



刘楠楠, 张发, 徐凯, 王永胜, 牛庆生. 欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬期抗氧化酶活性及相关基因表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (5): 1051–1059.

欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬期抗氧化酶活性 及相关基因表达分析

刘楠楠, 张发, 徐凯, 王永胜, 牛庆生*

(吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132108)

摘要: 以欧洲黑蜂和新疆黑蜂为研究对象, 比较和分析两个蜂种在越冬条件下抗氧化酶活性和抗氧化能力相关基因表达的变化规律, 探究二者在越冬期的抗氧化酶功能及其基因表达特征。本试验测定了蜂群损失率和饲料消耗量等越冬性能指标以及总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (T-SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶的酶活力值, 并采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *SOD*、*CAT*、*Grx1*、*MsrA* 和 *Vg* 基因等抗氧化酶功能基因的表达情况。结果显示, 欧洲黑蜂和新疆黑蜂的蜂群损失率和饲料消耗率分别为 32.86%、32.91% 和 23.41%、23.91%。在抗氧化酶活性变化规律方面, 两个蜂种的 T-AOC 酶活力呈逐步升高趋势; T-SOD 酶活力呈先下降再升高的趋势, 在越冬中期达到最低值; CAT 酶活力呈先升高再降低又再升高的趋势; 在抗氧化功能相关基因的 mRNA 表达方面, 两个蜂种的 *SOD* 基因和 *CAT* 基因的表达在越冬中期达到最低值; *Grx1* 基因的表达在越冬后期急剧升高, 达到峰值; *MsrA* 基因的表达呈先降低后升高的趋势; *Vg* 基因的表达在越冬的中前期呈逐渐升高趋势。结果表明, 在低温逆境条件下, 两个蜂种体内的抗氧化酶系统可能发挥了重要的防御作用, 存在一定的耐寒适应机制, 其中越冬中期可能是酶活性变化和基因表达的发生显著变化的特殊阶段。本试验的研究为揭示蜜蜂体内抵御低温应答机制研究提供新线索, 也为深入研究蜜蜂耐寒分子机制和抗寒蜂种的选育提供基础数据。

关键词: 欧洲黑蜂; 新疆黑蜂; 越冬; 抗氧化酶活性; 抗氧化酶基因表达

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 05-1051-09

Analysis of antioxidant enzyme activity and gene expression of European Dark Bee (*Apis mellifera mellifera*) and Xinjiang Black Bee during wintering period

LIU Nan-Nan, ZHANG Fa, XU Kai, WANG Yong-Sheng, NIU Qing-Sheng* (Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China)

Abstract: To explore antioxidant enzymes function and gene expression characteristics of European Dark Bee (*Apis mellifera mellifera*) and Xinjiang Black Bee during overwintering period, the indexes of overwintering performances, such as honeybee quantity loss and forage consumption were measured, the activity of antioxidant enzymes T-AOC, T-SOD, CAT and genes expression of *SOD*, *CAT*, *Grx1*, *MsrA* and *Vg* were analyzed. The result showed that the honeybee quantity loss and forage consumption of European

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项 (CARS-44-SYZ4); 吉林省中青年科技创新领军人才及团队项目 (20180519009JH); 吉林省科技创新中心-基地与科技服务平台建设 (20180623003TC); 吉林省科技资源开放共享服务平台与科研条件保障项目 (20191004021TC); 吉林省科研院所引进高层次科技创新人才资助项目

作者简介: 刘楠楠, 女, 1982 年生, 吉林通化人, 在读博士生, 副研究员, 研究方向为蜜蜂种质遗传资源, E-mail: liunannan7@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 牛庆生, 研究员, 研究方向为蜜蜂种质遗传资源, E-mail: 1463199779@qq.com

收稿日期 Received: 2019-09-25; 接受日期 Accepted: 2019-12-11

Dark Bee and Xinjiang Black Bee were 32.86%, 32.91% and 23.41%, 23.91%. In terms of the rule of antioxidant enzyme activity, the activity of T-AOC in these two species of honeybees increased gradually; the activity of T-SOD showed a trend of descending first and then ascending, reached the lowest value in the middle of overwintering period; the activity of CAT showed a trend of ascending first, then descending and then ascending during the overwintering period. In terms of mRNA expression of genes related to antioxidant function, the gene expression of *SOD* and *CAT* of two species reached the lowest value in the middle of overwintering period; The gene expression of *Grx1* increased sharply and reached the peak in the late overwintering period; The gene expression of *MsrA* decreased first and then increased; The gene expression of *Vg* increased gradually in the middle and early stage of overwintering. These results indicated that the antioxidant enzyme system of two species may play an important defense role in the low temperature stress, there is a certain cold tolerance adaptation mechanism, and the middle overwintering period may be a special stage of significant changes in enzyme activity and gene expression. The research provided new clues for the study on the mechanism of resistant to low temperature in honeybees, and provided basic research data for further research on the molecular mechanism of cold tolerance and the selection for breeding of cold-resistant honeybee species.

Key words: European Dark Bee; Xinjiang Black Bee; overwintering; antioxidant enzyme activity; antioxidant enzyme gene expression

欧洲黑蜂 *Apis mellifera mellifera* (European Dark Bee) 是西方蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus 的一个亚种, 原产于阿尔卑斯山以西和以北的欧洲地区, 早期随着欧洲移民和商业往来分布至全世界, 现有的英国蜂、德国蜂、法国棕蜂、俄罗斯中蜂等都属于欧洲黑蜂的地方品种 (席芳贵, 1995)。2007 年, 我国第一次通过官方渠道正式引进欧洲黑蜂, 批准吉林省养蜂科学研究所从俄罗斯基洛夫市引进种蜂王, 现已利用基因库活体保存纯种欧洲黑蜂 70 群 (刘玉玲等, 2018)。

新疆黑蜂 (Xinjiang Black Bee) 是我国境内西方蜜蜂的一个地方品种, 在 20 世纪初由俄国传入中国新疆伊犁和阿勒泰地区, 经过长期混养、自然杂交和人工选育后, 逐渐形成的一个适应新疆当地蜜源和气候条件的蜂蜜高产型蜂种 (薛运波, 2017), 2006 年被农业部列入《国家级畜禽遗传资源保护名录》。目前新疆黑蜂饲养数量急剧减少, 种性退化严重, 物种处于濒危状态 (张海峰, 2018)。

欧洲黑蜂和新疆黑蜂均属于西方蜜蜂的黑色蜂种, 虽然性情凶暴, 极易蜇人, 不易驯养 (葛凤晨, 2017; 刘玉玲等, 2018), 但它们同样拥有优于其他西方蜜蜂品种的优良性状, 具有抗逆性和抗病力强、耐寒性好、生产性能和越冬性能优异、善于利用零星蜜源和大宗蜜源等生物学特性, 尤其是在恶劣的气候和蜜源条件下展现出的强韧

生命力。例如, 欧洲黑蜂与其它品种杂交, 其子代常表现出不寻常的生活力和产蜜能力, 在蜜源较贫乏地区, 其他蜂种常耗尽所有贮蜜, 唯有勤俭的黑蜂, 尚余些存蜜 (席芳贵, 1995); 新疆黑蜂在越冬期漫长, 冬季极端温度达 -40°C 的自然条件下, 仍可在室外安全越冬; 在室内越冬同其他蜂种相比更耐寒和省饲料, 在早春室外气温 8°C 左右, 即可出巢采集 (哈力木拜克, 2009)。因此, 它们是蜜蜂品种家族中重要的种质遗传资源, 极有生产利用价值和育种开发应用潜力。

蜜蜂个体的抗氧化能力与蜂群的寿命、抗病力和抗逆性有着直接联系 (肖培新, 2010), 抗氧化酶的功能是清除机体内过剩的活性氧, 保护机体免受环境胁迫的危害 (Bolter and Chefurka, 1990), 抗氧化酶基因的表达可在一定程度上体现蜜蜂的生存状况、健康程度和寿命 (刘春蕾等, 2017)。昆虫在低温不良环境下, 体内抗氧化酶活力明显升高, 多种酶协同作用调节活性氧变化 (唐维媛等, 2016), 对耐寒的金针瘦蚊越冬幼虫的冷激处理研究表明, 体内的氧化酶活性上升, 对昆虫并未造成氧化损伤 (Marcelo and Tania, 2002); 对越冬期意大利蜜蜂的研究表明, 不同越冬饲料有助于提高越冬蜜蜂中肠的抗氧化能力, 利于蜂群经受冬季低温的制约 (刘春蕾等, 2017)。谷氧还蛋白 (Grx)、甲硫氨酸亚砷还原酶 A (MsrA) 和卵黄原蛋白 (Vg) 是昆虫体内抗氧化

酶家族的重要成员,在蜂群抵抗不良环境因素过程中发挥维持氧化还原平衡、参与受损蛋白修复和保护机体免受氧化损伤的作用(赵红霞等,2010;巩志宏,2011;姚朋波,2014)。蜜蜂中含有已确定的 *Grx1* 和 *Grx2* 两个基因,预测分析它们分别定位在细胞质和线粒体中(巩志宏,2011),参与维持细胞内氧化还原稳态、生长抑制和细胞凋亡等过程(Damdimopoulos *et al.*, 2002; 黄金昌和郭荣富,2010)。*MsrA* 基因是生物体内的抗氧化及蛋白修复因子(Levine *et al.*, 1999),具有间接的抗氧化作用,在对中华蜜蜂 *MsrA* 基因的克隆及其表达分析的研究中推测,它在抵抗高温和紫外线的外界胁迫过程中发挥了重要作用(巩志宏,2011)。*Vg* 基因在蜜蜂的胚胎营养(Rutz and Lüscher, 1974)、行为调控(Engels and Fahrenhorst, 1974)、延长寿命(Amdam *et al.*, 2005; Seehuus *et al.*, 2006)和气候适应(Fluri *et al.*, 1977)等方面发挥重要作用,现有研究已明确 *Vg* 基因可帮助欧洲蜜蜂适应低温环境(Amdam *et al.*, 2005),从而提高蜂群的抗寒能力。越冬期是养蜂生产管理的重要阶段,当年的蜂群越冬效果直接决定了翌年的基础蜂群数量,而蜂群的耐寒性则是安全越冬的关键因素之一。目前,关于欧洲黑蜂和新疆黑蜂在冬季自然寒冷环境下体内抗氧化酶活性及相关基因表达分析的研究还未见报道。

本试验选取越冬时期的欧洲黑蜂和新疆黑蜂进行越冬性能指标的测定和抗氧化酶活性变化及相关功能基因表达的分析,以评价两个蜂种的越冬性能,明确二者在越冬期的抗氧化酶变化规律和相关功能基因的表达情况,探讨蜜蜂机体在受低温环境胁迫时体内存在的抗氧化防御作用机制和变化规律,更好地了解它们对越冬的适应能力,进而为抗寒蜂种的选育研究奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 试验蜂群

试验所用蜜蜂为纯种欧洲黑蜂和新疆黑蜂,由吉林省养蜂科学研究所蜜蜂遗传资源基因保护中心提供。

1.2 试验时间和地点

2017年10月至2018年3月,吉林省养蜂科学研究所蜜蜂遗传资源基因保护中心南山蜂场。

1.3 主要试剂和仪器

总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒和过氧化氢酶(CAT)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;总RNA提取试剂Trizol,购自美国Invitrogen公司。

Ultrospec 7000 紫外可见分光光度计,英国柏楫有限公司;Thermo Scientific Sorvall Stratos 低温高速离心机;7500 FAST 型实时荧光定量仪(ABI);9902 型触摸式PCR仪(ABI);Invitrogen Qubit 3.0 Fluorometer 荧光定量仪(美国Life公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 样品采集

在蜂群越冬前标记2个品种新出房的工蜂,整个越冬期内每月相同日期(当月的21日)进行一次样品采集,置于-80℃超低温冰箱内保存,备用。

1.4.2 越冬蜂群管理

选取欧洲黑蜂(群号分别为E5-1、E5-37、E5-54和E5-147)和新疆黑蜂(群号分别为X5-12、X5-107、X5-116和X5-143)试验蜂群各4群,在越冬前补喂越冬饲料,各品种蜂群以每群5框蜂为标准进行平衡,蜂数多的调出,蜂数少的从本品种内的蜂群中补充,保持群势相当。入室越冬时将两个品种蜂群同时称量蜂群重量,摆放在同一越冬室内越冬。试验蜂群于2018年11月21日入室越冬,次年3月21日出越冬窖。

1.4.3 越冬性能指标测定

1.4.3.1 蜂群损失率

记录越冬开始蜂数(框)、越冬结束蜂数(框),计算越冬期蜂群损失率。

1.4.3.2 饲料消耗率

记录越冬入室蜂群重量(kg)、越冬出室蜂群重量(kg),计算越冬期蜂群饲料消耗率。

1.4.4 抗氧化酶活性测定

以当年的10月和11月为蜜蜂越冬前期,12月和次年1月为蜜蜂越冬中期,次年2月和3月为蜜蜂越冬后期,测定蜜蜂样本的抗氧化酶活力值。严格按照试剂盒说明操作,制备组织匀浆液,计算得出越冬时期每月样品的T-AOC(总抗氧化能力)、T-SOD酶(总超氧化物歧化酶)和CAT

酶（过氧化氢酶）酶活力值。测定时每组样品做3个平行处理，所有待测样本为同一批次。

1.4.5 抗氧化能力相关基因表达量测定

1.4.5.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

将蜜蜂样品经液氮研磨后，按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA，在荧光定量仪上测定 OD₂₆₀ / OD₂₈₀，检测提取的 RNA 样品浓度和纯度，再根据

PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒说明书反转录合成 cDNA 模板，4℃ 保存备用。

1.4.5.2 引物设计

以 β-肌动蛋白（β-actin）为内参基因，目的基因引物设计参考序列来自于 NCBI 数据库，委托上海生工生物科技有限公司完成，基因引物序列如表 1 所示。

表 1 试验所使用的引物
Table 1 Primers used in the experiment

目的基因 Target genes	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度 (bp) Product size	cDNA 参考序列 cDNA reference sequence
超氧化物歧化酶 <i>SOD</i>	F: TCAACTTCAAGGACCACATAGTG R: ATAACACCACAAGCAAGACGAG	135	NM_001178027
过氧化氢酶 <i>CAT</i>	F: TTTTCGGATAGAGGTATTCTGATGG R: TTCCTTGATCGGTCTTGTAATGG	125	NM_001178069
谷氧还蛋白 <i>Grx1</i>	F: TGCTATCGAACTGAATGAAAGG R: TTCACATCTGTTCCACCTCCT	129	XP_003250703
甲硫氨酸亚砷还原酶 A <i>MsrA</i>	F: GCCAGGACAATTGCAAGAAA R: CCACCTGCATATCCAACACA	126	NP_001171518
卵黄原蛋白 <i>Vg</i>	F: GCAGAATACATGGACGGTGT R: GAACAGTCTTCGGAAGCTTG	146	NM_001011578
内参基因 <i>β-actin</i>	F: CCGTGATTTGACTGACTACCT R: AGTTGCCATTTCTGTTC	142	NM_001185145

1.4.5.3 实时荧光定量 PCR 检测

根据 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR，测定蜜蜂越冬期工蜂抗氧化功能相关基因 *SOD*、*CAT*、*Grx1*、*MsrA* 和 *Vg* 基因的 mRNA 相对表达量。反应体系总体积为 20 μL，包含 cDNA 模板 2 μL，SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL，ROX Reference Dye II 0.4 μL，上、下游引物各 0.8 μL，ddH₂O 6 μL。反应条件为：95℃ 预变性 30 s，95℃ 变性 5 s，60℃ 退火及延伸 34 s，45 个循环。每组样本重复测定 3 次。

1.5 数据处理与分析

将获得的实验数据应用 SPSS 19.0 软件统计处理，采用数据分析中的 one-way ANOVA 进行单因素方差分析（ $P < 0.05$ 表示差异显著），随后采用 Tukey's HSD 进行多重检验；荧光定量 PCR 中，根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法进行数据分析；应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 越冬蜂群势测试

在欧洲黑蜂和新疆黑蜂的越冬期间，欧洲黑蜂和新疆黑蜂的蜂群损失率分别为 32.86% 和 32.91%，饲料消耗率分别为 23.41% 和 23.91%（表 2）。由此可见，两个蜂种在越冬性能表现方面大体相当。

2.2 越冬期体内抗氧化酶活性变化

2.2.1 总抗氧化酶（T-AOC）活性

欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬各阶段 T-AOC 酶活力进入越冬期后呈逐步升高趋势，仅在越冬中期（1 月份）有所下降，之后逐步升高，在越冬后期达到最高值，且差异显著（ $P < 0.05$ ）（图 1）。

表 2 欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬蜂群势测试统计表

Table 2 Statistical table of overwintering bee population of European Dark Bee and Xinjiang Black Bee

群号 Group	入室蜂数 (框) Population of entering	出室蜂数 (框) Population of Remaining	蜂群损失率 (%) Bee quantity loss	入室称重 (kg) Weight of entering	出室称重 (kg) Weight of Remaining	饲料消耗率 (%) Forage consumption
E5-1	3.0	2.0	33.33	20.80	16.32	21.54
E5-37	3.0	2.2	26.67	23.30	16.82	27.81
E5-54	3.5	2.4	31.43	24.70	19.60	20.65
E5-147	3.0	1.8	40.00	22.50	17.18	23.64
X5-12	3.5	2.3	34.29	24.92	18.02	27.69
X5-107	3.3	2.5	24.24	24.00	18.24	24.00
X5-116	3.5	2.0	42.86	24.40	18.82	22.87
X5-143	4.3	3.0	30.23	28.20	22.26	21.06

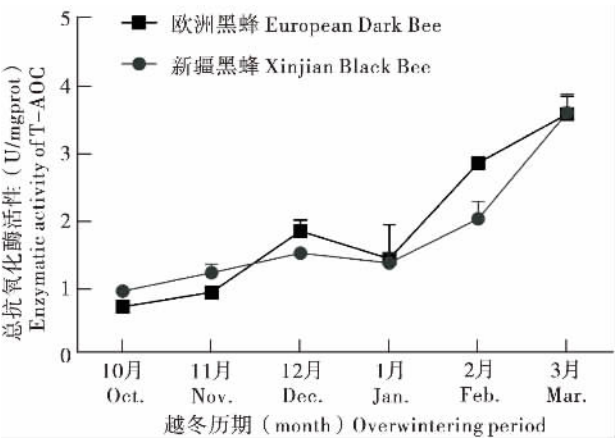


图 1 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂的 T-AOC 酶活性变化

Fig. 1 Changes of T-AOC activity of European Dark Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

2.2.2 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性

欧洲黑蜂和新疆黑蜂进入越冬期后, 两者的 T-SOD 酶活性均呈下降趋势, 在越冬中期 (1 月份) 达最低值, 在越冬后期有所升高, 且差异显著 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2.3 CAT 酶活性

欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬各阶段的 CAT 酶活力呈现先升高再降低又再升高的趋势, 在越冬中期 (1 月份) 达最低值, 且差异显著 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 越冬期体内抗氧化能力相关基因的表达量变化分析

2.3.1 SOD 基因 mRNA 表达量

欧洲黑蜂和新疆黑蜂在越冬各阶段的 SOD 基因 mRNA 相对表达量均在越冬中期 (12 月和 1 月)

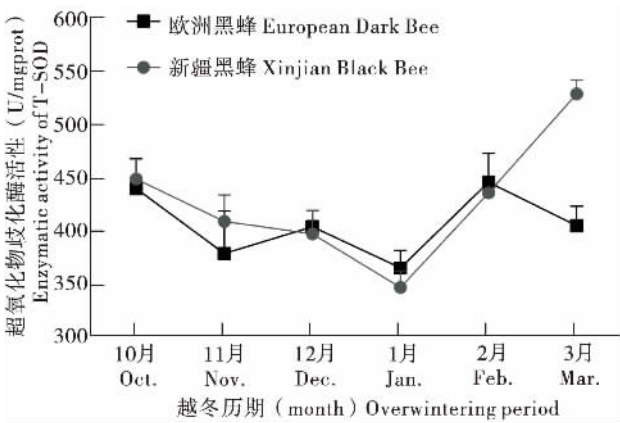


图 2 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂的 T-SOD 酶活性变化

Fig. 2 Changes of T-SOD activity of European Dark Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

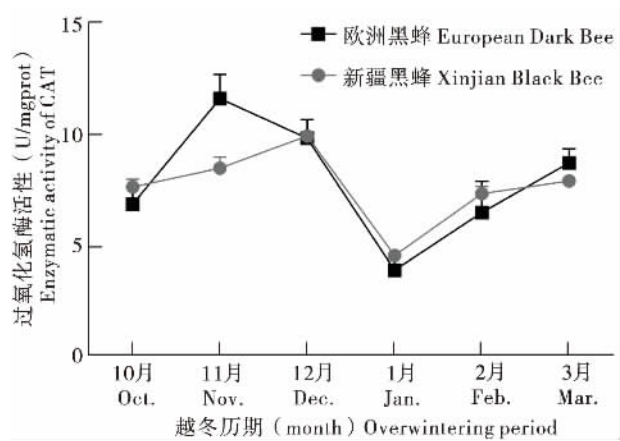


图 3 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂的 CAT 酶活性变化

Fig. 3 Changes of CAT activity of European Dark Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

达到最低值, 与 SOD 酶活性的变化规律大致相同 (图 4)。

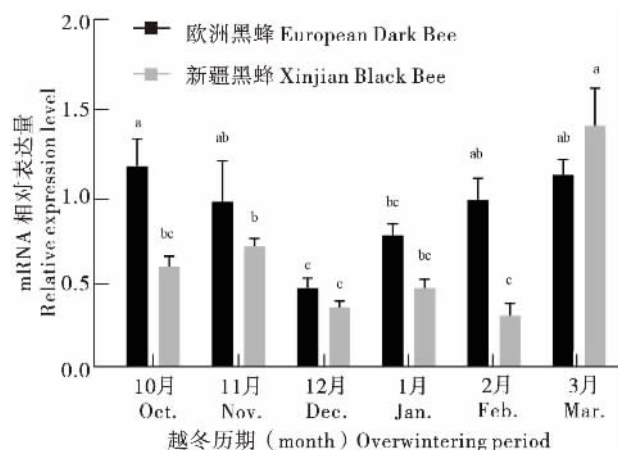


图 4 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂 SOD 基因的表达变化

Fig. 4 Changes of gene SOD expression of European Dark

Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

注: 图中不同字母表示在该基因在不同越冬时期的表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)。下图同。Note: Data with different letters indicated significant difference between different overwintering period at 0.05 level. The same below.

2.3.2 CAT 基因 mRNA 表达量

欧洲黑蜂的 CAT 基因 mRNA 相对表达量呈先降低再升高的趋势, 新疆黑蜂的 CAT 基因表达量亦呈先降低再升高的趋势 (越冬前期基因表达量差异不显著), 且二者均在越冬中期 (12 月和 1 月) 达到最低值, 与 CAT 酶活性的变化规律一致 (图 5)。

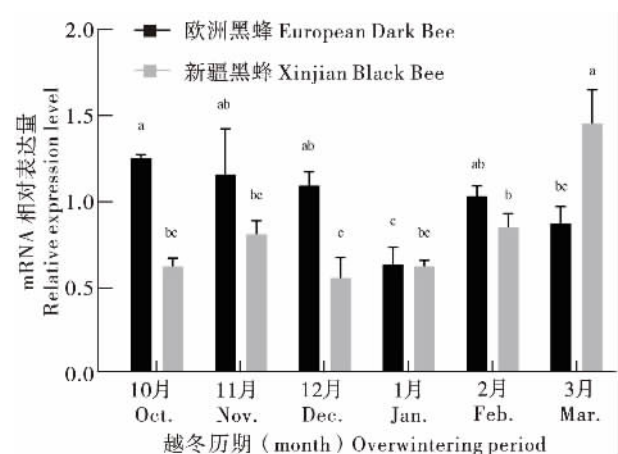


图 5 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂 CAT 基因的表达变化

Fig. 5 Changes of gene CAT expression of European Dark

Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

2.3.3 Grx1 基因 mRNA 表达量

欧洲黑蜂和新疆黑蜂在越冬各阶段的 Grx1 基因 mRNA 相对表达量均在越冬后期 (2 月和 3 月) 急剧升高, 达到峰值, 且差异显著 ($P < 0.05$) (图 6)。

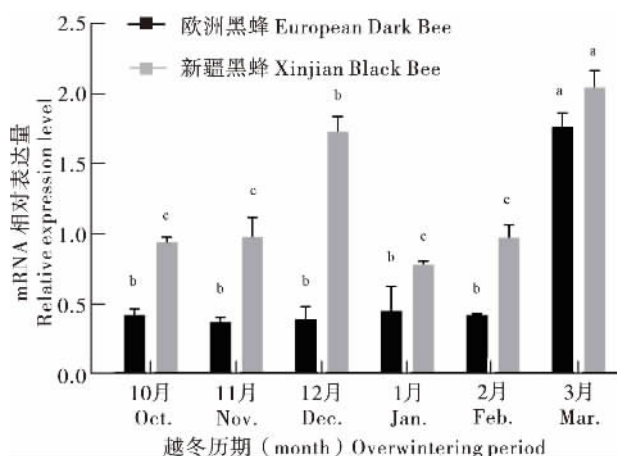


图 6 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂 Grx1 基因的表达变化

Fig. 6 Changes of gene Grx1 expression of European Dark

Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

2.3.4 MsrA 基因 mRNA 表达量

欧洲黑蜂的 MsrA 基因 mRNA 相对表达量呈现先降低再升高的趋势, 在越冬中期 (12 月) 达最低值; 新疆黑蜂的 MsrA 基因表达量呈现相同的表达规律, 也在越冬中期 (1 月) 达到最低值 (图 7)。

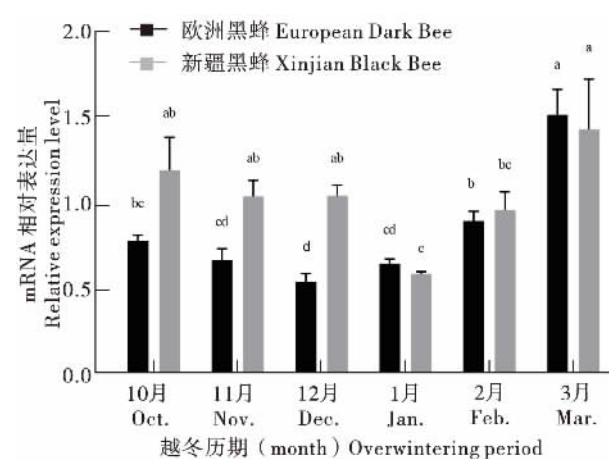


图 7 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂 MsrA 基因的表达变化

Fig. 7 Changes of gene MsrA expression of European Dark

Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

2.3.5 *Vg* 基因 mRNA 表达量

欧洲黑蜂和新疆黑蜂在越冬各阶段的 *Vg* 基因 mRNA 相对表达量在越冬中前期 (10 月、11 月和 12 月) 均呈逐渐升高趋势; 在越冬的中后期 (1 月、2 月和 3 月), 欧洲黑蜂的 *Vg* 基因表达量呈递增趋势, 新疆黑蜂则呈递减趋势, 表明较越冬前期和后期, 越冬中期可能是 *Vg* 基因表达的一个时间节点 (图 8)。

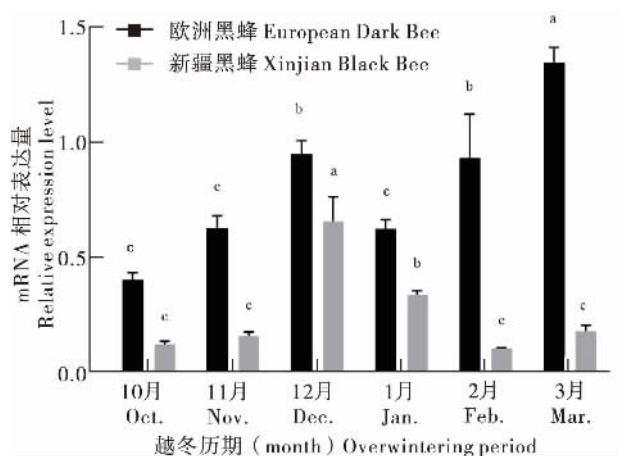


图 8 越冬期欧洲黑蜂和新疆黑蜂 *Vg* 基因的表达变化

Fig. 8 Changes of gene *Vg* expression of European Dark Bee and Xinjiang Black Bee during overwintering period

3 结论与讨论

蜜蜂是农业作物中普遍存在的传粉媒介, 养蜂业亦是农业增产的重要途径 (刘朋飞等, 2011)。蜂群的安全越冬对翌年的养蜂生产至关重要, 在冬季, 蜂群以众多工蜂和蜂王的组合通过聚集成团的方式来抵御严寒, 低温冷害是蜜蜂生存所面临的重要非生物逆境胁迫, 欧洲蜜蜂和新疆黑蜂不仅具有较强耐寒性, 还具有优异的生产性能, 了解它们的越冬期生理及生存策略对于保护和保存这种宝贵的种质资源至关重要。

昆虫体内的抗氧化防御系统作为机体抵御外界逆境条件胁迫的一道防线, 在生物体中占有举足轻重的地位, 一旦其抗氧化防御机制被打破, 自由基的产生就会增多, 从而引起氧化应激损伤 (吴启仙和夏婧, 2014)。总抗氧化能力 (T-AOC) 是反映生物体内抗氧化能力的重要指标, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 则属于昆虫体内存在的保护酶系统 (Fridovich, 1977), 相互协作调控增强机体的抗逆性 (刘楠楠等,

2018)。 *Grx* 基因、*MsrA* 基因和 *Vg* 基因亦是昆虫在不利条件下发挥重要调控作用的抗氧化功能基因 (Ruan *et al.*, 2002; An *et al.*, 2013; 张卫星和胥保华, 2014)。

本研究结果表明, 欧洲黑蜂和新疆黑蜂在蜂群损失率和饲料消耗率的越冬性能表现方面无明显差异, 分别为 32.86%、23.41% 和 32.91%、23.91%; 薛运波等 (2003) 等连续两年对喀尔巴阡蜂、卡尼鄂拉蜂、高加索蜂、美意蜂、澳意蜂和原意蜂的越冬蜂群进行越冬测试, 结果显示黑色蜂种对比黄色蜂种的越冬群势削弱率和越冬饲料消耗相对较少, 认为黑色蜂种的耐寒性能较强, 也进一步验证了本研究的结论, 即黑色蜂种更具有越冬优势。

在抗氧化酶活性表现方面, T-AOC 酶活力总体呈逐步升高趋势, 仅在越冬中期 (1 月份) 有所下降, 越冬后期达峰值; T-SOD 酶活性在越冬中期 (1 月份) 达最低值, 后期又呈升高趋势; CAT 酶活力呈现先升高再降低再升高的趋势, 在越冬中期 (1 月份) 达最低值。在抗氧化酶基因表达方面, 两个蜂种的 *SOD* 基因和 *CAT* 基因的表达模式与酶活性的变化基本一致, 均在越冬中期 (12 月和 1 月) 达到最低值; *Grx1* 基因的表达量在越冬后期急剧升高, 达到峰值; 欧洲黑蜂和新疆黑蜂的 *MsrA* 基因的表达量分别在越冬中期 (12 月和 1 月) 达最低值; 越冬中期可能是两个蜂种 *Vg* 基因的表达的时间节点, 在越冬中前期均呈逐渐升高趋势, 到了越冬中后期, 欧洲黑蜂的 *Vg* 基因表达量呈递增趋势, 新疆黑蜂则呈递减趋势。综合以上实验结果可知, 一方面, 越冬蜜蜂在经受冬季低温制约的不利环境下, 体内的保护酶系统受到了激活, 对机体的氧化应激做出了一定的适应性改变, 形成了响应低温逆境的应答机制。胡双庆等 (2019) 在菲和铬复合胁迫对蛱蛱抗氧化酶活性及其功能基因表达的影响研究中发现, 蛱蛱抗氧化酶活性与其功能基因表达之间总体表现出正相关性, 认为功能基因表达可以作为一种重要的生物标志物。夏振宇等 (2019) 对低温胁迫下越冬中华蜜蜂体内抗氧化指标及耐寒基因表达影响进行研究发现, 耐寒基因 *TPS* 和 *SOD* 表达上调, *CAT* 表达下调, 提示中华蜜蜂对低温胁迫存在耐寒响应的生理机制, 认为中华蜜蜂体内抗氧化酶系统存在一定的平衡机制, 在机体面对外界不良环境时协同发挥作用, 与本研究的结论

一致。另一方面,越冬中期是酶活性变化和基因表达的显著变化时期,在养蜂生产上应特别注意对越冬中期蜂群的管理和保护。在整个越冬历期中,越冬中期较前期和后期的气温最低,是蜜蜂群体经历低温冷伤害最为严重的阶段,这是导致越冬中期多数抗氧化酶活性及其基因表达达到最低值的原因。

此外,同为耐寒性突出表现的优异蜂种,欧洲黑蜂和新疆黑蜂在越冬期间的抗氧化酶活性变化规律和抗氧化功能基因表达模式上表现出总体的一致性。新疆黑蜂在品种形成的过程中有欧洲蜜蜂血统的渗入,在历史上对低温极端环境有良好的适应性,具有相同 mRNA 量表达规律的抗氧化酶基因,可以为揭示蜜蜂体内抵御低温的耐寒机理研究提供新线索,有助于理解它们在东北当地气候、蜜源等生态条件下的产生的环境适应性,进而为揭示蜜蜂耐寒分子机制和抗寒蜂种的选育提供基础的研究数据。

许多生态学和生理学研究已经确定脂质储存和代谢是昆虫在越冬期和低温环境下生存的必要条件 (Toth *et al.*, 2009; Wasielewski *et al.*, 2014; Dusty *et al.*, 2016)。在寒冷的冬季,蜜蜂需要更多的能量来维持巢内温度和自身的基础代谢。大量增加的脂质储存被认为是越冬的必要适应,特别是在膜翅目昆虫的成虫中 (Toth *et al.*, 2009)。因此,未来的研究工作将更多关注欧洲黑蜂和新疆黑蜂在越冬过程中脂质代谢相关通路中基因的表达变化,以期在全基因组水平上对蜂群越冬基因调控的时间性和特异性提供更多见解。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Aase AL, Seehuus SC, *et al.* Social reversal of immunosenescence in honey bee workers [J]. *Exp. Gerontol.*, 2005, 40 (12): 939–947.
- Amdam GV, Norberg K, Omholt SW, *et al.* Higher vitellogenin concentrations in honey bee workers may be an adaption to life in temperate climates [J]. *Insect Sic.*, 2005, 52 (4): 316–319.
- An S, Zhang Y, Wang T, *et al.* Molecular characterization of glutaredoxin 2 from *Ostrinia furnacalis* [J]. *Integr. Zool.*, 2013, 8 (S1): 30–38.
- Bolter CJ, Chefurka W. Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, 278 (1): 65–72.
- Damdimopoulos AE, Miranda – Vizuete A, Pelto – Huikko M, *et al.* Human mitochondrial thioredoxin; involvement in mitochondrial membrane potential and cell death [J]. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (36): 33249–33257.
- Dusty RD, Ali JB, Amy LT, *et al.* Transcription profiling of overwintering gene expression in the small carpenter bee, *Ceratina calcarata* [J]. *Apidologie*, 2016, 47 (4): 572–582.
- Engels W, Fahrenhorst H. Alter – und kastenspezifische veränderungen der haemolymph – protein – spektren bei *Apis mellifera* [J]. *Dev. Genes Evol.*, 1974, 174: 285–296.
- Fluri P, Wille H, Gerig L, *et al.* Juvenile hormone, vitellogenin and hemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1977, 33 (9): 1240–1241.
- Fridovich I. Oxygen is toxic! [J]. *Bioscience*, 1977, 27 (7): 462–466.
- Ge FC. Operation to rescue Xinjiang Black bee [J]. *Apiculture of China*, 2017, 68 (4): 62. [葛凤晨. 抢救新疆黑蜂纪行 [J]. 中国蜂业, 2017, 68 (4): 62]
- Gong ZH. Molecular Cloning, Characterization and Expression of Methionine Sulfoxide Reductase A from *Apis cerana cerana* [D]. Taian: Shandong Agricultural University Master Thesis, 2011. [巩志宏. 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* MsrA 基因的克隆及其表达分析 [D]. 泰安: 山东农业大学硕士论文, 2011]
- Halimbak. Research progress of Xinjiang Black bee in YiLi [J]. *Xinjiang Agriculture Science and Technology*, 2009, 2: 9. [哈力木拜克. 新疆伊犁黑蜂研究进展 [J]. 新疆农业科技, 2009, 2: 9]
- Hu SQ. Antioxidant enzyme activity and gene expression of earthworms following combined exposure to phenanthrene and chromium (VI) [J]. *Environmental Pollution Control*, 2019, 41 (1): 29–33. [胡双庆. 菲和铬 (VI) 复合胁迫对蚯蚓抗氧化酶活性及其功能基因表达的影响 [J]. 环境污染与防治, 2019, 41 (1): 29–33]
- Huang JC, Guo RF. Reaserch advances in biological effects of glutaredoxin and thioredoxin on antioxidative stress of animals [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22 (4): 845–850. [黄金昌, 郭荣富. 谷氧还蛋白和氧硫还蛋白对动物抗氧化应激生物学效应的研究进展 [J]. 动物营养学报, 2010, 22 (4): 845–850]
- Levine RL, Berlett BS, Moskowitz, *et al.* Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage [J]. *Mech. Ageing Dev.*, 1999, 107 (3): 323–332.
- Liu CL, Xu BH, Liu ZG, *et al.* Effect of different overwintering feeds on midgut digestive enzyme activities, tissue development status and antioxidant enzyme gene expression of honeybees [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29 (4): 1183–1190. [刘春蕾, 胥保华, 刘振国, 等. 不同越冬饲料对蜜蜂中肠消化酶活性、组织发育状态以及抗氧化酶基因表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2017, 29 (4): 1183–1190]
- Liu NN, Zhuang ML, Li ZY. Effect of imidacloprid on the activity of protective enzyme system in different developmental stages of *Apis mellifera* [J]. *Apiculture of China*, 2018, 69 (9): 72–74. [刘楠楠, 庄明亮, 李志勇. 吡虫啉对蜜蜂不同发育期保护酶系活性

- 的影响 [J]. 中国蜂业, 2018, 69 (9): 72–74]
- Liu PF, Wu Jie, Li HY, *et al.* Economic values of bee pollination to China's agriculture [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (24): 5117–5123. [刘朋飞, 吴杰, 李海燕, 等. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (24): 5117–5123]
- Liu YL, Zhang F, Zhuang M, *et al.* Preliminary report on production performance and biological characteristics of *Apis mellifera mellifera* [J]. *Journal of Bee*, 2018, 38 (1): 8–9. [刘玉玲, 张发, 庄明亮, 等. 欧洲黑蜂生产性能与生物学特性观察测试初报 [J]. 蜜蜂杂志, 2018, 38 (1): 8–9]
- Marcelo HL, Tania ZS. Animal response to drastic change in oxygen availability and physiological oxidative stress [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2002, 133 (4): 537–556.
- Ruan H, Tang XD, Chen ML, *et al.* High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99 (5): 2748–2753.
- Rutz W, Lüscher M. The occurrence of vitellogenin in workers and queens of *Apis mellifica* and the possibility of its transmission to the queen [J]. *J. Insect Physiol.*, 1974, 20 (5): 897–909.
- Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, *et al.* Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, 103 (4): 962–967.
- Tang WY, Qiang FQ, Xing CC, *et al.* Research progress of adverse environmental stress on antioxidant enzymes in insects [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2016, 44 (1): 75–79. [唐维媛, 强奉群, 邢丛丛, 等. 不利环境对昆虫抗氧化酶影响的研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2016, 44 (1): 75–79]
- Toth AL, Bilof KBJ, Henshaw MT, *et al.* Lipid stores, ovary development, and brain gene expression in *Polistes metricus* females [J]. *Insect. Soc.*, 2009, 56 (1): 77–84.
- Wasielowski O, Szczepankiewicz D, Giejdaz K, *et al.* The potential role of adiponectin – and resistin – like peptides in the regulation of lipid levels in the hemolymph of over – wintering adult females of *Osmia bicornis* [J]. *Apidologie*, 2014, 45 (7): 491–503.
- Wu QX, Xia Q. Effect of heavy metal on antioxidant enzymes in insect [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36 (2): 247–251. [吴启仙, 夏婧. 重金属对昆虫抗氧化酶影响研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2014, 36 (2): 247–251]
- Xi FG. Characteristics of four western bee species [J]. *Apicultural Science and Technology*, 1995, 3: 20. [席芳贵. 四个西方蜜蜂品种的特性 [J]. 养蜂科技, 1995, 3: 20]
- Xia ZY, Qin M, Wang HF, *et al.* Effect of low temperature stress on antioxidant indexes and cold – resistance gene expression of *Apis cerana cerana* during over – wintering period [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 (3): 1250–1258. [夏振宇, 秦明, 王红芳, 等. 低温胁迫对越冬期中华蜜蜂体内抗氧化指标及耐寒基因表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (3): 1250–1258]
- Xiao PX. The Study on the Effect of Pollen Substitutes on the Colony Performance and the Expression of Antioxidant Genes of *Apis mellifera* [D]. Taian: Shandong Agricultural University Master Thesis, 2010. [肖培新. 代用花粉对蜂群群势和生产性能的影响及蜜蜂抗氧化酶基因表达的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2010]
- Xue YB. Protection and development of genetic resources of Xinjiang Black bee [J]. *Apiculture of China*, 2017, 68 (12): 26–31. [薛运波. 新疆黑蜂遗传资源的保护和开发利用 [J]. 中国蜂业, 2017, 68 (12): 26–31]
- Xue YB, Ge FC, Bai JM. Test report on overwintering performance of different honeybees [J]. *Apiculture of China*, 2003, 54 (6): 4–5. [薛运波, 葛凤晨, 柏建民. 不同品种蜜蜂越冬性能测试报告 [J]. 中国蜂业, 2003, 54 (6): 4–5]
- Yao PB. Functional Analysis of Thioredoxin Peroxidase, Thioredoxin and Glutaredoxin Associated Genes in *Apis cerana cerana* [D]. Taian: Shandong Agricultural University Master Thesis, 2014. [姚朋波. 中华蜜蜂 (硫氧还蛋白过氧化物酶、硫氧还蛋白和谷氧还蛋白相关基因功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014]
- Zhang HF. Development and consideration of Xinjiang Black bee [J]. *Journal of Bee*, 2018, 4: 43–44. [张海峰. 新疆黑蜂产业发展与思考 [J]. 蜜蜂杂志, 2018, 4: 43–44]
- Zhang WX, Xu BH. Overview of vitellogenin of honeybee [J]. *Journal of Bee*, 2014, 34 (5): 5–7. [张卫星, 胥保华. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展 [J]. 蜜蜂杂志, 2014, 34 (5): 5–7]
- Zhao HX, Zhang XF, Lin Q, *et al.* Progress of vitellogenin of honeybee research [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, 37 (1): 111–114. [赵红霞, 张学锋, 林琦等. 蜜蜂卵黄原蛋白的研究进展 [J]. 广东农业科学, 2010, 37 (1): 111–114]