距液氮高度 2~7 cm,降温率为 1 cm·min<sup>-1</sup>。解冻液为生理盐水+葡萄糖。此方法冷冻幼虫解冻后成活率为 10%左右。

**关键词:**西方蜜蜂;幼虫;冷冻;玻璃化

**中图分类号:**S89

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2010)08-0106-02

蜜蜂幼虫冷冻是指在实验条件下,将蜜蜂幼虫经过抗冷冻保护液处理,于液氮(-196℃)中冷冻保存,解冻后仍能继续发育的一种技术。该项目研究是在家畜体细胞、早期胚胎已经冷冻成功的基础上,根据蜜蜂幼虫的生物学特性,经一系列技术措施,使冷冻的蜜蜂幼虫解冻,并能继续发育,即孵化、化蛹乃至性成熟。可使蜂王作为两性遗传物质之载体的功能更具完美,是育种工作强有力的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

由黑龙江省农业科学院牡丹江分院蜂学中心提供蜜蜂幼虫(2007~2009年)。

### 1.2 仪器与药品

1.2.1 试验仪器 体视显微镜(OLMPUS,日本)、显微操作仪(ZEISS,德国)、电热恒温板(LABOTECT,英国)、恒温水浴锅(余姚市东方电子仪器厂)、超净工作台(江苏净化仪器制造厂)、高压灭菌器(HIMAYAMA)、电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,日本)、电子恒温水浴锅 DK98-1(天津市泰特斯仪器有限公司)、恒温恒湿培养箱(BINDER,德国)、细胞冻存管(Falcon 或 Orange 公司)、移液枪、离心管、移虫针、

镊子、剪刀、0.75%酒精、液氮罐、试管、铁盘和一次性培养皿,广口保温瓶。

1.2.2 试验药品 二甲亚砜、甘油、丙乙醇、糖类、乙二醇、乙酰胺、生理盐水、25%葡萄糖溶液等。

### 1.3 方法

将 24 h 内蜜蜂幼虫,用玻璃化冷冻法在诸多冷冻保护液中筛选适合蜜蜂幼虫冷冻的保护液配比(见表 1)。

配方 1:10%DMSO+9%PBC;配方 2:15%甘油+3%乙二醇+0.5 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖;配方 3:30%乙二醇+0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖;配方 4:15%甘油+0.2 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.2 mol·L<sup>-1</sup>木糖+3%聚乙二醇+15%乙二醇;配方 5:牛胚胎保护液。

表 1 蜜蜂幼虫冷冻保护液配比

冷冻液成份	冷冻幼虫数/个	解冻幼虫数/个	解冻成活数/个	占总数比例/%
配方 1	30	30	0	0
配方 2	30	30	1	3.0
配方 3	30	30	2	6.7
配方 4	30	30	4	13.3
配方 5	30	30	3	10.0

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜蜂幼虫冷冻保护液筛选

由表 1 可以看出,用 DMSO+PBS 作抗冷冻液保护剂时成活率为 0;用以甘油和乙二醇为主要成份作抗冷冻剂时成活率为 3%;在以甘油+糖类+醇类和牛胚胎抗冷冻液做保护剂时成活率为 13.

收稿日期:2010-06-17

作者简介:赵占鳌(1960-),男,黑龙江省牡丹江市人,农艺师,从事蜜蜂饲养管理与育种工作。E-mail:lvyunling1963@126.com。

3%左右。可以确定以甘油+糖类+醇类和牛胚胎抗冷冻液为适合蜜蜂幼虫冷冻的保护液。

## 2.2 冷冻剂型筛选

经多次反复试验,分别采用滴定颗粒剂型、开放剂型、半开放剂型和试管剂型时,不是丢失幼虫就是幼虫不能和保护液充分接触,成活率低,不能超过5%,均不适合蜜蜂幼虫冷冻。最后选定纱布包裹剂型效果比较理想,成活率可达13.3%左右。

## 2.3 取虫方法、预冷时间、温度及解冻温度

用移虫针和镊子等工具对幼虫都有一定的伤害,最后选用割脾取虫的方法即可。取出的幼虫用纱布包好,再投入抗冷冻保护液1~2 min 放在距液氮2 cm 高的广口瓶中的液氮面上预冷5 min,等温度降到-36℃时,投入液氮中即可。冷冻72 h 后取出放入20℃的水浴锅内解冻,等解冻完全时投入解冻液中。经多次重复试验,质量浓度为9 g·L<sup>-1</sup>的生理盐水+质量分数为0.25%蔗糖溶液是蜜蜂幼虫冷冻的最佳解冻液。几次重复试验解冻液的温度为36℃时解冻的成活率最高,可接近15%。

## 2.4 解冻后成活幼虫的鉴定

解冻后的幼虫经肉眼观察和体视显微镜检测,挑选出虫体完好的幼虫置于蜂王浆上放置于恒温箱内,温度为34.5℃、相对湿度为80%,12 h 后观察虫体,如果虫体没有变色可确定为活虫。将活虫复移到蜂箱内,4 h 后观察幼虫全部被工

蜂清除,接受率为0。

## 3 结论与讨论

经多次重复试验,筛选出适宜蜜蜂幼虫冷冻保护液为15%甘油+0.2 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.2 mol·L<sup>-1</sup>木糖+3%聚乙二醇+15%乙二醇、冷冻方法为玻璃化冷冻法、冷冻剂型选定为纱布包裹剂型效果比较理想,成活率可达13.3%左右、解冻液为质量浓度为9 g·L<sup>-1</sup>的生理盐水+质量分数为0.25%蔗糖溶液。按此操作冷冻蜜蜂幼虫解冻成活率可达10%左右,达到该项目研究的预期目的。

在对冷冻后的幼虫进行蜂箱育王时,还不能被蜂群接受,需进一步研究。恒温箱内孵化的幼虫不能继续存活,可进一步试验用幼稚蜂陪伴或人工定时给浆饲喂来进一步观察。解冻后对幼虫的培养,处于探索阶段还需进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 周冰峰,林世煌,苏静,等. 温度对蜜蜂受精卵和封盖王蛹发育的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2002(4): 511-513.
- [2] Yokota Y, Sato S, Yokoto M, et al. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts[J]. Fertil Steril, 2001, 75(5): 1027-1029.
- [3] 罗晓中,杨志明. 组织工程化组织的低温冷冻保存研究[J]. 中国临床康复, 2004, 17(8): 3327-3329.

# Research on Freezing Technology of Bee Larva

ZHAO Zhan-ao

(Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

**Abstract:** Bee larva freezing technology is based on *Apis mellifera* which makes reference to the embryo freezing technology of large livestock, using vitrification freezing technology. After repeated experiments, the suitable bee larva freezing protective liquid which was selected from a lot of anti-freeze protective liquid was: 15% glycerol + 0.2 mol·L<sup>-1</sup> sucrose + 0.2 mol·L<sup>-1</sup> xylose + 3% polyethyleneglycol + 15% glycol. The type of cryogen was gauze wrapping. Frozen procedure: pre-cooling time was 5 min, the height above the liquid nitrogen surface was 2~7 cm, the decreasing rate was 1 cm·min<sup>-1</sup>. The thawing solution was physiological saline + glucose. The survival rate of the freezing larva was about 10% by using this method.

**Key words:** *Apis mellifera*; larva; freezing; vitrification