

不同蜂花粉对西方蜜蜂蜂王浆主蛋白基因表达及蜂王浆产量、质量和组成的影响

荀利杰 黄新球 李琼艳 杨爽 王艳辉*

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 蒙自 661101)

摘要: 本试验旨在研究不同蜂花粉对西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 蜂王浆主蛋白基因 (*mrjps*) 表达及蜂王浆产量、质量和组成的影响。选取蜂王、群势基本一致的意大利蜜蜂 9 群, 随机分为 3 个组, 每组 3 群蜜蜂: 油菜花粉组, 饲喂油菜花粉; 土连翘花粉组, 饲喂土连翘花粉; 对照组, 不饲喂花粉, 自然采粉 (主要为鬼针草花粉)。试验周期为 2 个月, 试验时间为 2017 年 9 月中旬至 11 月中旬。利用凯氏定氮法和水解法分别检测油菜花粉、土连翘花粉和鬼针草花粉粗蛋白质含量和氨基酸组成与含量; 每组选 3 只 9 日龄工蜂进行 *mrjp1*~*mrjp9* 和 黄体基因 *e3* (*yellow-e3*) 相对表达量的检测; 检测各组蜂王浆产量、质量及水溶性蛋白和氨基酸组成与含量。结果显示: 3 种蜂花粉粗蛋白质含量、总氨基酸含量均为油菜花粉>土连翘花粉>鬼针草花粉, 且组间差异显著 ($P<0.05$), 3 种蜂花粉单一氨基酸 (组氨酸除外) 含量也表现为油菜花粉>土连翘花粉>鬼针草花粉, 且组间差异显著 ($P<0.05$)。在 9 日龄工蜂头部, *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 相对高表达, *mrjp6*、*mrjp8* 和 *mrjp9* 相对低表达, 油菜花粉组、土连翘花粉组和对照组 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的相对表达量之和分别占 *mrjps* 总相对表达量的 99.94%、99.94% 和 98.60%。与对照组相比, 饲喂油菜花粉和土连翘花粉显著提高了 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5*、*mrjp7* 和 *yellow-e3* 的相对表达量 ($P<0.05$), 且油菜花粉组上述基因的相对表达量显著高于土连翘花粉组 ($P<0.05$); 饲喂油菜花粉和土连翘花粉显著降低了 *mrjp6*、*mrjp8*、*mrjp9* 的相对表达量 ($P<0.05$)。油菜花粉组蜂王浆产量最高, 其次为土连翘花粉组, 对照组最低, 各组之间差异显著 ($P<0.05$)。油菜花粉组和土连翘花粉组蜂王浆的质量与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。3 组蜜蜂所产蜂王浆水溶性蛋白和氨基酸组成基本一致。综上所述, 不同粗蛋白质含量的蜂花粉对西方蜜蜂 *mrjps* 基因的表达及蜂王浆产量的影响不同, 对蜂王浆质量和组成的影响不大。3 组蜂群相比, 采食油菜花粉组具有营养功能的 *mrjps* 基因的相对表达量和蜂王浆产量最高。由此可见, 对于西方蜜蜂繁育或蜂王浆生产, 油菜花粉可作为一种优质的营养饲料。

关键词: 蜂王浆; 蜂花粉; 王浆主要蛋白基因; 粗蛋白质; 氨基酸

中图分类号: S894

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)02-0856-14

蜂王浆 (royal jelly) 是由蜂群中哺育蜂咽下腺和上颚腺分泌的供给蜂王终身和 3 日龄以内蜜蜂幼虫食用的乳白色或淡黄色浆状物质^[1-2], 是蜂群

繁育的必要物质, 也是一种重要的蜂产品。蜂王浆组分相当复杂, 随着蜜蜂品种、哺育蜂年龄、季节、花粉植物的不同, 其化学成分也有所不同^[3]。

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项 (CARS-44-SYZ16); 云南省科技厅重点新产品开发计划项目 (2015BB010)

作者简介: 荀利杰 (1984—), 男, 河北邢台人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为蜜蜂分子生物学。E-mail: xunlijiecom@163.com

* 通信作者: 王艳辉, 研究员, E-mail: 1135524682@qq.com

一般来说,蜂王浆的水分含量在 60%~70%、粗蛋白质含量在 12%~15%、糖类含量在 10%~16%、脂类含量在 3%~6%、低分子质量物质(维生素、盐类、游离氨基酸等)含量在 2%~3%^[4]。其中,蛋白质是蜂王浆中的主要成分,约占蜂王浆干物质的 50%^[5]。蜂王浆中约有 150 多种蛋白质^[6],分为水溶性蛋白和水不溶性蛋白,其中水溶性蛋白占蛋白质总量的 46%~89%,是蜂王浆中蛋白质的主要组成,故称为蜂王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs) 家族^[7-8]。MRJPs 家族是一个比较大的蛋白质家族,其成员分子质量均在 49~87 ku,氨基酸序列同源性在 47%~74%^[9]。目前,一共发现了 10 个 MRJPs 家族成员,分别为 MRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4、MRJP5、MRJP6、MRJP7、MRJP8、MRJP9 和 MRJP- ψ 。Drapeau 等^[10]预测 MRJP- ψ 是一个编码不完整多肽的假基因,但并未发现其转录本。目前研究发现 MRJPs 具有多重生物学功能,MRJP1~MRJP9 在蜂王浆的蛋白质中都能被检测到,其中 MRJP1~MRJP5 占到 MRJPs 的 90%,暗示 MRJP1~MRJP5 在蜂王浆中主要发挥营养功能^[9];另外,MRJP1 可以促进蜜蜂幼虫转变为蜂王,MRJP3 可以优化蜂王幼虫的生长,两者在级型分化中起作用^[11];MRJP2 和 MRJP7 与工蜂卵巢发育有关^[12]; *mrjp4* (基因符号用蛋白质符号的小写斜体表示,后文同)在工蜂和蜂王中都有表达,但仅在蜂王幼虫期进行表达^[13],由于该蛋白的必需氨基酸含量较低,研究者认为 MRJP4 在蜜蜂体内除营养功能外还可能发挥着其他功能^[8];MRJP5 富含甲硫氨酸,是富含硫元素的重要蛋白;*mrjp6* 在采集蜂中表达量高于哺育蜂,与神经发育相关^[14];也有研究发现 *mrjp5* 和 *mrjp6* 都是在采集蜂中的表达量高于哺育蜂^[15],进化分析 MRJP5 和 MRJP6 处于同一分支^[10],推测 MRJP5 除了作为主要营养物质外,在西方蜜蜂(*Apis mellifera*)中还发挥其他功能,可能与 MRJP6 的功能相近,与西方蜜蜂神经发育相关;*mrjp8* 和 *mrjp9* 在蜜蜂毒腺中表达,与蜂毒引起的过敏反应有关^[16]。虽然 MRJPs 家族成员间同源性较高,但 MRJPs 家族中各个成员的含量和作用不尽相同,在进化过程中出现了一定的遗传分化和功能分歧,甚至同一成员因在不同组织中表达而所起功能不同^[17]。另外,MRJPs 对其他动物机体具有重要的医疗保健作用,主要表现为高效的抗菌活性、

较强的免疫活性和促进特殊细胞增殖等^[18]。

蜂花粉(bee pollen)是蜜蜂从显花植物花蕊内采集的花粉粒加入花蜜和唾液混合而成了一种不规则扁圆形状物。蜂花粉含有 200 多种营养成分^[19],富含蛋白质、氨基酸、维生素、微量元素、活性酶、酚类和黄酮类化合物、脂类、核酸等,几乎包含自然界全部营养成分^[20]。花粉是蜜蜂生存最重要的蛋白质资源^[21],蜜蜂从花粉中得到蛋白质等生长、发育所需要的各种营养物质^[22]。同时,花粉可以增强蜜蜂抗性,维持蜂群健康^[23]。哺育 1 只蜜蜂从卵的孵化到羽化需氮 3.21 mg,相当于花粉 145 mg^[24]。花粉可以刺激工蜂咽下腺的发育和王浆蛋白的合成,充足的营养食物条件,特别是高蛋白质食物供应是工蜂咽下腺发育和王浆分泌的必要前提^[25]。哺育蜂从花粉中汲取的蛋白质通过咽下腺分泌王浆,为蜂王和幼虫提供生命所需的营养物质^[26]。缺乏花粉会出现蜜蜂幼虫发育不良、成年蜂生长受阻、泌浆能力降低等情况,而蜂王产卵能力也会受到影响而下降^[27]。不同植物花粉对于蜜蜂具有不同营养价值,主要取决于花粉中蜜蜂所需必需氨基酸的含量^[28]。鬼针草为一年生草本植物,在云南分布较广,常年开花,每年 9—11 月份为盛花期,花粉量最多。油菜、土连翘分别为云南大宗、特色蜜粉源植物。本试验通过饲喂西方蜜蜂油菜花粉和土连翘蜂花粉,研究不同蜂花粉粗蛋白质和氨基酸含量对 *mrjps* 表达的影响,分析影响西方蜜蜂王浆产量因素,探索蛋白质营养对蜂王浆合成与分泌的作用,以为养蜂生产提供参考。蜂花粉不只为蜜蜂生命活动提供蛋白质,还为蜜蜂提供脂类、维生素、矿物质等营养元素,蜂花粉对于蜜蜂生命活动具有至关重要的作用,本研究结果还可为补充蜜蜂营养学研究以及蜜蜂人工饲料配制提供一些参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验采用的蜜蜂品种为西方蜜蜂亚种意大利蜜蜂(*A. m. ligustica*),由国家蜂产业体系红河综合试验站西方蜜蜂示范场提供。所用花粉为油菜花粉(产地:云南罗平,2017 年 4 月产)、土连翘花粉(产地:云南泸西,2017 年 6 月产),将花粉自然晾干,密封,-20 ℃ 保存。

1.2 试验设计

本研究在开展后续相关试验前对多种花粉的粗蛋白质含量进行了检测调查,选取了粗蛋白质含量具有一定梯度(粗蛋白质含量相差5%左右为1个梯度)的油菜花粉、土连翘花粉和鬼针草花粉作为饲喂蜂群的蜂花粉。由于本试验的对照组为自然采粉,所以选择外源蜜粉源植物主要为鬼针草的季节开展试验,外界花粉源充足,可以满足对照组蜂群的花粉量需求。选取蜂王(约3个月蜂龄,产卵能力强)、群势(卵、幼虫、蛹及成蜂等基本一致,每群8个巢脾,其中卵约1脾、幼虫约1脾、封盖子脾约2脾、成蜂爬满8个巢脾约有1.6万只)基本一致的意大利蜜蜂9群,把每群中的花粉脾取出,保留1张蜜脾,从其他蜂群调入子脾至群势相当,然后随机分为3组,每组3群蜜蜂:油菜花粉组,饲喂油菜花粉;土连翘花粉组,饲喂土连翘花粉;对照组,不饲喂花粉,自然采粉。饲喂花粉的油菜花粉组和土连翘花粉组安装脱粉器,对照组不安装脱粉器,自然采粉。试验周期为2个月,试验时间为2017年9月中旬至11月中旬。饲喂时,将花粉粉碎,过20目筛,每群称取200g,加入适量糖水(糖:水=1:1)揉成花粉团,以不粘手为宜,搓成条状均匀摆放到巢脾横梁上让蜜蜂采食,每3d饲喂1次,每次饲喂前清理掉上次饲喂剩余花粉。试验期间保证提供每组蜂群充足糖量,定期饲喂糖水(糖:水=1:1),每个蜂群至少有1张蜜脾余量。饲喂30d后标记刚出房工蜂,选取标记后9日龄工蜂,取头部进行 *mrjp1~mrjp9* 和黄体基

因 *e3* (*yellow-e3*) 相对表达量的检测;工蜂取样同期进行蜂王浆生产,检测蜂王浆产量、质量,并对蜂王浆中水溶性蛋白和氨基酸组成与含量进行检测;检测不同蜂花粉粗蛋白质含量及氨基酸组成与含量。

1.3 蜂花粉粗蛋白质含量及氨基酸组成与含量测定

1.3.1 蜂花粉粗蛋白质含量测定

参照 GB 5009.5—2016,取 0.4 g 样品使用全自动凯氏定氮仪(Hanon K9860,济南)检测样品中粗蛋白质含量(氮换算为粗蛋白质的系数为 6.25)。

1.3.2 蜂花粉氨基酸组成与含量测定

参照 GB 5009.124—2016,称取 0.07 g 样品于水解瓶中,加入 6 mol/L 的盐酸 10 mL,通入氮气 2 min 后封口,置 110 °C 水解 24 h。水解完成后定容于 50 mL 容量瓶中,取出 2 mL 用氮吹仪于 60 °C 下吹干,加入 1.5 mL 的样品稀释液,用氨基酸全自动分析仪(Membrapure A300,德国)检测样品氨基酸组成与含量。

1.4 西方蜜蜂 *mrjp1~mrjp9* 和 *yellow-e3* 相对表达量的检测

1.4.1 引物设计

从 NCBI 数据库下载西方蜜蜂 *mrjp1~mrjp9*、*yellow-e3* 和 β -肌动蛋白(β -actin,内参基因)的基因序列。利用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物(表 1),引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>mrjp1</i>	F:GGCGAATACGACTACAAGAA R:GACCACCATCACCGACC	NM_001011579.1
<i>mrjp2</i>	F:ACAGGAAAGGGAGGGCT R:TGGAAGGAATCATCGGC	NM_001011580.1
<i>mrjp3</i>	F:TCAACCTATGTGCTCTCCAA R:GCCTTTTTCGTCTGCTATG	NM_001011601.1
<i>mrjp4</i>	F:TTAGTCCCCTGACGCATA R:CATTTCCCTTGATTTTCCGA	NM_001011610.1
<i>mrjp5</i>	F:GCCCTCTTCTTCTCGC R:GTGGTTGATGCTCGTTCC	NM_001011599.1
<i>mrjp6</i>	F:AGCCCTCTCACTTCTCACA R:ACATTACTTTAGCAGACGATTG	NM_001011622.1

续表 1

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>mrjp7</i>	F: AATGACGGTTGAAGGTGAA R: ATTTTATGAATGGTTTTGTGTTA	NM_001014429.1
<i>mrjp8</i>	F: AGATGGTTGCTGCTGATGT R: GCTTGTCTCTTTTCGCTACTA	NM_001011564.2
<i>mrjp9</i>	F: CCCAGATACACCAAATACACTA R: TCCAAAGAAGAGAGCACCA	NM_001024697.1
<i>yellow-e3</i>	F: ATCTTCGCAGTCTGTCCG R: AAAAATGCTCGCTGTTCC	NM_001098228.1
β -actin	F: ACTCCTGCTATGTATGTCGC R: GTAGTCAGTCAAATCACGGC	NM_001185145.1

β -actin: β -肌动蛋白; *mrjp*: 王浆主蛋白基因 major royal jelly protein gene; *yellow-e3*: 黄体基因 e3。

1.4.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

每组分别取 3 只蜜蜂头部放入研钵,加入液氮充分研磨,依照试剂说明书利用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取每组蜜蜂总 RNA。利用超微量分光光度计 (Implen N50, 德国) 测定 RNA 的浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。采用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa, 日本),以 0.5 μ g 总 RNA 为模板反转合成 cDNA。

1.4.3 目的基因相对表达量测定

以 β -actin 基因为内参基因检测 *mrjp1* ~ *mrjp9* 和 *yellow-e3* 的相对表达量。定量 PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L, Rox 0.4 μ L (TaKaRa, 日本), RNase-free 水 4.4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.6 μ L, cDNA 模板 2 μ L。定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 60 s, 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *mrjp1* ~ *mrjp9* 和 *yellow-e3* 的相对表达量。

1.5 蜂王浆产量、质量、水溶性蛋白及氨基酸组成与含量

1.5.1 蜂王浆产量检测

移取孵化后约 24 h 工蜂幼虫至人工王台,每群 72 个王台,移虫 72 h 后钳虫取浆,用电子天平称量每群所取蜂王浆重量,每组 3 群所产王浆量求和,再计算每组蜂群蜂王浆产量平均值。

1.5.2 蜂王浆质量检测

参照蜂王浆国家标准 (GB 9697—2008) 中的检测方法分别检测蜂王浆的水分、10-羟基-2-癸烯酸 (10-HDA) 和粗蛋白质含量及酸度。

1.5.3 蜂王浆中水溶性蛋白及氨基酸组成与含量检测

称取 3 种蜂王浆各 1 g 分别至 15 mL 离心管,加入 8 mL 0.5 mol/L pH 8.0 的 NaCl 溶液,混匀,4 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇床抽提 8 h 后,4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 30 min,取上清即为 MRJPs 溶液。将 MRJPs 溶液稀释 50 倍,按 TaKaRa BCA Protein Assay Kit 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书进行蛋白质浓度测定,每样取 10 μ L 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),检测水溶性蛋白组成与含量;参照 1.3.2 中方法检测蜂王浆的氨基酸组成与含量。

1.6 数据处理与分析

本试验所有检测指标每组均是 3 个重复数据,结果用平均值 \pm 标准差表示。试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析,差异显著性分析采用 one-way ANOVA 程序进行,组间多重比较采用 LSD 法进行, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 3 种蜂花粉粗蛋白质和总氨基酸含量

由表 2 可知,3 种蜂花粉的粗蛋白质和总氨基酸含量均表现为油菜花粉 > 土连翘花粉 > 鬼针草花粉,且各蜂花粉间差异显著 ($P < 0.05$)。

表2 3种蜂花粉粗蛋白质和总氨基酸含量

Table 2 Crude protein and total amino acid contents of three kinds of bee pollens

%

项目 Items	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
粗蛋白质 Crude protein	27.21±0.42 ^a	20.54±0.95 ^b	15.29±0.58 ^c
总氨基酸 Total amino acids	19.53±0.61 ^a	15.09±1.07 ^b	9.98±0.45 ^c

同行数据肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

In the same row, values with the same small letter or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2 3种蜂花粉氨基酸组成与含量

参照 GB 5009.124—2016 对油菜花粉、土连翘花粉和鬼针草花粉的氨基酸组成与含量进行测定,发现3种蜂花粉均由20种氨基酸组成。由于本研究采用水解法测定氨基酸含量,其中天冬酰胺水解变成了天冬氨酸、谷氨酰胺水解变成了谷氨酸、色氨酸完全水解,因此共测出了17种氨基

酸的含量(表3)。3种蜂花粉中17种氨基酸的单一含量除组氨酸外全部为油菜花粉>土连翘花粉>鬼针草花粉,除脯氨酸在土连翘和鬼针草花粉中的含量差异不显著 ($P>0.05$) 外,其他氨基酸含量各蜂花粉间差异显著 ($P<0.05$)。3种蜂花粉中组氨酸含量为鬼针草花粉>油菜花粉>土连翘花粉,各蜂花粉间差异显著 ($P<0.05$)。

表3 3种蜂花粉氨基酸组成及含量

Table 3 Amino acid composition and contents of three kinds of bee pollens

mg/g

氨基酸 Amino acids	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
丙氨酸 Ala	10.25±0.15 ^a	8.29±0.51 ^b	5.43±0.29 ^c
半胱氨酸 Cys	0.85±0.19 ^a	0.60±0.03 ^b	0.57±0.07 ^c
天冬氨酸 Asp	19.14±0.64 ^a	15.76±1.28 ^b	10.15±0.39 ^c
谷氨酸 Glu	24.02±0.83 ^a	20.00±1.73 ^b	9.93±0.57 ^c
苯丙氨酸 Phe	10.31±0.37 ^a	7.86±0.54 ^b	6.25±0.37 ^c
亮氨酸 Leu	16.80±0.63 ^a	14.00±0.95 ^b	9.17±0.42 ^c
甘氨酸 Gly	9.94±0.19 ^a	7.51±0.42 ^b	5.24±0.17 ^c
组氨酸 His	6.21±0.28 ^b	5.14±0.25 ^c	7.14±0.34 ^a
异亮氨酸 Ile	10.49±0.36 ^a	8.13±0.56 ^b	5.45±0.26 ^c
赖氨酸 Lys	20.40±0.74 ^a	11.76±0.64 ^b	8.09±0.25 ^c
甲硫氨酸 Met	3.15±0.68 ^a	2.93±0.15 ^b	1.99±0.18 ^c
脯氨酸 Pro	11.68±0.59 ^a	6.76±0.49 ^b	6.01±0.18 ^b
精氨酸 Arg	12.53±0.48 ^a	11.01±0.77 ^b	4.92±0.32 ^c
丝氨酸 Ser	11.51±0.41 ^a	8.23±0.95 ^b	4.97±0.24 ^c
苏氨酸 Thr	10.79±0.41 ^a	7.55±0.66 ^b	5.14±0.20 ^c
缬氨酸 Val	9.78±0.36 ^a	8.62±0.55 ^b	5.36±0.24 ^c
酪氨酸 Tyr	7.50±0.34 ^a	6.75±0.48 ^b	4.04±0.13 ^c

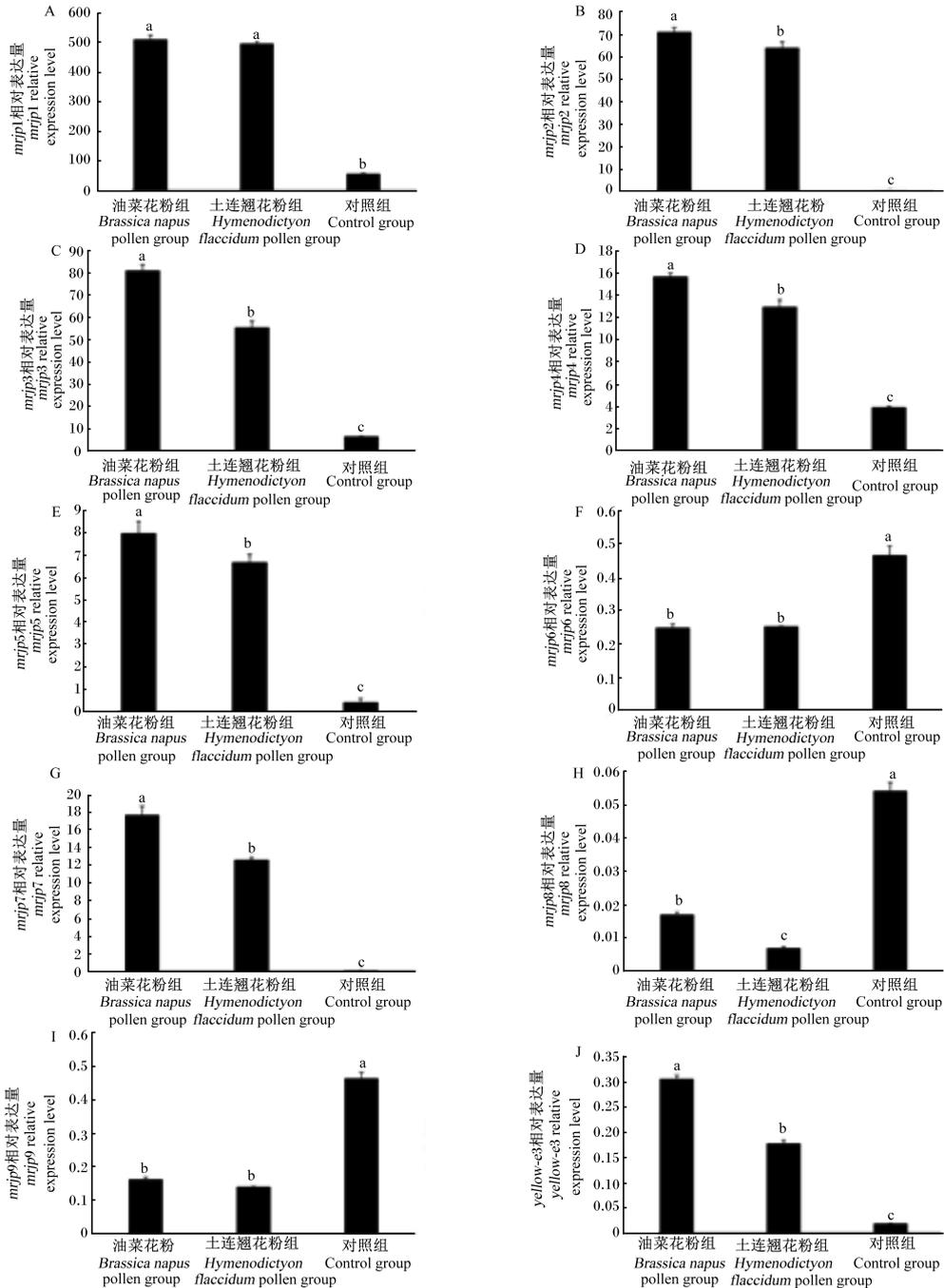
2.3 不同蜂花粉对西方蜜蜂 *mrjp1* ~ *mrjp9* 和 *yellow-e3* 表达的影响

蜂王浆由哺育蜂咽下腺和上颚腺分泌,一般西方蜜蜂工蜂在出房第9天前后王浆蛋白表量达到最高峰,因此本试验对出房第9天工蜂头部 *mrjp1* ~ *mrjp9* 和 *yellow-e3* 的相对表达量进行检

测。结果显示, *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 在工蜂头部相对高表达(图1-A~E、G), *mrjp6*、*mrjp8*、*mrjp9* 和 *yellow-e3* 相对低表达(图1-F、H、I、J)。与对照组相比,饲喂油菜花粉和土连翘花粉显著提高了 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5*、*mrjp7* 和 *yellow-e3* 的相对表达量 ($P <$

0.05), 且油菜花粉组上述基因的相对表达量显著高于土连翘花粉组 ($P < 0.05$); 饲喂油菜花粉和土连翘花粉显著降低了 *mrjp6*、*mrjp8*、*mrjp9* 的相对表达量 ($P < 0.05$)。根据 *mrjp1*~*mrjp9* 的相对表达

量数据, 油菜花粉组、土连翘花粉组和对照组 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的相对表达量之和分别占 *mrjps* 总相对表达量的 99.94%、99.94% 和 98.60%。



数据柱标注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Value columns with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), and with the same small letters mean no significant difference ($P > 0.05$).

图 1 不同蜂花粉对西方蜜蜂 *mrjp1*~*mrjp9* 和 *yellow-e3* 表达的影响

Fig.1 Effects of different bee pollens on expression of *mrjp1* to *mrjp9* and *yellow-e3* of *Apis mellifera*

2.4 不同蜂花粉对蜂王浆产量和质量的影响

3组蜂王浆产量如表4所示,其中油菜花粉组蜂王浆产量最高,其次为土连翘花粉组,对照组最低,各组之间差异显著($P<0.05$)。如表5所示,饲喂油菜花粉和土连翘花粉与自然采粉所产蜂王浆在水分、10-HDA、粗蛋白质含量和酸度方面都存在一定差异。对3种蜂王浆理化数据进行两两比

较:水分含量,油菜花粉组显著低于土连翘花粉组($P<0.05$),其他组间差异不显著($P>0.05$);粗蛋白质含量,油菜花粉组显著高于土连翘花粉组($P<0.05$),其他组间差异不显著($P>0.05$);酸度,油菜花粉组显著高于土连翘花粉组($P<0.05$),其他组间差异不显著($P>0.05$);10-HDA含量,各组间差异不显著($P>0.05$)。

表4 不同蜂花粉对蜂王浆产量的影响

Table 4 Effects of different bee pollens on royal jelly yield

项目 Item	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
蜂王浆产量 Production of royal jelly	24.33±1.41 ^a	20.17±1.02 ^b	17.69±0.92 ^c

表5 不同蜂花粉对蜂王浆质量的影响

Table 5 Effects of different bee pollens on royal jelly quality

项目 Items	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
水分 Moisture/%	59.83±3.32 ^b	64.81±0.55 ^a	63.14±0.06 ^{ab}
10-羟基-2-癸烯酸 10-HDA/%	2.43±0.11	2.28±0.22	2.33±0.06
粗蛋白质 Crude protein/%	16.73±1.07 ^a	14.44±1.00 ^b	14.66±1.08 ^{ab}
酸度 Acidity	41.00±2.00 ^a	36.33±2.31 ^b	37.67±1.15 ^{ab}

2.5 不同蜂花粉对蜂王浆水溶性蛋白和氨基酸组成的影响

按照BCA试剂盒说明书,建立牛血清白蛋白(BSA)标准曲线(图2),根据回归方程式: $y=0.0056x+0.0343$ ($R^2=0.9946$, y 为吸光度, x 为水溶性蛋白含量),将3组蜂王浆提取液吸光度代入方程式,计算3组蜂王浆中水溶性蛋白含量,每样取10 μ L进行SDS-PAGE。蜂王浆水溶性蛋白含量测定结果显示3组蜂王浆水溶性蛋白含量基本一致,各组之间不存在显著差异($P>0.05$,表6);3组蜂王浆水溶性蛋白SDS-PAGE在谱带数目、带的分布与强弱等方面基本一致,表明2个试验组和对照组所产蜂王浆具有相似的水溶性蛋白组成(图3)。采用水解法对3种蜂王浆氨基酸组成及含量进行了检测,3种蜂王浆中含有17种

氨基酸,且含量基本一致,除赖氨酸外不存在显著差异($P>0.05$,表7),说明不同花粉饲喂蜂群所产蜂王浆氨基酸组成基本无差异。

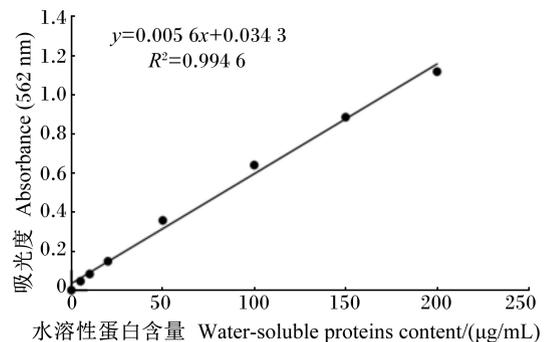


图2 蜂王浆中水溶性蛋白含量测定标准曲线

Fig.2 Standard curve for water-soluble proteins content determination of royal jelly

表 6 不同蜂花粉对蜂王浆中水溶性蛋白含量的影响

项目 Item	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
水溶性蛋白 Water-soluble proteins	25.41±0.39	25.30±0.20 ^a	25.65±0.15

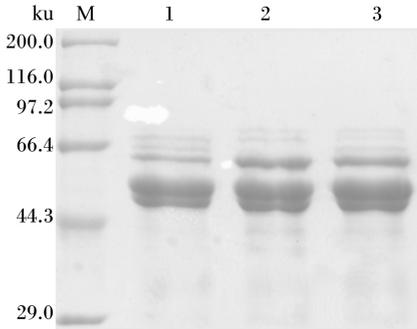


图 3 3 种蜂王浆水溶性蛋白 SDS-PAGE 图
M:蛋白质标准分子量 Protein molecular weight marker; 1:对照组 Control group; 2:土连翘花粉组 *Hymenodictyon flaccidum* pollen group; 3:油菜花粉组 *Brassica napus* pollen group。

图 3 3 种蜂王浆水溶性蛋白 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE map of water-soluble proteins of three kinds of royal jelly

3 讨论

3.1 不同蜂花粉对西方蜜蜂 *mrjps* 表达的影响

蜂花粉主要为蜜蜂提供蛋白质,自然条件下,蜂花粉是西方蜜蜂唯一蛋白质来源,不同蜂花粉粗蛋白质含量不同,从 8%~40%不等^[29]。不同蜂花粉对于蜜蜂具有不同营养价值,这主要取决于花粉中蜜蜂所需必需氨基酸的含量^[28]。蜜蜂生长发育和生命活动必需氨基酸须由外源食物供给,蜜蜂对蛋白质的需求其实就是对氨基酸的需求^[24]。本研究中,油菜花粉粗蛋白质含量为 27.21%、土连翘花粉为 20.54%、鬼针草花粉为 15.29%,且 3 种蜂花粉单一氨基酸(组氨酸除外)含量全部为油菜花粉>土连翘花粉>鬼针草花粉。通过饲喂西方蜜蜂油菜花粉、土连翘花粉来研究不同粗蛋白质含量的蜂花粉对 *mrjps* 表达的影响,与西方蜜蜂自然采集花粉(试验季节主要蜜粉源植物为鬼针草)相比,饲喂粗蛋白质含量相对高的油菜花粉和土连翘花粉可以显著提高 *mrjp1*、*mr-*

jp2、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 在西方蜜蜂哺育蜂头部的相对表达量,且提高程度全部为油菜花粉>土连翘花粉;同时显著降低 *mrjp6*、*mrjp8* 和 *mrjp9* 的相对表达量,降低程度没有一定规律性。这一结果可能与 MRJPs 在蜂王浆中的含量和功能相关,MRJPs 是蜂王浆中最主要的蛋白质成分^[7-8],在蜂王浆中主要发挥营养功能^[4],而蜂王浆的相关生理功能均与其所含有的 MRJPs 有关^[30],饲料中的蛋白质可以刺激西方蜜蜂咽下腺发育和蜂王浆分泌^[9],我们推测高粗蛋白质含量的蜂花粉更能刺激咽下腺中具有营养功能的 *mrjps* 的表达。MRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4、MRJP5 和 MRJP7 在蜂王浆中主要发挥营养功能^[9,31],因而粗蛋白质含量较高的油菜花粉和土连翘花粉更能提高 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的相对表达量,并且 3 种蜂花粉中粗蛋白质含量越高对上述基因相对表达量的提高程度越高。MRJP6 与其他 MRJPs 不同,没有富氮重复区域^[17],可能不发挥主要或不具备营养功能,并且 *mrjp6* 在采集蜂中的相对表达量高于哺育蜂^[32],可能与神经发育相关^[14]。饲喂油菜花粉和土连翘花粉降低了 *mrjp6* 的相对表达量,推测饲喂油菜花粉和土连翘花粉延缓哺育蜂向采集蜂转变,使神经发育成熟变缓,从而降低了 *mrjp6* 的表达。MRJP8 和 MRJP9 同样都缺乏后期进化出的富氮重复区域,这些重复区域被认为是蜂王浆主要的营养价值所在,因而认为 MRJP8 和 MRJP9 不具备营养功能^[33],MRJP8 和 MRJP9 在王浆中含量极少,在王浆中的功能尚不清楚,但 MRJP8 和 MRJP9 在蜜蜂毒腺可以检测到^[34],可能参与蜂毒对异物引发的过敏反应。蜜蜂守卫蜂介于哺育蜂和采集蜂之间^[35],蜂蛰作为蜜蜂一种防御行为说明守卫蜂毒腺较哺育蜂更发达,推测 *mrjp8* 和 *mrjp9* 在哺育蜂中的表达量要低于守卫蜂。蜜蜂蜂群中工蜂存在一种日龄多型性(age-dependent roles)现象,分工情况的改变伴随

着咽下腺分泌功能的变化。饲喂高粗蛋白质含量蜂花粉延长了哺育蜂分泌活动周期,推迟了哺育蜂向守卫蜂转变时间,饲喂菜花粉和土连翘花粉的9日龄工蜂还属于哺育蜂,而对照组9日龄工蜂可能已转变为守卫蜂,导致试验组的 *mrjp8* 和 *mrjp9* 的相对表达量与对照组相比反而降低。高粗

蛋白质含量的蜂花粉反而会降低非营养功能基因 *mrjp6*、*mrjp8* 和 *mrjp9* 的相对表达量,但其相对表达量的降低程度与蜂花粉中粗蛋白质及氨基酸含量并没有一定的规律性,蜂花粉对 *mrjp6*、*mrjp8* 和 *mrjp9* 表达的影响作用需要更多的研究来证明。

表 7 3 种蜂王浆氨基酸组成及含量

Table 7 Amino acid composition and contents of three kinds of royal jelly

mg/g

氨基酸 Amino acids	组别 Groups		
	油菜花粉 <i>Brassica napus</i> pollen	土连翘花粉 <i>Hymenodictyon flaccidum</i> pollen	对照 Control
丙氨酸 Ala	3.84±0.31	3.51±0.34	3.77±0.47
半胱氨酸 Cys	0.20±0.12	0.19±0.06	0.21±0.06
天冬氨酸 Asp	20.37±0.53	18.55±1.59	18.93±0.93
谷氨酸 Glu	12.18±0.55	11.20±1.31	12.54±2.54
苯丙氨酸 Phe	7.15±0.39	6.48±0.52	6.57±0.35
亮氨酸 Leu	8.72±0.49	7.81±0.70	9.09±1.92
甘氨酸 Gly	4.19±0.21	3.83±0.37	4.05±0.37
组氨酸 His	4.70±0.31	4.44±0.38	4.37±0.28
异亮氨酸 Ile	5.54±0.34	4.91±0.44	5.68±1.09
赖氨酸 Lys	12.13±0.36 ^a	10.91±0.55 ^b	11.18±0.62 ^{ab}
甲硫氨酸 Met	1.66±0.02	1.44±0.23	1.67±0.19
脯氨酸 Pro	7.88±0.52	6.72±0.88	7.26±0.60
精氨酸 Arg	4.71±0.33	4.14±0.33	5.28±1.76
丝氨酸 Ser	7.93±0.17	7.16±0.83	7.49±0.61
苏氨酸 Thr	5.91±0.14	5.30±0.45	5.54±0.34
缬氨酸 Val	6.88±0.41	6.08±0.44	6.63±0.69
酪氨酸 Tyr	4.46±0.04	4.12±0.25	4.71±0.83

3.2 不同蜂花粉对蜂王浆产量、质量和组成的影响

影响蜂王浆产量的因素众多,包括蜂种、蜜粉源、气候、泌浆蜂日龄及取浆时间等^[36-37]。蜜蜂和其他动物一样,不能制造全部氨基酸,大都需从食物中获得^[38]。蜜蜂摄取蛋白质后在体内消化分解成多肽或氨基酸,被肠壁吸收,通过循环系统运输到各组织器官,重新合成所需要的蛋白质,参与细胞的构成和其他生命活动。工蜂咽下腺是分泌蜂王浆的主要器官,蜂花粉可以刺激工蜂咽下腺发育及分泌蜂王浆^[25],蜂花粉中的粗蛋白质含量直接影响工蜂的咽下腺发育水平^[39]。粗蛋白质含量不同的蜂花粉对工蜂咽下腺发育的刺激有所不同,高蛋白质食物对咽下腺发育有明显的刺激作用,并能延长工蜂寿命和泌浆时间^[40]。5日龄前

工蜂消耗的蜂花粉主要用于咽下腺的发育,咽下腺发育成熟后哺育蜂需要大量的蛋白质用于王浆的分泌^[41]。蜂群内蛋白质营养供应不足或质量不佳,会对养蜂生产造成重大影响。因此,在养蜂生产中必须根据外界蜜粉源条件,适时添加蛋白质饲料^[42]。本研究取浆时间为云南省蒙自市的10—11月份,蜜粉源植物主要是鬼针草,其花粉中粗蛋白质含量为15.29%,蛋白质含量较低,生产蜂王浆的蛋白质营养供应相对不足,而饲喂粗蛋白质含量较高的油菜花粉和土连翘花粉则可以显著提高蜂王浆产量,并且蜂花粉中粗蛋白质含量越高,蜂群的蜂王浆产量越高。但是,并不是蜂花粉中粗蛋白质含量越高对蜂王浆产量的提高程度越高,粗蛋白质含量具有一定阈值,一般为30%,饲喂粗蛋白质含量超过阈值的蜂花粉甚至会降低

王浆分泌量^[9],且过高的粗蛋白质含量反而会对咽下腺造成一定的抑制作用^[43]。因此,西方蜜蜂所饲喂的蜂花粉中粗蛋白质含量不宜过低也不宜过高,以 27.5%~30.0%为宜^[30],油菜花粉粗蛋白质含量为 27.21%,对于繁育蜂群和蜂王浆生产来说油菜花粉是一种较为合适的蛋白质饲料。由于蜂花粉不只含有蛋白质和氨基酸,还富含维生素、微量元素、活性酶、酚类和黄酮类化合物、脂类、核酸等多种物质^[20],蜂花粉中其他物质对蜂王浆产量的影响还需更多研究来证明。

蜂王浆质量是对于蜂王浆作为一种商品而言的,蜂王浆质量的评判应该综合考虑蜂王浆的新鲜性、真实性、洁净程度及蜂种、地区和生产季节的差异性。蜂王浆的国家标准分别从色泽、气味、口感和理化要求等方面对蜂王浆做了相应规定,不同蜂花粉所产蜂王浆的色泽、气味、口感都有所不同,无优劣之分,本研究主要从蜂王浆理化要求方面对 3 种蜂王浆做了相应检测。蜂王浆的化学成分极为复杂,生物活性物质种类繁多,因而影响蜂王浆质量的因素错综复杂。蜂王浆中的多种生物活性成分大部分来源于其食物中的蛋白质,因此,王浆的质量和生物活性成分受食料(花粉)条件的影响非常明显。王浆酸(10-HDA)是自然界其他物质中未被发现的蜂王浆特有成分,是反映蜂王浆质量的重要指标之一^[44]。本研究中,饲喂 3 种蜂花粉蜜蜂所产蜂王浆的 10-HDA 含量差异不显著。根据国家标准《蜂王浆》(GB 9697—2008)产品等级和理化要求,优等品水分含量 $\leq 67.5\%$ 、10-HDA 含量 $\geq 1.8\%$ 、蛋白质含量在 11%~16%、酸度在 30~53,西方蜜蜂饲喂 3 种蜂花粉所产蜂王浆都属于优等品,结合 3 种蜂王浆各项理化指标数据差异性分析,饲喂油菜花粉和土连翘花粉西方蜜蜂所产蜂王浆与自然采粉所产蜂王浆在质量方面不存在显著差异。蜂王浆的国家标准还有待完善,不同蜂花粉对蜂王浆中其他活性物质的影响还需进一步研究。

MRJPs 为水溶性蛋白,为蜂王浆中主要的蛋白质^[7-8]。使用不同粗蛋白质含量的蜂花粉饲喂蜂群所产蜂王浆的水溶性蛋白含量差异不显著,水溶性蛋白 SDS-PAGE 图在谱带数目、带的分布与强弱等方面差异不显著,表明它们具有相似的水溶性蛋白组成,蜂花粉的粗蛋白质含量对蜂王浆水溶性蛋白组成影响很小。蜂王浆由多种蛋白

质组成,每种蛋白质组成及氨基酸含量各不相同,如果一种或多种 *mrjps* 表达量改变必然会影响蜂王浆中某些氨基酸含量的变化,但是本试验检测到饲喂 3 种不同蜂花粉所产蜂王浆的氨基酸组成及含量基本一致,推测 3 种蜂王浆蛋白质组成基本没有发生改变,饲喂 3 种粗蛋白质含量不同的蜂花粉对所产蜂王浆组成影响不大。

3.3 *mrjps* 和 *yellow-e3* 的表达量对蜂王浆产量的影响

遗传信息由 DNA 转录为 RNA,再翻译为行使功能的蛋白质,这是生命信息表达的中心法则^[45-46]。基因表达是指基因指导下的蛋白质合成过程。在稳定状态的时候,mRNA 的水平决定了蛋白质的水平。但是,不能以 mRNA 的丰度来判断 mRNA 翻译成蛋白质的水平,蛋白质的表达水平除了被转录本的量调控以外,还存在其他许多重要的调控途径^[47]。蜂王浆成分十分复杂^[3],MRJPs 是蜂王浆中蛋白质的主要组成成分,其中 MRJP1、MRJP2、MRJP3 和 MRJP5 占蜂王浆蛋白质总量的 82%^[8]。MRJPs 是由 *mrjps* 基因表达合成的,*mrjps* 是一个非量产基因,其 mRNA 表达量的高低反映了单只工蜂咽下腺分泌蜂王浆中 MRJPs 能力的高低^[30]。本研究中,*mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的相对表达量均为油菜花粉组>土连翘花粉组>对照组,其蜂王浆产量也都为油菜花粉组>土连翘花粉组>对照组,3 组蜂花粉中 *mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的相对表达量都占 *mrjps* 总相对表达量的 98% 以上,在西方蜜蜂中相对高表达,其表达量的高低与蜂王浆产量正相关,而 *mrjp6*、*mrjp8* 和 *mrjp9* 在西方蜜蜂中相对低表达,其表达量的高低不会影响蜂王浆产量。据此推测,*mrjp1*、*mrjp2*、*mrjp3*、*mrjp4*、*mrjp5* 和 *mrjp7* 的表达量越高,蜂王浆产量就会越高。

黄体基因(*yellow*)家族可能是迄今为止发现的最神秘的家族之一,由于第 1 个被鉴别出的黄体基因与果蝇体色相关,被命名为 *yellow*^[48-49]。迄今为止,*yellow* 只在昆虫和一些细菌中发现,在昆虫多样性中起到重要作用。在西方蜜蜂中,*mrjps* 家族属于 *yellow* 家族的一个分支,起初只在蜜蜂属中发现,后来研究发现 *mrjp* 类似基因普遍存在于膜翅目当中^[9]。Drapeau 等^[10]认为 *mrjps* 起源于 *yellow-e3*,是由 *yellow-e3* 经过一次快速多

重复的进化事件形成的。同时, *mrjps* 的复制是通过 *yellow-e3* 作为启动子而开始的, 并且 *yellow* 与西方蜜蜂的生理和发育相关。我们推测 *yellow-e3* 可能与西方蜜蜂咽下腺发育相关。定量 PCR 研究发现, 与对照组相比, 饲喂油菜花粉和土连翘花粉可以显著提高西方蜜蜂 *yellow-e3* 的相对表达量, 且提高程度为油菜花粉 > 土连翘花粉。我们推测, *yellow-e3* 表达量越高, 其咽下腺发育程度越高, 蜂王浆合成相关基因表达量越高, 咽下腺分泌活动越强, 蜂王浆产量越高。

4 结论

不同粗蛋白质含量的蜂花粉对西方蜜蜂 *mrjps* 的表达及蜂王浆产量存在影响, 对蜂王浆质量和组成的影响不大。3 组蜂群相比, 采食油菜花粉的蜂群具有营养功能的 *mrjps* 的相对表达量和蜂王浆产量最高。由此可见, 对于西方蜜蜂繁育或蜂王浆生产, 油菜花粉可作为一种优质的饲料。

参考文献:

- [1] NOZAKI R, TAMURA S, ITO A, et al. A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134 (4) : 2332-2337.
- [2] YOU Z Y, QIAN Q J, WANG Y R, et al. Transgenic silkworms secrete the recombinant glycosylated MR-JP1 protein of Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* [J]. *Transgenic Research*, 2017, 26 (5) : 653-663.
- [3] TAKENAKA T, ECHIGO T. Chemical composition of royal jelly [J]. *Honeybee Sci*, 1982, 3 (2) : 69-74.
- [4] ALBERT S, BHATTACHARYA D, KLAUDINY J, et al. The family of major royal jelly proteins and its evolution [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, 49 (2) : 290-297.
- [5] CHEN C, CHEN S Y. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions [J]. *Food Chemistry*, 1995, 54 (2) : 195-200.
- [6] LI J K, WANG T, ZHANG Z H, et al. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (21) : 8411-8422.
- [7] TAKENAKA T, ECHIGO T. Proteins and peptides in royal jelly [J]. *Journal of the agricultural Chemical Society of Japan*, 1983, 57 (12) : 1203-1209.
- [8] SCHMITZOVÁ J, KLAUDINY J, ALBERT Š, et al. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998, 54 (9) : 1020-1030.
- [9] BUTTSTEDT A, MORITZ R F, ERLER S. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family [J]. *Biological Reviews*, 2014, 89 (2) : 255-269.
- [10] DRAPEAU M D, ALBERT S, KUCHARSKI R, et al. Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees [J]. *Genome Research*, 2006, 16 (11) : 1385-1394.
- [11] KAMAKURA M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees [J]. *Nature*, 2011, 473 (7348) : 478-483.
- [12] THOMPSON G J, KUCHARSKI R, MALESZKA R, et al. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15 (5) : 537-644.
- [13] CHEN X, HU Y, ZHENG H Q, et al. Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker-destined larvae [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42 (9) : 665-673.
- [14] 李晓燕, 杨文静, 王琦, 等. 西方蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 体内王浆蛋白 *MRJP6* 基因的表达 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35 (6) : 1415-1420.
- [15] BUTTSTEDT A, MORITZ R F A, ERLER S. More than royal food-major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10 : 72.
- [16] BLANK S, BANTLEON F I, MCINTYRE M, et al. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity [J]. *Cliznical & Experimental Allergy*, 2012, 42 (6) : 976-985.
- [17] ALBERT Š, KLAUDINY J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50 (1) : 51-59.
- [18] SHEN L R, XING L P, YANG Y X, et al. Sequence analysis of functional apisimin-2 cDNA from royal jelly of Chinese honeybee and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 16 (Suppl. 1) : 222-226.
- [19] 刘建涛, 赵利, 苏伟, 等. 蜂花粉生物活性物质的研究进展 [J]. *食品科学*, 2006, 27 (12) : 909-912.

- [20] LINSKENS H F, JORDE W. Pollen as food and medicine: a review [J]. *Economic Botany*, 1997, 51 (1): 78-86.
- [21] ALMEIDA-MURADIAN L B, PAMPLONA L C, COIMBRA S, et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18 (1): 105-111.
- [22] EL-WAHAB T E A, GOMAA A M. Application of yeast culture (*Candida tropicalis*) as pollen substitute in feeding honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in egypt [J]. *Journal of Applied Sciences Research*, 2005, 1 (5): 386-390.
- [23] HUANG Z Y. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance [J]. *Terrestrial Ecology*, 2012, 5 (2): 1-15.
- [24] 陈盛祿. 中国蜜蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 209-214.
- [25] SHUMKOVA R, ZHELYAZKOVA I. Stimulating feeding and development of hypopharyngeal and thoracic glands of honeybees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Agricultural Science and Technology*, 2015, 7 (3): 309-312.
- [26] CRAILSHEIM K. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1991, 161 (1): 55-60.
- [27] STANDIFER L N. Honey bee nutrition and supplemental feeding [J]. *Beekeeping in the United States, Agriculture Handbook*, 1980, 335: 39-45.
- [28] CRAILSHEIM K. The protein balance of the honey bee worker [J]. *Apidologie*, 1990, 21 (5): 417-429.
- [29] 吴银松. 云南蜜蜂科学饲养 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2019: 47.
- [30] 王改英. 意大利蜜蜂产浆期代用花粉中适宜蛋白质水平的研究 [D]. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学, 2012: 41.
- [31] 李晓燕, 梁庆环, 杨文静, 等. 王浆主蛋白 *MRJP7* 基因在意大利蜜蜂体内的表达 [J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38 (2): 371-377.
- [32] LIU F, LI W F, ZHANG S G, et al. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57 (2): 274-279.
- [33] ALBERT Š, KLAUDINY J. MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2007, 46 (2): 99-104.
- [34] PEIREN N, DE GRAAF D C, VANROBAEYS F, et al. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage [J]. *Toxicon*, 2008, 52 (1): 72-83.
- [35] 丁桂玲. 蜜蜂的守卫行为 [J]. *中国蜂业*, 2012, 63 (31): 49, 53.
- [36] KUMOVA U, KORKMAZ A, BERKIN Ö, et al. An investigation about the effects of various factors on royal jelly production in different honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes [J]. *Mellifera*, 2005, 5 (9): 56-64.
- [37] SAHINLER N, KAFTANOGLU O. The effects of season and honey bee (*Apis mellifera*) genotype on grafting rates and royal jelly production [J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29 (2): 499-503.
- [38] DE GROOT A P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.) [J]. *Physiologia Comparata et Oecologia*, 1953, 3: 197-285.
- [39] PERNAL S F, CURRIE R W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Apidologie*, 2000, 31 (3): 387-409.
- [40] STANDIFER L N. A comparison of the protein quality of pollens for growth-stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) [J]. *Insectes Sociaux*, 1967, 14 (4): 415-425.
- [41] MAURIZIO A. Pollenernährung und lebensvorgänge bei der honigbiene (*Apis mellifica* L.) [J]. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, 1954, 68: 115-182.
- [42] 程艳华, 刘亚男, 胡福良, 等. 蛋白质营养水平对蜂王浆产量和成分的影响 [J]. *蜜蜂杂志*, 2008, 28 (4): 7-9.
- [43] ROULSTON T A H, CANE J H. The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes) [J]. *Evolutionary Ecology*, 2002, 16 (1): 49-65.
- [44] 胡福良, 李英华, 朱威. 影响蜂王浆质量的因素——兼析春季油菜王浆质优的原因 [J]. *蜜蜂杂志*, 2004 (6): 28-29.
- [45] CRICK F H. On protein synthesis [J]. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1958, 12: 138-163.
- [46] CRICK F H. Central dogma of molecular biology [J]. *Nature*, 1970, 227 (5258): 561-563.
- [47] LIU Y, BEYER A, AEBERSOLD R. On the depend-

ency of cellular protein levels on mRNA abundance [J]. *Cell*, 2016, 165(3):535–550.

- [48] BIESSMANN H. Molecular analysis of the yellow gene (*y*) region of *Drosophila melanogaster* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 1985, 82(21):7369–7373.

- [49] BREHME K S. The effect of adult body color mutations upon the larva of *drosophila melanogaster* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1941, 27(6):254–261.

Effects of Different Bee Pollens on Expression of Major Royal Jelly Protein Genes and Yield, Quality and Composition of Royal Jelly of *Apis mellifera*

XUN Lijie HUANG Xinqiu LI Qiongyan YANG Shuang WANG Yanhui*

(*Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China*)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of different bee pollens on the expression of major royal jelly protein genes (*mrjps*) and the yield, quality and composition of royal jelly of *Apis mellifera*. Nine colonies of Italian honeybee with approximately the same queen and colony potential were selected and randomly divided into three groups, and each group had three colonies of bees. Bees in *Brassica napus* pollen group were fed with *Brassica napus* pollen, bees in *Hymenodictyon flaccidum* pollen group were fed with *Hymenodictyon flaccidum* pollen, and those in control group were not fed pollen, but collected pollen (mainly *Bidens pilosa* pollen) naturally. The experiment period was 2 months, from mid-September to mid-November, 2017. The content of crude protein and the contents and composition of amino acids in *Brassica napus* pollen, *Hymenodictyon flaccidum* pollen and *Bidens pilosa* pollen were determined by Kjeldahl method and hydrolysis method, respectively. Three 9-day-old worker bees were selected from each group to determine the relative expression levels of *mrjp1* to *mrjp9* and *yellow-e3*, and the yield and quality, the contents and composition of water-soluble proteins and amino acids of royal jelly from each group were measured. The results showed as follows: the contents of crude protein and total amino acids of the three bee pollens were *Brassica napus* pollen > *Hymenodictyon flaccidum* pollen > *Bidens pilosa* pollen, and differences were significant among groups ($P < 0.05$); all the contents of single amino acids (except histidine) of the three bee pollens were *Brassica napus* pollen > *Hymenodictyon flaccidum* pollen > *Bidens pilosa* pollen, and differences were significant among groups ($P < 0.05$). In the head of 9-day-old bees, the *mrjp1*, *mrjp2*, *mrjp3*, *mrjp4*, *mrjp5* and *mrjp7* had relatively high expression, while the *mrjp6*, *mrjp8* and *mrjp9* had relatively low expression. The total relative expression level of the *mrjp1*, *mrjp2*, *mrjp3*, *mrjp4*, *mrjp5* and *mrjp7* accounted for 99.94%, 99.94% and 98.60% of the total relative expression level of *mrjps* in *Brassica napus* pollen group, *Rosa rugosa* pollen group and control group, respectively. Compared with the control group, feeding *Brassica napus* pollen and *Rosa rugosa* pollen significantly increased the relative expression levels of *mrjp1*, *mrjp2*, *mrjp3*, *mrjp4*, *mrjp5*, *mrjp7* and *yellow-e3* ($P < 0.05$), but significantly decreased the relative expression levels of *mrjp6*, *mrjp8* and *mrjp9* ($P < 0.05$). The royal jelly yield of *Brassica napus* pollen group was the highest, the *Rosa rugosa* pollen group was higher and the control group was the lowest, and differences were significant among groups ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the quality of royal jelly produced by bees from of *Brassica napus* pollen group and *Rosa rugosa* pollen group compared with the control group ($P > 0.05$), and the composition

* Corresponding author, professor, E-mail: 1135524682@qq.com

of water-soluble protein and amino acids in three kinds of royal jelly were basically the same. In conclusion, the effects of bee pollen with different crude protein contents on the expression of *mrjps* and the yield of royal jelly are different, but the effects of the three groups of bee pollens on the quality and composition of royal jelly are not significant. Comparison of three groups of bee colonies, the expression of *mrjps* with nutritional function and the yield of royal jelly in the *Brassica napu* pollen group were the highest. Collectively, for the *Apis mellifera* breeding or royal jelly production, the *Brassica napu* pollen can be used as a high-quality nutritional feed. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(2):856-869]

Key words: royal jelly; bee pollen; major royal jelly protein genes; crude protein; amino acid