

p38 MAPK 基因在西方蜜蜂越冬期 表达模式的研究*

徐 凯** 杜亚丽 龙登隆 刘玉玲 陈东海 王 志 牛庆生***

(吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132108)

摘 要 【目的】*p38 MAPK* 基因在昆虫的低温响应机制中发挥着重要作用, 本研究旨在探究 *p38 MAPK* 基因在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 越冬期内表达规律。【方法】本研究对西方蜜蜂 *p38 MAPK* 蛋白序列进行生物信息学分析, 并利用荧光定量 PCR 技术检测该基因在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*、欧洲黑蜂 *Apis mellifera mellifera*、高加索蜂 *Apis mellifera caucasica* 和卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera carnica* 于不同越冬时期和不同越冬方式下体内的表达量。【结果】西方蜜蜂 *p38 MAPK* 包含 1 083 bp 的开放阅读框区域, 编码 360 个氨基酸, 包含 TGY 双磷酸化三肽模体序列和磷酸化激活环序列。*p38 MAPK* 在蜜蜂所有组织中均有表达, 分别在胸部和腹部处于最高和最低表达丰度。*p38 MAPK* mRNA 在不同蜂种不同越冬时期的表达量存在显著差异, 4 个蜂种于室外越冬时 *p38 MAPK* 的表达量均显著高于室内越冬 ($P<0.05$); 随着蜜蜂越冬持续时间的延长, 意大利蜜蜂和欧洲黑蜂不同越冬方式下体内 *p38 MAPK* 的表达均呈现先上升后下降的表达趋势, 高加索蜂在室外与室内越冬时体内该基因的表达量均表现出持续上升的表达趋势, 该基因在卡尼鄂拉蜂中的表达趋势与其他 3 个蜂种呈现一定差异, 卡尼鄂拉蜂 *p38 MAPK* 在室内越冬方式下表达量保持恒定, 但在室外越冬方式下表现出先下降后上升的表达趋势; 比较室外越冬情况下 4 个蜂种于不同越冬时期体内 *p38 MAPK* 表达量后发现, 除在次年的 1 月外, 其他越冬时期 4 个蜂种体内 *p38 MAPK* 的表达量均存在显著差异 ($P<0.05$)。【结论】*p38 MAPK* 基因在西方蜜蜂越冬期内发挥着重要的生理功能, *p38 MAPK* 信号通路可作为蜜蜂抗寒机制研究的候选信号通路。

关键词 西方蜜蜂; 越冬期; *p38 MAPK*; 基因表达; 抗寒性

Expression of the *p38 MAPK* gene in different overwintering stages of *Apis mellifera*

XU Kai** DU Ya-Li LONG Deng-Long LIU Yu-Ling
CHEN Dong-Hai WANG Zhi NIU Qing-Sheng***

(Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the expression of the *p38 MAPK* gene, which plays an important role in the insect cold response mechanism, in different overwintering stages of the western honeybee *Apis mellifera*. 【Methods】The amino acid sequence of the *Apis mellifera p38 MAPK* gene was analyzed and its mRNA expression in different overwinter stages of *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera caucasica* and *Apis mellifera carnica* detected using RT-qPCR. 【Results】The *p38 MAPK* gene of *A. mellifera* includes a 1 083 bp open reading frame, encodes a polypeptide with 360 amino acids and contains a putative dual phosphorylation motif TGY and a phosphorylated activating ring sequence. *P38 MAPK* was expressed in all honeybee tissues. Highest and lowest expression occurred in the thorax and abdomen, respectively. Expression varied in different overwintering stages and subspecies. Expression was higher outdoors than indoors in all four

*资助项目 Supported projects: 2018 年度吉林省科研院所引进高层次科技创新人才计划项目; 吉林市科技发展计划项目 (20190104214); 吉林省科技发展计划项目 (20180101022JC、202002061JC)

**第一作者 First author, E-mail: xukaiyuzhong@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: 1463199779@qq.com

收稿日期 Received: 2020-02-05; 接受日期 Accepted: 2020-07-28

subspecies $P < 0.05$). In winter, *p38 MAPK* mRNA expression first increased then decreased in *A. mellifera ligustica* and *A. mellifera mellifera* which have different overwintering strategies. Expression increased in both outdoor and indoor overwintering colonies of *A. mellifera caucasica*. Unlike these three subspecies, expression remained constant in indoor overwintering colonies of *A. mellifera carnica* and tended to decrease after an initial increase in outdoor overwintering colonies of this subspecies. Overwintering expression levels varied among subspecies except in January of the second year ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The *p38 MAPK* gene plays an important physiological role in the overwintering processes of the western honeybee. The *p38 MAPK* signal pathway could be a candidate signal pathway for further study of the honeybee cold resistance mechanism.

Key words *Apis mellifera*; overwintering stage; *p38 MAPK*; gene expression; cold resistance

西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是世界上分布最广泛的蜜蜂, 其对温带和亚寒带蜜粉源、气候等环境条件具有较好的适应性, 在为全世界植物授粉、维持生态平衡以及保护生物多样性等方面发挥着重要的作用 (Wallberg *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016)。与其他独居性昆虫相比, 蜜蜂抗寒性较低, 可通过调节个体行为、能量代谢速率以及激素的分泌等途径使蜂团维持一个相对较低但安全的温度来保障蜂群安全越冬 (Döke *et al.*, 2015)。目前, 全世界范围内西方蜜蜂蜂群的越冬损失十分严重, 如美国年均越冬蜂群损失率大于 30%, 远远超过了养蜂者的可接受范围 (小于 19.1%) (Lee *et al.*, 2015; Kulhanek *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018)。巨大的越冬损失对次年蜂群的复壮速度、养殖规模以及春季作物的授粉应用造成极大的负面影响。当前我国生产应用最为广泛的西方蜜蜂主要有意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*、欧洲黑蜂 *Apis mellifera mellifera*、高加索蜂 *Apis mellifera caucasica* 和卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera carnica* (胥保华, 2000)。以上 4 个蜂种具有不同的生物学特性, 尤其在抗寒性, 如越冬损失率、饲料消耗量以及蜜蜂个体过冷却点等方面存在较大的差异 (薛运波等, 2003; 常志光等, 2015)。通过开展不同西方蜜蜂体内抗寒候选基因的差异表达研究, 对比较不同蜂种抗寒性的差异以及探究西方蜜蜂抗寒分子机制具有重要作用。

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinase, MAPK) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 在调控细胞增殖、细胞分化以及凋亡等一系列生理生化反应中具有重要作用 (Liang

and Yang, 2019)。MAPK 蛋白家族主要包括 3 个蛋白家族成员, 分别是 ERKs 家族 (Extracellular signal regulated kinases) 家族、JUKs (Jun amino terminal kinases) 家族和 *p38 MAPKs* 家族。在上述 3 个蛋白家族中, *p38 MAPKs* 易受多种环境应激如温度变化、紫外辐射、病菌感染等外界刺激的诱导 (Craig *et al.* 2004; Gaitanaki *et al.*, 2004)。前期的研究表明 *p38 MAPK* 基因在昆虫应对低温驯化和低温导致的滞育过程中发挥着重要的生物学功能。如 Li 等 (2012) 研究表明 *p38 MAPK* 信号通路在烟粉虱 *Bemisia tabaci* 对低温胁迫的响应机制中发挥着重要作用。Fujiwara 等 (2006) 研究发现 *p38 MAPK* 可调控家蚕 *Bombyx mori* 低温滞育过程的起始与终止。目前关于昆虫 *p38 MAPK* 的研究较少, 至今未见关于蜜蜂 *p38 MAPK* 研究的相关报道。本研究对 *p38 MAPK* 在不同西方蜜蜂越冬期的表达量进行检测, 为探究 *p38 MAPK* 在西方蜜蜂越冬期的表达规律以及下一步明确 *p38 MAPK* 信号通路在蜜蜂抗寒机制的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验昆虫

本研究所用意大利蜜蜂、卡尼鄂拉蜂、高加索蜜蜂、欧洲黑蜂样本均采集自吉林省养蜂科学研究所国家 (吉林) 蜜蜂基因库。各蜂种均选取 6 群健康、越冬群势相近 (6 足框)、越冬饲料储存量相近的保种群作为试验蜂群, 随机将其分为室内越冬组和室外越冬组 ($n = 3$ 群/组) 分别进

行室内越冬和室外越冬。本研究选取越冬地点为吉林省养蜂科学研究所自有的地上越冬室和室外越冬场,位置为吉林省吉林市丰满区(坐标:126.67478, 43.727117)。室外越冬的试验蜂群需必要的越冬包装、避光、避雪等越冬保护。室内越冬时需保持黑暗,且维持 $(0 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的恒定温度。

1.2 样本采集

本研究于2018年10月15日(越冬准备期)采集100只意大利蜜蜂工蜂,于冰上进行解剖,取其触角、头部、胸部、腹部、足、翅膀进行组织表达分析。根据2018年吉林省吉林市的冬季气温(图1)、蜂群入越冬窖时间(2018年11月20日)和预期出越冬窖时间(2019年3月15日),本研究分别选取2018年11月25日、2018年12月25日、2019年1月25日及2019年2月25日这4个时间点进行越冬蜂样品采集。于每个采样时间的当天上午10:00-10:30自蜂箱中采集50只越冬蜂,于冰上迅速解剖出蜜蜂胸部后迅速投入液氮速冻,随后于 -80°C 保存以用于后期越冬期目的基因表达量的检测。

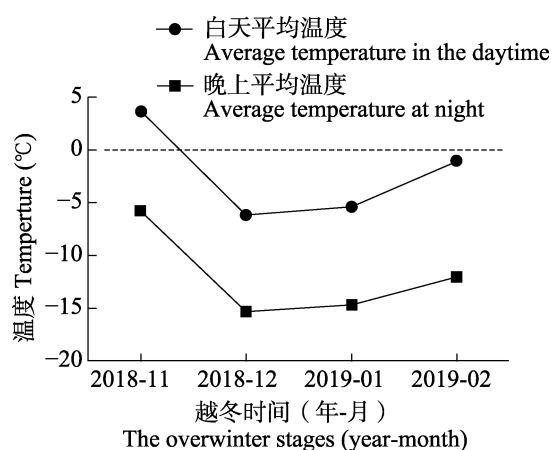


图1 吉林市蜜蜂越冬时期的平均温度
Fig. 1 The average temperature during the overwintering stages in Jilin city

1.3 主要试剂与仪器

本研究主要用到的试剂包括 TRIzol™、RNA-free Water (生工生物工程(上海)股份有限

公司)、SYBR Premix Ex Taq™ II、PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa 公司)、Qubit RNA 检测试剂盒 (Thermo Fisher) 以及三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇等常规试剂。本研究主要用到的主要仪器包括 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf)、Qubit 荧光计 (Thermo Fisher), 7500 FAST 型荧光定量 PCR 仪 (ABI), AB-9902 型触摸式 PCR 仪 (ABI)。

1.4 生物信息学分析

本研究利用多种生物信息学分析软件对西方蜜蜂 *p38 MAPK* 的理化性质、信号肽、跨膜结构域、氨基酸序列、同源性、进化树进行预测分析,所用到的生物信息学软件见表1。

1.5 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

从 -80°C 冰箱内取出样品,经液氮研磨后,按照 Trizol 试剂盒说明书提取各组织总 RNA,测定浓度和纯度后,再根据 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书反转录为 cDNA 模板。反转录产物用 RNAfree 水稀释5倍后于 4°C 保存备用。

1.6 引物设计以及荧光定量 PCR 反应

根据 NCBI 上西方蜜蜂 *p38 MAPK* 基因序列 (XM_003250303.4) 设计荧光定量 PCR 所用引物,引物信息为 *p38 MAPK* F: 5'-ATTTCG-GGGAACAGATCACA-3', *p38 MAPK* R: 5'-TGCTCTTGGCTGGTAATTT-3';内参基因选用 β -actin,引物信息为 β -actin F: 5'-ACTACG-GCCGAACGTGAAAT-3', β -actin R: 5'-GG-AAAAGAGCCTCGGGACAA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。根据 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。反应体系总体积为 $20\ \mu\text{L}$,每个组织样本重复测定3次,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据分析。运用 SPSS17.0 软件中的单因素方差分析,并选用 TUKEY 法进行多重比较,最终结果以平均数 $\pm$ 标准误表示。

表 1 生物信息学分析所用软件
Table 1 The software for bioinformatic and phylogenetic analyses

序列性质 Sequence characteristic	工具 Tools	网址/软件 Web sites/Sofeware
蛋白理化性质预测 Physicochemical properties prediction	Protparam	http://web.expasy.org/protparam/
信号肽结构预测 Signal peptide structure prediction	SignalP 4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
跨膜结构域预测 Transmembrane domain prediction	TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
磷酸化位点预测 Phosphorylation sites prediction	NetPhos 3.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
蛋白二级结构预测 Protein secondary structure prediction	Psipred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
蛋白三级结构预测 Protein tertiary structure prediction	Swiss model	http://swissmodel.expasy.org/interactive
系统发育进化分析 Phylogeny evolution analysis	MEGA 4.1	MEGA version 4.1
同源性比对 Multiple sequences alignment	NCBI 数据库, DNAMAN 6.0	http://www.ncbi.nlm.nih.gov , DNAMAN version 6.0
功能结构域预测 Functional domain prediction	Conserved domains	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi

2 结果与分析

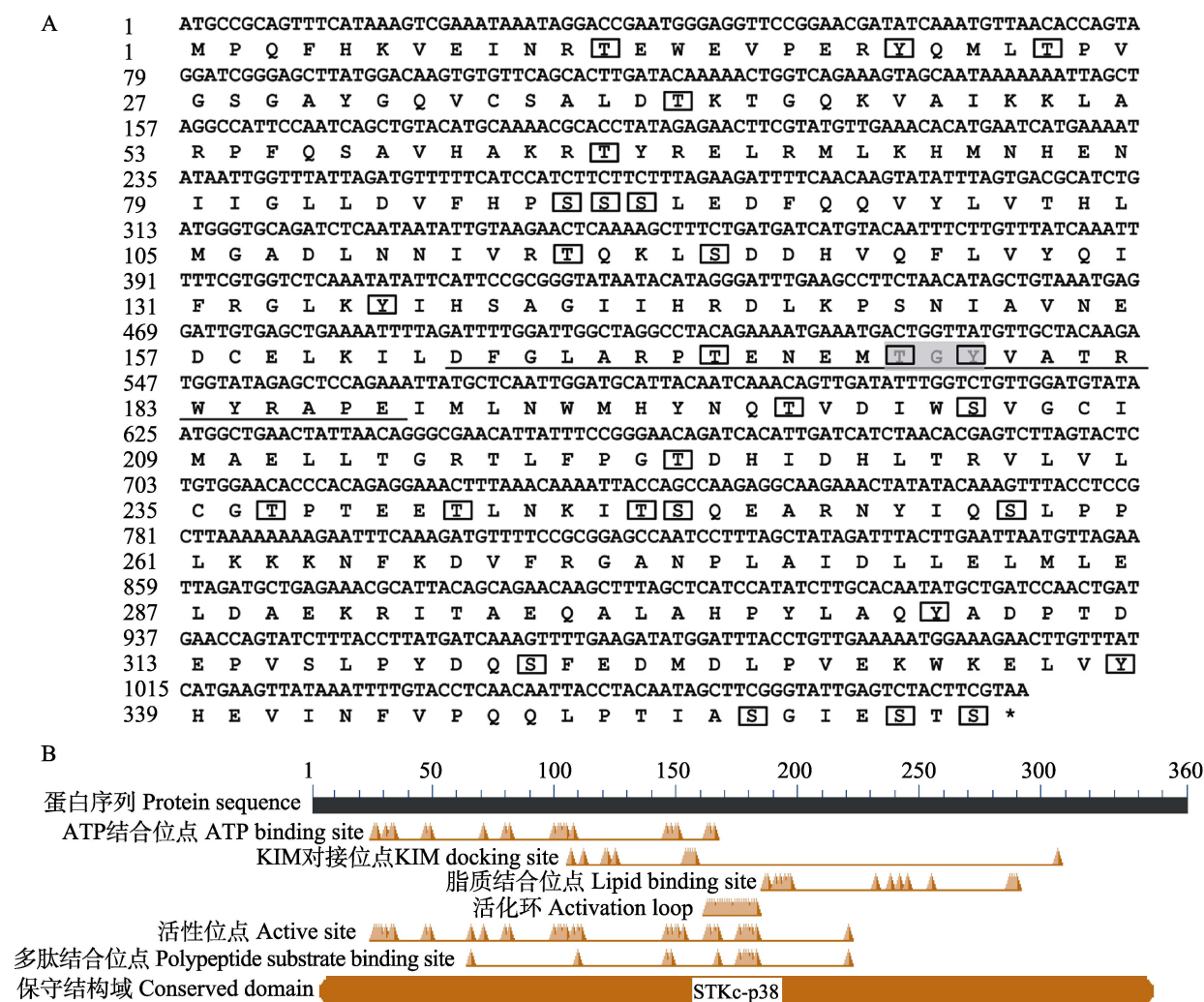
2.1 西方蜜蜂 p38 MAPK 蛋白序列分析

西方蜜蜂 *p38 MAPK* 包含 1 083 bp 的 ORF 区域, 编码 360 个氨基酸 (图 2: A)。蜜蜂 *p38 MAPK* 的预测蛋白分子量为 41.23 ku, 亮氨酸、谷氨酸、丙氨酸和苏氨酸为含量最多的 4 种氨基酸残基。该蛋白无信号肽结构, 无跨膜结构域, pI 为 5.78, 不稳定系数为 39.61, 脂溶指数为 92.89, 总平均亲水性为 -0.292。从该蛋白的氨基酸序列中可发现该蛋白第 176-178 位残基上存在一个 *p38 MAPK* 蛋白家族特有的 Thr-Gly-Tyr (TGY) 的双磷酸化三肽模块序列以及在第 164-188 位残基上存在 DFGLARPTENEMTG-YVATRWYRAPE 的磷酸化激活环区域 (图 2: A)。利用 PSIPRED 软件预测其蛋白二级结构, 结果表明蜜蜂 *p38 MAPK* 蛋白的二级结构中包括 α 螺旋 (15.28%)、 β 折叠 (37.5%) 和无规则卷曲 (47.22%), 该结果与利用 SWISS-PROT 预测的三级结构相近。利用 NetPhos 3.1 软件对该蛋白磷酸化位点预测分析结果显示 (图 2: A),

该蛋白包含 28 个磷酸化位点, 即: T¹², Y²⁰, T²⁴, T⁴⁰, T⁶⁴, S⁸⁹, S⁹⁰, S⁹¹, T¹¹⁵, S¹¹⁹, Y¹³⁶, T¹⁷¹, T¹⁷⁶, Y¹⁷⁸, T¹⁹⁹, S²⁰⁴, T²²², T²³⁷, T²⁴², T²⁴⁷, S²⁴⁸, S²⁵⁷, Y³⁰⁷, S³²², Y³³⁸, S³⁵⁴, S³⁵⁸ 和 S³⁶⁰, 其中 T²⁴ 和 T²³⁷ 为软件预测的 *p38 MAPK* 蛋白激酶发生磷酸化的特定位点。利用 NCBI 的 Conserved domains 对其保守结构域预测, 结果显示该蛋白包含多个 ATP 结合位点、脂质结合位点和多肽结合位点, 其包含一个活化环结构, 即磷酸化激活环区域。此外西方蜜蜂 *p38 MAPK* 蛋白的第 4-346 之间的氨基酸残基属于 STKc-p38 的保守结构域 (图 2: B)。

2.2 西方蜜蜂 p38 MAPK 同源性与进化树分析

经过 Blastp 比对发现, 西方蜜蜂 *p38MAPK* 与东方蜜蜂该蛋白序列的一致性最高, 为 97%。该蛋白序列与其他昆虫的同源性较高, 与膜翅目昆虫的一致性均在 90% 以上。蜜蜂的 *p38 MAPK* 具有 6 个的异构体, 其中西方蜜蜂和东方蜜蜂 *p38 MAPK* 各自包含 3 个异构体, 利用 DNAMAN 对 6 个异构体的蛋白序列进行分析 (图 3: A),

图 2 西方蜜蜂 *p38 MAPK* 序列分析结果Fig. 2 The results of bioinformatics analysis of *Apis mellifera* *p38 MAPK*

A. 西方蜜蜂 *p38 MAPK* 编码区核酸序列与氨基酸序列; B. 西方蜜蜂 *p38 MAPK* 的保守结构域预测结果。方框表示为蛋白磷酸化预测位点; 下划线表示磷酸化激活环区域; 灰色阴影表示双磷酸化三肽模块序列; *表示终止密码子。
A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Apis mellifera* *p38 MAPK*; B. Result of predicted conserved domains of *Apis mellifera* *p38 MAPK*. The predicted phosphorylation sites are shown by the boxes; the phosphorylation activating ring is underscored; the putative dual phosphorylation motif is grey shaded; the stop codon is marked by *.

发现6个蜜蜂*p38 MAPK*蛋白异构体的序列一致性为94%。经过序列比对发现,蜜蜂*p38 MAPK*异构体2与异构体1的序列长度无差异,但在第226-250位氨基酸残基的序列组成上存在差异,而异构体3与异构体1相比,缺失前68位的氨基酸残基。利用MEGA4.0软件NJ法构建基于氨基酸序列的部分昆虫*p38 MAPK*的系统进化树(图3: B),结果表明所用昆虫*p38 MAPK*序列分为2个大的分支,第一大分支为膜翅目昆虫,第二大分支为双翅目的蚊科昆虫。在第一大

分支中分为2个小分支,第1小分支为西方蜜蜂和东方蜜蜂组成的蜜蜂科昆虫,第2分支由蚊科昆虫聚类后,随后相继与切叶蜂科、叶蜂科、茧蜂科昆虫聚类后所形成。

2.3 *p38 MAPK* 在意大利蜜蜂不同组织中的 mRNA 表达模式

p38 MAPK 在意大利蜜蜂越冬工蜂不同组织中 mRNA 表达量检测结果见图4。由图4可知, *p38 MAPK* mRNA 在越冬工蜂的各组织中均有

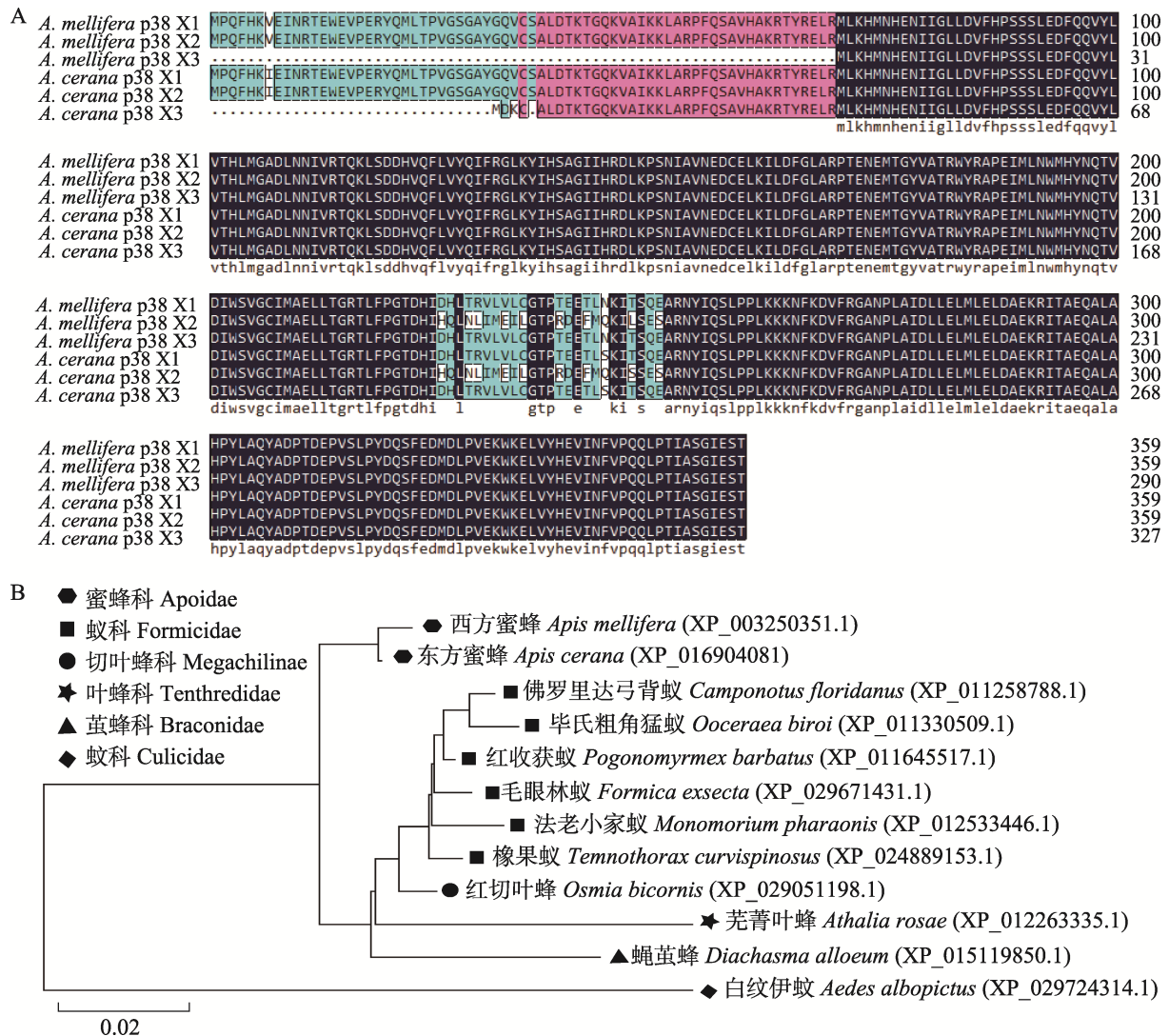


图3 同源性比对与系统进化分析

Fig. 3 Multiple sequences alignment and phylogeny evolution analysis

A. 蜜蜂 p38 MAPK 蛋白不同异构体序列比对; B. 以邻接法构建的基于氨基酸序列的昆虫 p38 MAPK 的系统发育树。

A. mellifera p38 X1-X3: 西方蜜蜂 p38 MAPK 蛋白异构体 1-3;

A. cerana p38 X1-X3: 东方蜜蜂 p38 MAPK 蛋白异构体 1-3。

A. Alignment of different isomers of p38 MAPK in honeybee; B. Phylogenetic tree of insect p38 MAPKs constructed by neighbor-joining method based on amino acid sequences. *A. mellifera* p38 X1-X3: *Apis mellifera* p38 MAPK isomer X1-X3; *A. cerana* p38 X1-X3: *Apis cerana* p38 MAPK isomer X1-X3.

表达, 且表达量存在显著差异 ($P < 0.05$), 该基因在蜜蜂胸部的表达量最高, 显著高于头、翅膀、足和腹部 ($P < 0.05$)。

2.4 p38 MAPK 在西方蜜蜂不同越冬时期的表达模式

西方蜜蜂 p38 MAPK 在不同蜂种、不同越冬

方式及不同越冬时期的表达量均存在显著差异 (图 5)。不论室外越冬还是室内越冬, 意大利蜜蜂 p38 MAPK mRNA 均表现出先上升后下降的表达趋势 (图 5: A)。室外越冬时该基因于当年 12 月的表达量最高 ($P < 0.05$), 在次年 2 月时的表达量最低; 在室内越冬时该基因在次年 1 月的表达量最高, 在当年 11 月的表达量最低。总

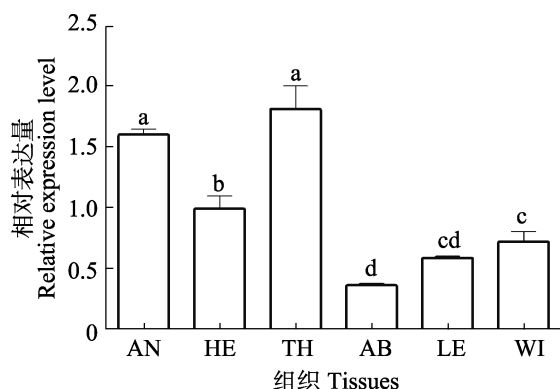


图 4 *p38 MAPK* 在意大利蜜蜂越冬工蜂不同组织中的 mRNA 表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA in different tissues of *Apis mellifera ligustica* overwinter workers

AN: 触角; HE: 头部; TH: 胸部; AB: 腹部; LE: 足; WI: 翅膀。柱上标有不同字母表示该基因在不同组织中的表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。

AN: Antennae; HE: Head; TH: Thorax; AB: Aboderm; LE: Legs; WI: Wings. Histograms with different letters indicate significant difference between different tissues at 0.05 level.

体来看, 意大利蜜蜂 *p38 MAPK* 在室外越冬下的表达量显著高于室内越冬 ($P < 0.05$)。欧洲黑蜂 *p38 MAPK* 的表达趋势与意大利蜜蜂相似 (图 5: B), 同样表现出先上升后下降的表达趋势, 其最高表达丰度分别位于室外越冬的当年 12 月和室内越冬的次年 1 月, 欧洲黑蜂该基因在室外越冬方式下的表达量显著高于室内越冬 ($P < 0.05$)。高加索蜂 *p38 MAPK* 在两种越冬方式下均表现出持续上升的表达趋势 (图 5: C), 其在当年 11 月的表达量最低 ($P < 0.05$), 在次年 2 月时的表达量最高 ($P < 0.05$), 高加索蜂 *p38 MAPK* 基因在室外越冬时的表达量显著高于室内越冬 ($P < 0.05$)。卡尼鄂拉蜂 *p38 MAPK* 的表达与上述 3 种蜜蜂表现出完全不同的变化趋势 (图 5: D), 其在室外越冬的情况下表现出先下降后上升的变化趋势, 其最高和最低的表达丰度分别位于次年的 1 月和当年的 12 月。而在室内越冬的情况下, 该基因表达量基本保持恒定 ($P > 0.05$), 与其他蜂种唯一相同的是卡尼鄂拉蜂 *p38 MAPK* 基因在室外越冬方式下的表达量显著高于室内越冬 ($P < 0.05$)。

2.5 *p38 MAPK* 在不同蜂种室外越冬时表达丰度的比较

不同西方蜜蜂室外越冬时 *p38 MAPK* mRNA 的检测结果见图 6。由图 6 可知, 除 2019 年 1 月外, 不同蜂种在各越冬时期体内 *p38 MAPK* mRNA 的表达量均存在显著差异 ($P < 0.05$)。在 2018 年 11 月越冬的起始阶段, 意大利蜜蜂、卡尼鄂拉蜂和欧洲黑蜂间 *p38 MAPK* 的表达无显著差异 ($P > 0.05$), 且高于高加索蜂。但到 2018 年 12 月时, 4 个蜂种间 *p38 MAPK* 的表达由高到低依次为意大利蜜蜂 > 欧洲黑蜂 > 高加索蜂和卡尼鄂拉蜂 ($P < 0.05$)。在 2019 年 1 月时, 4 个蜂种间该基因的表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。但在越冬后期 2019 年 2 月时, *p38 MAPK* 的表达量在不同蜂种间出现显著差异, 表现为高加索蜂和卡尼鄂拉蜂 > 欧洲黑蜂和意大利蜜蜂 ($P < 0.05$)。

3 讨论

p38 MAPK 蛋白家族作为 MAPK 家族的重要成员, 在介导细胞消除炎症和应激等一系列生命活动中发挥着重要的作用 (Zhang and Storey, 2017)。迄今为止, *p38 MAPK* 已在哺乳动物、鱼类、昆虫、植物、真菌和细菌中得以发现与鉴定。*p38 MAPK* 具有很高的保守性, 已有的研究表明, *p38 MAPK* 一般包含 360 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 41 ku 左右, 该蛋白具有明显的蛋白结构特征, 如 *p38 MAPK* 亚族成员共有的“TGY”双位点磷酸化三肽模块, 且该三肽模块所处的特定序列属于磷酸化激活环结构——“T 环”三级结构, 该结构与 MAPK 激酶的活性密切相关, 在调控蛋白激酶激活或失活的过程中发挥着重要的作用 (姜勇和韩家淮, 1999)。本研究中发现西方蜜蜂 *p38 MAPK* 蛋白包含 360 个氨基酸, 预测蛋白分子量为 41 ku, 含有“TGY”双磷酸化三肽序列和该模块所在的磷酸化激活环结构, 符合 *p38 MAPK* 的蛋白结构特征, 与在凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (Yan et al., 2013)、香港牡蛎 *Crassostrea hongkongensis*

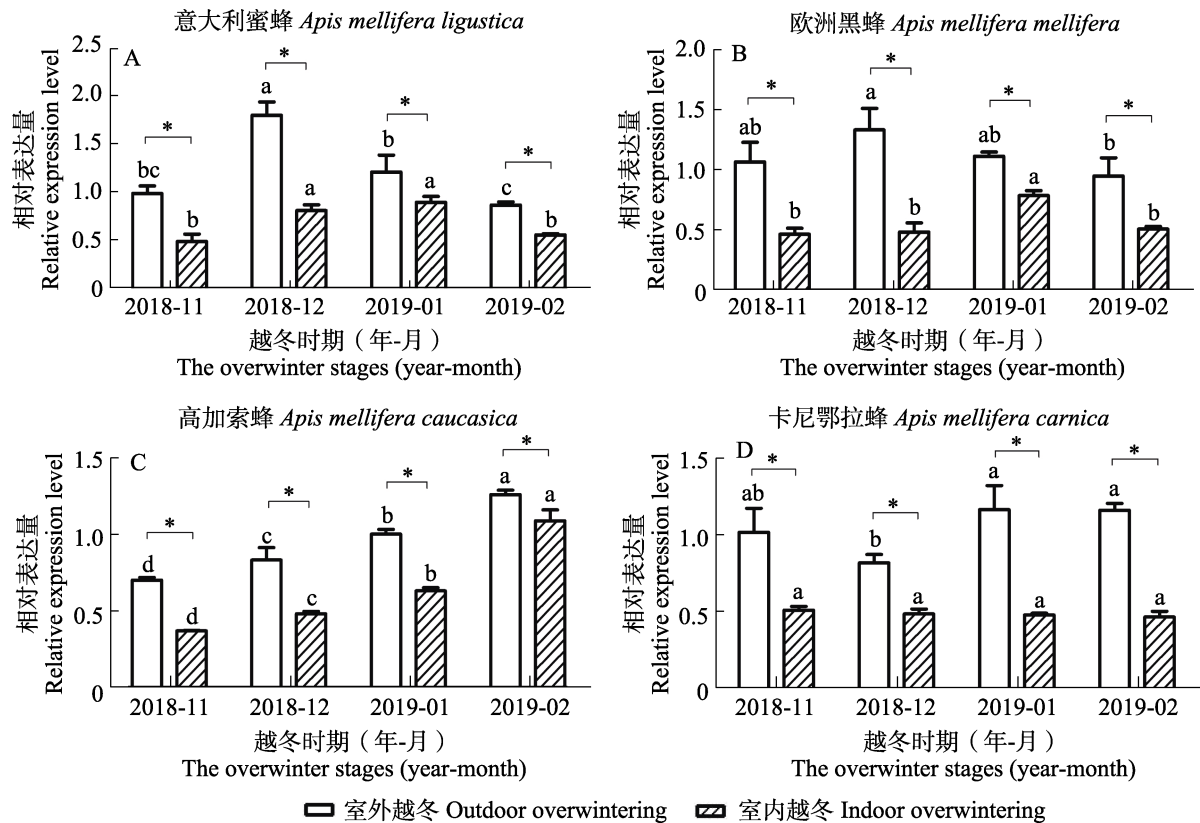


图 5 *p38 MAPK* 在不同蜂种、不同越冬方式及不同越冬时期的相对表达量
Fig. 5 Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA at different overwinter stages, overwinter strategies and species of *Apis mellifera*

A. *p38 MAPK* 在意大利蜜蜂不同越冬时期的表达量; B. *p38 MAPK* 在欧洲黑蜂不同越冬时期的表达量; C. *p38 MAPK* 在高加索蜂不同越冬时期的表达量; D. *p38 MAPK* 在卡尼鄂拉蜂不同越冬时期的表达量。柱上标有不同字母表示该基因在同一越冬方式下不同越冬时期的表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。*表示该基因在同一越冬时期不同越冬形式下的表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。

A. Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA at different overwinter stages of *Apis mellifera ligustica*; B. Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA at different overwinter stages of *Apis mellifera mellifera*; C. Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA at different overwinter stages of *Apis mellifera caucasica*; D. Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA at different overwinter stages of *Apis mellifera carnica*. Histograms with different letters indicate significant difference between different overwinter stages in the same overwinter strategy at 0.05 level. * indicates significant difference between different overwinter strategies at the same overwinter stages at 0.05 level.

(Qu *et al.*, 2016)、果蝇 *Drosophila* (Han *et al.*, 1998)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (胡霞等, 2013)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (刘小飞, 2019) 的研究结果相一致。同源性比对与系统进化分析结果表明该蛋白序列与膜翅目昆虫 *p38 MAPK* 的序列一致性高于 90%, 具有高度的保守性, 表明 *p38 MAPK* 在不同的昆虫中具有相对保守的进化关系。

本研究利用荧光定量 PCR 技术检测西方蜜蜂 *p38 MAPK* 在蜜蜂不同组织中的表达情况, 结

果表明 *p38 MAPK* 在蜜蜂各种组织中均有表达, 而且表现出明显的组织差异 ($P < 0.05$)。该结果与其他昆虫 *p38 MAPK* 组织表达分析结果相一致 (刘小飞, 2019)。该基因在蜜蜂的胸部和头部的表达量较高, 在腹部中的表达量最低, 该结果可能与西方蜜蜂越冬时各组织温度存在差异密切相关。一般情况下, 蜜蜂胸部的温度较高, 而且对外界温度变化较为敏感 (Tosi *et al.*, 2016)。尤其在越冬时期, 蜜蜂胸部和头部的温度要高于腹部, 根据越冬蜂团所处的不同位置,

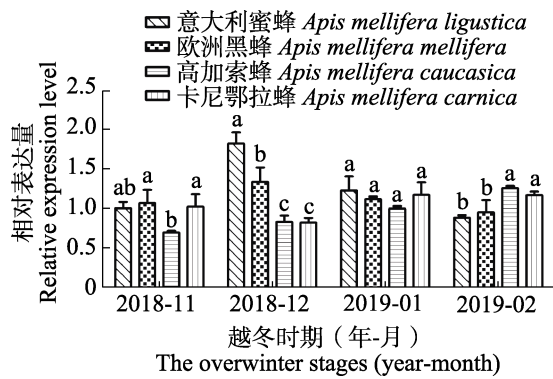


图 6 室外越冬时不同蜂种 *p38 MAPK* mRNA 表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *p38 MAPK* mRNA of different species with outdoor overwintering strategies

柱上标有不同字母表示该基因在同一越冬时期不同蜂种间的表达存在显著差异 ($P < 0.05$)。

Histograms with different letters indicate significant difference between different species at the same overwinter stages at 0.05 level.

从蜂团中央区域到蜂团外表层,越冬蜂个体胸部的温度比腹部温度要高出 1.4-2.5 °C,头部的温度比腹部要高出 0.1-3.0 °C (Stabentheiner *et al.*, 2003)。本研究中 *p38 MAPK* 在胸部、头部和腹部间表达量的差异与越冬时期蜜蜂个体各组织温度的差异基本一致,表明 *p38 MAPK* 基因的表达与蜜蜂越冬期对低温的敏感性以及体内能量发生与转化显著相关 (Bordicchia *et al.*, 2012)。

低温是影响昆虫的生长发育、繁殖周期及地理分布的重要环境因素 (陈琳等, 2016)。*p38 MAPK* 基因以及该信号通路在昆虫应对快速低温驯化和低温下滞育的起始与终止中发挥着重要的作用 (Fujiwara *et al.*, 2006; Fujiwara and Shiomi, 2006; Fujiwara and Denlinger, 2007)。本研究结果表明 *p38 MAPK* 基因在 4 个蜂种不同越冬时期的表达均存在显著的差异。*p38 MAPK* 在卡尼鄂拉蜂体内的表达量与其他 3 个蜂种存在较大的差异,该基因在室内越冬的情况下保持恒定,在室外越冬方式下与外界环境的变化趋势基本一致,推测可能是由于卡尼鄂拉蜂 *p38 MAPK* 的表达与该蜂种在不同温度下生理活性相关,受低温诱导的影响较小,也有可能卡尼鄂拉蜂越冬期体内抗寒物质的种类与沉积量密切相关。在意大利蜜蜂和欧洲黑蜂中,无论室外

越冬还是室内越冬,随着越冬期的延长, *p38 MAPK* mRNA 的表达均表现出先升高后下降的趋势,表明意大利蜜蜂和欧洲黑蜂体内 *p38 MAPK* 的表达受低温环境的诱导,而且该基因表达与环境温度的降幅呈正相关。高加索蜂在两种越冬方式下体内 *p38 MAPK* 的表达随着越冬的进行均呈现持续增强的趋势,表明高加索蜂体内 *p38 MAPK* 的表达也受低温环境的诱导,但其随着越冬后期环境温度的回升并未下降可能由于该基因表达的积累有助于缓解长期低温对机体所造成的伤害 (欧阳芳和戈峰, 2014)。以上 3 个蜂种体内 *p38 MAPK* 的表达均表明该基因的表达受环境的诱导,这与果蝇 *Sarcophaga crassipalpis* (Fujiwara and Denlinger, 2007) 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 中的研究结果一致 (黄璜, 2015)。4 个蜂种室外越冬方式下蜜蜂体内 *p38 MAPK* 的表达量显著高于室内越冬,表明西方蜜蜂 *p38 MAPK* 受低温诱导,且表达量的高低与承受低温的程度显著相关。本课题组前期的研究发现意大利蜜蜂在低温处理下体内葡萄糖和甘油含量发生显著变化 (徐凯等, 2018),因此推测在越冬期间, *p38 MAPK* 通过调节西方蜜蜂体内糖类物质磷酸化和甘油合成来增强蜜蜂自身的耐寒性 (Fujiwara and Denlinger, 2007)。

西方蜜蜂拥有多个亚种,而且不同亚种间由于遗传物质、所处环境外界气温、蜜粉源等差异,造就不同亚种抗寒力、抗病性以及采集力的显著差异 (胥保华, 2000)。已有研究表明不同西方蜜蜂间抗寒性存在一定差异,如意大利蜜蜂在越冬期损失率明显高于高加索蜂和卡尼鄂拉蜂,同时其越冬饲料的消耗量明显高于高加索蜂和卡尼鄂拉蜂 (薛运波等, 2003)。卡尼鄂拉蜂越冬期后期的 SOD 活性和过冷却点均高于意大利蜜蜂 (常志光等, 2015)。本研究通过比较不同蜂种在室外越冬方式下 *p38 MAPK* 的表达量发现,除在 1 月外,其余越冬时期不同蜂种体内该基因的表达量存在显著差异。本研究结果支持了上述关于不同蜂种抗寒性不同的差异的观点,但也提出西方蜜蜂不同越冬时期的抗寒力可能存在显著差异的假设,其还需进一步的试验进行验证。

参考文献 (References)

- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S, 2012. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3): 1022–1036.
- Brown P, Newstrom-Lloyd LE, Foster BJ, Badger PH, McLean JA, 2018. Winter 2016 honey bee colony losses in New Zealand. *Journal of Apicultural Research*, 57(2): 278–291.
- Chang ZG, Niu QS, Yan DB, Wang Z, Wang HQ, 2015. Study on the correlation between the total SOD activity of haemolymph and cold resistance of different honeybee species in late overwinter stages. *Apiculture of China*, 66(3): 16–18. [常志光, 牛庆生, 闫德斌, 王志, 王海全, 2015. 不同蜜蜂品种越冬后期血淋巴总 SOD 活力与抗寒力的相关性研究. *中国蜂业*, 66(3): 16–18.]
- Chen C, Liu Z, Pan Q, Chen X, Wang H, Guo H, Liu S, Lu H, Tian S, Li R, Shi W, 2016. Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinixinyuan* n. ssp. *Molecular Biology & Evolution*, 33(5): 1337–1348.
- Chen L, Xu XJ, Wang Q, Zhu XJ, Hao ZB, Zhou SJ, Zhou BF, 2016. Effects of low temperature on unfertilized honeybee (*Apis mellifera ligustica*) eggs. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(3): 574–580. [陈琳, 徐新建, 王青, 朱翔杰, 郝振帮, 周妹婧, 周冰峰, 2016. 低温 20 °C 对意大利蜜蜂未受精卵发育的影响. *应用昆虫学报*, 53(3): 574–580.]
- Craig CR, Fink JL, Yagi Y, Ip YT, Cagan RL, 2004. A drosophila p38 orthologue is required for environmental stress responses. *EMBO Reports*, 5(11): 1058–1063.
- Döke MA, Frazier M, Grozinger CM, 2015. Overwintering honey bees: Biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10: 185–193.
- Fujiwara Y, Denlinger DL, 2007. p38 MAPK is a likely component of the signal transduction pathway triggering rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Experimental Biology*, 210(Pt 18): 3295–3300.
- Fujiwara Y, Shindome C, Takeda M, Shiomi K, 2006. The roles of ERK and P38 MAPK signaling cascades on embryonic diapause initiation and termination of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1): 47–53.
- Fujiwara Y, Shiomi K, 2006. Distinct effects of different temperatures on diapause termination, yolk morphology and MAPK phosphorylation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 52(11/12): 1194–1201.
- Gaitanaki C, Kefaloyianni E, Marmari A, Beis I, 2014. Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260(1/2): 119–127.
- Han ZS, Enslen H, Hu X, Meng X, Wu IH, Barrett T, Davis RJ, Ip YT, 1998. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Molecular & Cellular Biology*, 18(6): 3527–3539.
- Hu X, Gu SX, Liu XL, Bai YC, Xu Wh, Liu BM, Xu XJ, 2013. Cloning and bioinformatics analysis of p38 MAPK gene from *Plutella xylostella*. *Shandong Agriculture Science*, 45(8): 15–18. [胡霞, 谷希树, 刘晓琳, 白义川, 徐维红, 刘佰明, 许静杨, 2013. 小菜蛾 p38 MAPK 基因的克隆与生物信息学分析. *山东农业科学*, 45(8): 15–18.]
- Huang H, 2015. Roles of MAPK signaling pathway in whitefly defense against environmental stresses. Master's degree dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [黄璜, 2015. MAPK 信号通路在 MED 烟粉虱应对外界环境压力时的作用. 硕士研究生学位论文. 杭州: 浙江大学.]
- Jiang Y, Han JH, 1999. p38 MAPK signal transduction pathway. *Chinese Bulletin of Life Science*, 11(3): 102–106. [姜勇, 韩家淮, 1999. p38MAPK 信号传导通路. *生命科学*, 11(3): 102–106.]
- Kulhanek K, Steinhauer N, Rennich K, Caron DM, Sagili RR, Pettis JS, Ellis JD, Wilson ME, Wilkes JT, Tarpay DR, Rose R, Lee K, Rangel J, VanEngelsdorp D, 2017. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4): 328–340.
- Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpay DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, Skinner JA, Wilkes JT, Sagili R, vanEngelsdorp D, 2015. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46: 292–305.
- Li FF, Xia J, Li JM, Liu SS, Wang XW, 2012. p38 MAPK is a component of the signal transduction pathway triggering cold stress response in the med cryptic species of *Bemisia tabaci*. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 303–311.
- Liang YJ, Yang WX, 2019. Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway. *Gene*, 684: 1–9.
- Liu XF, 2019. Cloning of JNK and p38 MAPK genes of *Helicoverpa armigera* and their roles in response to UV-A stress. Master dissertation. Guiyang: Guizhou University. [刘小飞, 2019. 棉铃虫 JNK 和 p38 MAPK 基因的克隆及在响应 UV-A 胁迫机制中的作用研究. 硕士研究生学位论文. 贵阳: 贵州大学.]
- Ouyang F, Ge F, 2014. Methodology of measuring and analyzing insect cold hardiness. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1646–1652. [欧阳芳, 戈峰, 2014. 昆虫抗冻耐寒能力的测定与分析方法. *应用昆虫学报*, 51(6): 1646–1652.]

- Qu F, Xiang Z, Zhang Y, Li J, Xiao S, Zhang Y, Mao F, Ma H, Yu Z, 2016. A novel *p38 MAPK* indentified from *Crassostrea hongkongensis* and its involvement in host response to immune challenges. *Molecular Immunology*, 79: 113–124.
- Stabentheiner A, Pressl H, Papst T, Hrassnigg N, Crailsheim K, 2003. Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 2): 353–358.
- Tosi S, Démares FJ, Nicolson SW, Medrzycki P, Pirk CW, Human H, 2016. Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology*, 93/94: 56–63.
- Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, Simões ZL, Allsopp MH, Kandemir I, De la Rúa P, Pirk CW, Webster MT, 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46(10): 1081–1088.
- Xu BH, 2000. The classification, geographical distribution, morphological characteristics and biological characteristics of honeybee species. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 31(3): 265–268. [胥保华, 2000. 蜜蜂属内蜂种的分类、地理分布、形态特征和生物学特性. 山东农业大学学报(自然科学版), 31(3): 265–268.]
- Xu K, Niu QS, Liu YL, Chen DH, Du YL, Guo LN, Zhao HT, Jiang YS, 2018. Effects of temperature on major physiological indicators of cold tolerance in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(5): 889–895. [徐凯, 牛庆生, 刘玉玲, 陈东海, 杜亚丽, 郭丽娜, 赵慧婷, 姜玉锁, 2018. 温度对中华蜜蜂和意大利蜜蜂个体主要抗寒生理指标的影响. 应用昆虫学报, 55(5): 889–895.]
- Xue YB, Ge FC, Bai JM, 2003. Test report on overwintering performance of different honeybees. *Apiculture of China*, 54(6): 4–5. [薛运波, 葛凤晨, 柏建民, 2003. 不同品种蜜蜂越冬性能测试报告. 中国蜂业, 54(6): 4–5.]
- Yan H, Zhang S, Li CZ, Chen YH, Chen YG, Weng SP, He JG, 2013. Molecular characterization and function of a *p38 MAPK* gene from *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6): 1421–1431.
- Zhang J, Storey KB, 2017. Insect cold hardiness: The role of mitogen-activated protein kinase and Akt signalling in freeze avoiding larvae of the goldenrod gall moth, *Epiblema scudderiana*. *Insect Molecular Biology*, 26(2): 181–189.