应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(2): 331–339. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2016.044

研究论文

蓝莓花青素有效缓解种群拥挤对果蝇的胁迫*

张紫燕[1,2**] 唐 超[1,2] 黄晓梅[1,2] 杨传俊[1] 蔡 澎[1***]

（1. 中国科学院城市环境研究所，厦门 361021；2. 中国科学院大学，北京 100049）

摘 要 **【目的】** 明确拥挤胁迫对果蝇生长发育的影响，并探讨蓝莓花青素（Blueberry anthocyanins，BAC）对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 拥挤损伤的保护作用。**【方法】** 研究不同培养密度，BAC 浓度及两者协同处理对果蝇生长发育、胁迫应激和氧化应激的影响。**【结果】** 通过观察生长在低、中、高密度下的果蝇发现，随着培养密度的升高，果蝇的蛹历期延长，体重和雌雄比显著下降，*HSP70* 的表达水平显著上升及 MDA 显著下降。BAC 处理显著增加果蝇蛹的数量，缩短蛹历期，降低果蝇 *HSP70* 的表达和 MDA 含量。在高密度组果蝇培养基中添加维生素 C（Vitamin C, VC）和 BAC 后，拥挤胁迫仍为主要影响因素，除了 VC 显著缓解果蝇雌雄比失衡外，两种药物对果蝇体重和蛹历期的恢复均无显著效应。但 VC 和 BAC 处理显著降低果蝇 *HSP70* 的表达水平和 MDA 含量，VC 处理显著提高 CAT 和 SOD 酶活性，而 BAC 对酶活性的影响小。雌蝇对拥挤胁迫更敏感，因此，高密度下 VC 和 BAC 对雌蝇的影响比雄蝇大。**【结论】** 拥挤胁迫导致果蝇发育延缓，体重下降，雌雄比失衡，这与其激发果蝇的应激反应和氧化损伤相关，VC 和 BAC 能够降低拥挤胁迫诱导的应激反应，减少氧化损伤。

关键词 果蝇，拥挤胁迫，蓝莓花青素，*HSP70*，氧化应激

Blueberry anthocyanins effectively relieve the stress of population crowding in *Drosophila melanogaster*

ZHANG Zi -Yan[1,2**] TANG Chao[1,2] HUANG Xiao-Mei[1,2] YANG Chuan-Jun[1] CAI Peng[1***]

(1. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the effects of high population density on the development of *Drosophila melanogaster* Meigen and the potential for blueberry anthocyanins (BAC) and vitamin C (VC) to reduce density-associated stress. **[Methods]** The effects on development, stress response, and oxidative stress, of flies at high population density, with and without BAC or VC, was studied. **[Results]** Results show that the duration of the pupal stage increased, body weight and female-male ratio decreased, *HSP70* expressional increased, and MDA levels declined, with increasing density. BAC significantly increased the number of pupae, shortened the duration of the pupal stage, and reduced *HSP70* expression and MDA levels. Neither VC nor BAC had any significant effects on body weight or pupal duration, however, treatment with VC balanced the female-male ratio. *HSP70* expression and MDA significantly decreased following VC and BAC treatment, whereas CAT and SOD activity were significantly increased by VC treatment, but only slightly affected by BAC treatment. Female flies were more sensitive to density and VC and BAC had a more beneficial effect on female than male flies under high population density. **[Conclusion]** High population density prolonged the pupal stage, reduced body weight and decreased the ratio of females to males in the population. These effects are likely to be related to the inducement of the stress response and oxidative damage. However, VC and BAC can reduce the negative effects of crowding by reducing the stress response and oxidative damage.

* 资助项目 Supported projects：中国科学院科研装备研制项目（YZ201104）

**第一作者 First author，E-mail：zyzhang@iue.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：pcai@iue.ac.cn

收稿日期 Received：2015-05-28，接受日期 Accepted：2015-08-20

Key words *Drosophila melanogaster*, crowding stress, blueberry anthocyanins, *HSP70*, oxidative stress

种群密度是影响生物生长发育最重要的因素之一，由于种群密度过大导致的拥挤胁迫问题在昆虫及畜牧业的集约化养殖过程中普遍存在。大量研究表明拥挤胁迫作为一个环境压力因子，会对动物体的内分泌、行为、生长发育及免疫力造成影响（Basrur *et al.*，2010；Wang *et al.*，2013；Khafipour *et al.*，2014），如拥挤胁迫会降低鱼类的生长速度和抗病能力，造成减产等（Yu，2008）。对于完全变态发育的昆虫种类，拥挤胁迫对其生长发育的影响尤为显著，研究发现幼虫时期的种群密度会对幼虫的发育速度、死亡率及成虫的体型、寿命、繁殖能力等产生影响（Kong *et al.*，2012；Yan *et al.*，2014）。这些主要与拥挤胁迫引发生物体应激反应能力、抗氧化能力和耐受能力的改变相关（Yu，2008；Kong *et al.*，2012）。因此，充分了解拥挤胁迫产生危害的机制，降低拥挤损伤具有重要的现实意义。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 是一种完全变态发育的昆虫，其对养殖时的种群密度尤为敏感，如果蝇幼虫受拥挤胁迫后，会导致其发育变缓，成活率下降，成蝇体积减小、繁殖力下降及睡眠变差等（Lazebnyi *et al.*，1996；Baldal *et al.*，2005；Chi *et al.*，2014），这些症状与其他动物的表现类似。因此，本文以果蝇为模式生物研究拥挤胁迫对生物体的影响并初步了解其损伤机制。

已有研究表明，在诱导拥挤损伤的多种途径中，氧化应激是其主要作用途径之一。因此，通过调节生物体的氧化应激水平能够有效缓解拥挤造成的损伤（Ming *et al.*，2011；Liu *et al.*，2014）。蓝莓花青素（Blueberry anthocyanins，BAC）是蓝莓提取物中含量最高、抗氧化能力最强的一种，具有抗氧化、抗肿瘤、保护心血管、提高免疫力、缓解视疲劳、延缓衰老等多重功效，在食品、医药及食物添加剂等方面得到广泛应用（Li *et al.*，2013；Yousuf *et al.*，2015）。它一方面能够直接与自由基分子反应，减少或者清除自由基，另一方面，能够促进和激活 SOD、CAT 等抗氧化酶活性，增强机体的抗氧化能力（Gao *et al.*，2013；Ramirez *et al.*，2015）。因此，本文利用模式动物果蝇研究拥挤胁迫和 BAC 单独及协同处理对果蝇生长发育的影响，并以 *HSP70* 的表达量作为衡量果蝇应激反应的指标，以 SOD 和 CAT 酶的活性及 MDA 的含量作为衡量果蝇氧化应激的指标，明确拥挤胁迫对果蝇生长发育的影响，并探讨 BAC 在缓解拥挤损伤方面的功效。

1 材料与方法

1.1 果蝇株系及培养

实验采用野生型黑腹果蝇 *D. melanogaster* Meigen Canton-S 品系；基本培养基为玉米粉-糖-酵母（CSY）。培养所用的平底试管规格为：2.5 mm×95 mm，为确保拥挤胁迫处理果蝇拥有足够的食物，培养基的高度大约 20 mm；培养于温度（25±0.5）℃，相对湿度 60%±1%，光周期 12L∶12D 的人工气候箱中。

1.2 拥挤胁迫对果蝇的影响

取 8 h 内羽化的果蝇，分别接种 5、15、40 对果蝇于培养基中，每组 11 管平行，产卵 3 d 后去除亲本，形成低、中、高 3 种幼虫密度，置于人工气候箱中培养。从第一个蛹出现开始每天统计每管新蛹的数量，直至不再变化，果蝇的拥挤度以每管结蛹的总数作为统计参考指标，低密度管中蛹的总数量平均约 100 个/管，中密度约 200 个/管，高密度约 300 个/管，蛹的平均发育天数即为蛹历期，用以作为评价幼虫发育速度的指标。待果蝇羽化后，每天统计新生果蝇的雌雄数量，并分别称量体重。

1.3 BAC 对果蝇的影响

在基本培养基中分别添加入 0.01、0.05、0.1、0.3 g/100 mL 的蓝莓花青素提取物（BAC 含量 25%，购于大兴安岭林格贝有机食品有限公司），每组接种 5 对未交配的雌雄蝇，产卵 3 d 后去亲本，每组处理 10 管，管中果蝇为 F_1 代。各处理组的 F_1 代果蝇用同样方法再接种到含相同浓度

花青素的培养基上培养得到 F_2 代果蝇。分别统计 F_1 代和 F_2 代果蝇蛹的数量、蛹历期、雌雄比及重量。

1.4　BAC 对拥挤胁迫果蝇的影响

以基本培养基为对照组（C 组），添加 0.1 g/100 mL 的 BAC（BAC 组）和 25 mg/100 mL 的维生素 C（VC 组，阳性对照组）的为药物组，根据前面拥挤实验的结果，分别接种 5 对和 40 对果蝇形成低密度组和高密度组（拥挤胁迫组），用 1.2 的方法统计每管果蝇蛹的数量、蛹历期、成虫的体重、雌雄比，并分别取 8 h 内羽化的雌雄果蝇于 1.5 mL 的 EP 管中，液氮速冻后冻存于－80℃冰箱中，用于荧光定量 PCR（雌雄果蝇各 10 只）和氧化应激指标（雌雄果蝇各 20 只）的检测分析。

1.5　荧光定量 PCR 检测分析 *HSP70* 的表达水平

利用 TRIzol（Invitrogen）法提取待测样品的总 RNA，利用超微量紫外分光光度计（F-4600）检测 RNA 的浓度，根据 PrimeScript® RT Master Mix（Perfect Real Time）试剂盒（TaKaRa）的步骤和反应条件将 RNA 反转录成 cDNA，所得 cDNA 用超纯水稀释 15 倍后作为 RT-PCR 的模板，根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）的步骤和反应条件进行相对定量检测（TaKaRa），RT-PCR 的扩增程序中 TM 值为 60℃，40 个循环（LightCycler480II）。RT-PCR 反应均以 *RP49* 作为内参基因，结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法进行计算分析。检测所用引物序列见表 1。

1.6　SOD、CAT 活性及 MDA 含量检测

用于氧化应激分析的样品加入 500 μL、0.75%的 NaCl 溶液制成匀浆，4℃，2 500 g 离心 10 min，取上清用于后续分析。分别利用南京建成的蛋白定量测试盒（考马斯亮蓝法）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）测试盒、过氧化氢（Catalase，CAT）测定试剂盒及丙二醛（MDA）测试盒测定果蝇体内 SOD 和 CAT 的活性及 MDA 的含量，并根据说明书的计算方法分别进行统计分析。

表 1　RT-PCR 扩增引物序列
Table 1　Primers for real-time PCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence
Hsp70 Forward	GAACTCACACACAATGCCTGC
Hsp70 Reverse	TCCGAGTCTGTGAAAGCCA
RP49 Forward	AGCATACAGGCCCAAGATCG
RP49 Reverse	GTTGTCGATACCCTTGGGCT

1.7　数据分析

数据均采用 Mean±SD 表示，对于单因素影响的利用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析中的两两比较进行分析，对于多因素单变量的结果利用一般线性模型中的单变量模型分析各因素间的交互作用，并利用 LSD 多重比较分析组间差异。统计分析的差异结果采用字母法表示，含有相同小/大写字母的组间差异不显著，含有完全不同小/大写字母的组间差异显著（小写字母：$P<0.05$；大写字母：$P<0.01$）。

2　结果与分析

2.1　拥挤胁迫对果蝇生长发育的影响

观察不同培养密度对果蝇结蛹的影响发现，随着密度的提高，管中幼虫开始结蛹的时间和结蛹高峰期都推迟，统计结果显示蛹历期随着密度的上升延长，高密度组比低密度组延长了 189.46%，达极显著水平，说明拥挤胁迫延缓果蝇幼虫的发育（图 1：A）。羽化后成蝇的体积变小，体重也随着拥挤度的增加下降，高密度组雌雄果蝇的体重比低密度组分别下降了 28.72%和 20.24%（图 1：B），两者都达到了极显著水平（$P<0.01$）；果蝇体重还受果蝇性别的影响，雌性果蝇体重显著高于雄性果蝇，但拥挤胁迫和性别两者不存在相互影响（$F=1.69$，$P>0.05$）。进一步统计成虫中雌雄个体数量时发现，果蝇的雌雄比随着密度的上升下降，高密度组与低密度组相比达极显著水平（$P<0.01$，图 1：C），这说明雌性果蝇受拥挤胁迫的影响大于雄蝇。

2.2　BAC 对果蝇生长发育的影响

在果蝇培养基中添加不同浓度 BAC，当浓

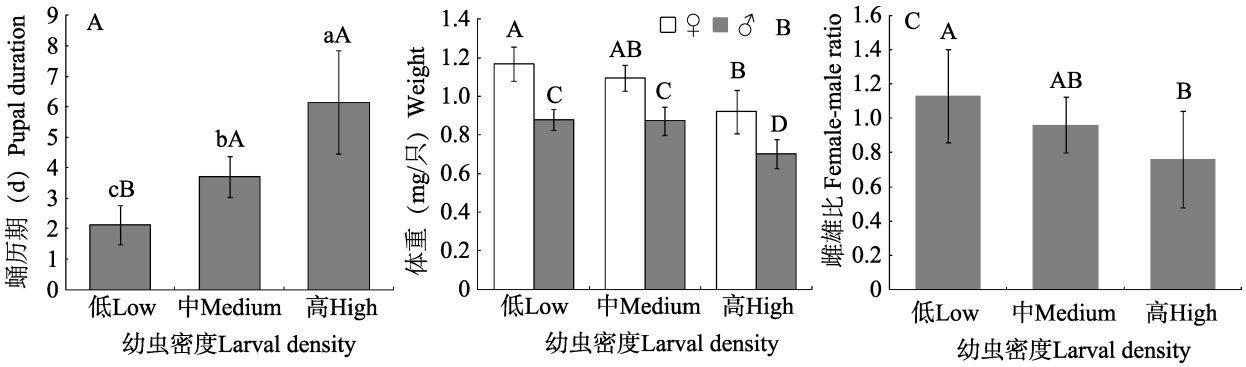

图 1　拥挤胁迫对果蝇生长发育的影响

Fig. 1　Effects of crowding stress on growth and development of flies

A: 蛹历期；B: 体重；C: 雌雄比。

A: Pupal duration; B: Weight; C: Female-male ratio.

柱上标有不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著，不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。下图同。

Histograms with different small letters indicate signicantly different at 0.05 level; while with different capital letters indicate signicantly different at 0.01 level. The same below.

度达 0.10 和 0.30 g/100mL 时，F_1 代每管果蝇蛹的数量比对照组（0.00 组）分别增加了 18.98% 和 17.11%，两者均达显著水平（P<0.01），与低浓度组（0.01 和 0.05 g/100 mL）相比也显著增多（图 2：A）。这可能由于 BAC 处理有效改善果蝇机体的状况，增加果蝇幼虫的存活率。F_2 代各处理浓度中每管果蝇蛹的数量与对照组比都极显著增多（P<0.01），处理组间差异不显著，0.05 g/ 100 mL 组的增幅最大达 25.71%（图 2：B）。F_2 代的实验结果说明花青素可能还增强了 F_1 代果蝇的繁殖能力。BAC 处理对 F_1 和 F_2 代果蝇蛹历期的影响都表现为低浓度组（0.01 g/100 mL）有一定的抑制作用，随着处理浓度的升高蛹历期缩短（图 2：C，D），在 F_2 代中除了 0.01 g/ 100 mL 组蛹历期显著延长外，其他处理组都显著缩短（图 2：D）。此外，本研究还统计了 BAC 对果蝇雌雄比和体重的影响，均无明显变化。综合以上结果表明，BAC 能够有效改善果蝇的机体状态，且与处理浓度存在明显的量效关系，当处理浓度达 0.10 g/100 mL 后各种效应基本处于稳定状态，因此，我们选取 0.10 g/100 mL 的 BAC 浓度开展后续研究。

2.3　BAC 对拥挤胁迫果蝇生长发育的影响

在低密度和高密度组果蝇培养基中添加 VC 和 BAC 后，与对照组相似，VC 和 BAC 组果蝇蛹历期（F=37.95，P<0.01）和体重（F=122.41，P<0.01）受拥挤胁迫的显著影响，各处理中高密度组的蛹历期都比低密度显著延长（图 3：A），雌雄果蝇的体重也都显著下降（图 3：B），不受药物处理的影响。雌雄比方面，药物和拥挤处理间存在显著的相互作用（F=5.19，P<0.01），VC 组的雌雄比不受密度的影响，而对照和 BAC 组的雌雄比都随着培养密度的升高显著下降（图 3：C）。因此，VC 和 BAC 在缓解拥挤胁迫导致的发育延缓和体重下降方面无显著效果，VC 在一定程度上缓解了拥挤胁迫导致的雌雄比失衡。

2.4　BAC 对拥挤胁迫果蝇 *HPS70* 表达和氧化应激指标的影响

从表 2 可以看出，性别、拥挤及药物处理三因素间的相互作用对果蝇 *HSP70* 的表达水平（F=67.97，P＜0.01）、MDA 含量（F=8.31，P＜0.01）、SOD（F=6.12，P＜0.01）和 CAT（F=18.33，P＜0.01）活性产生了显著的影响。

各处理高密度组与低密度比较结果显示：各处理组的雌蝇和 VC 组的雄蝇 *HSP70* 的表达水平显著上升，而对照组和 BAC 组的雄蝇不受影响。对照组雌雄果蝇 MDA 的含量和 SOD 的活性及雌蝇 CAT 的活性都显著下降，雄蝇 CAT 的

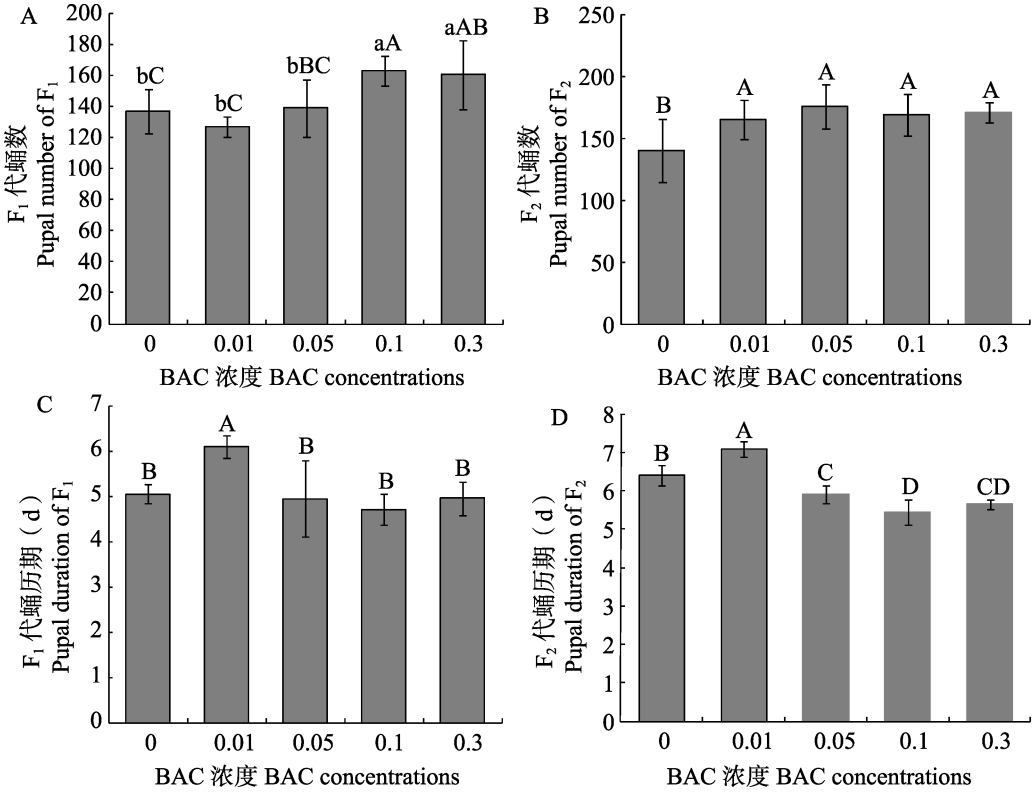

图 2　蓝莓花青素对果蝇生长发育的影响

Fig. 2　Effects of BAC on growth and development of flies

A：F_1 代蛹数量；B：F_2 代蛹数量；C：F_1 代蛹历期；D：F_2 代蛹历期。

A: The pupal number of F_1; B: The pupal number of F_2; C: The pupal duration of F_1; D: The pupal duration of F_2.

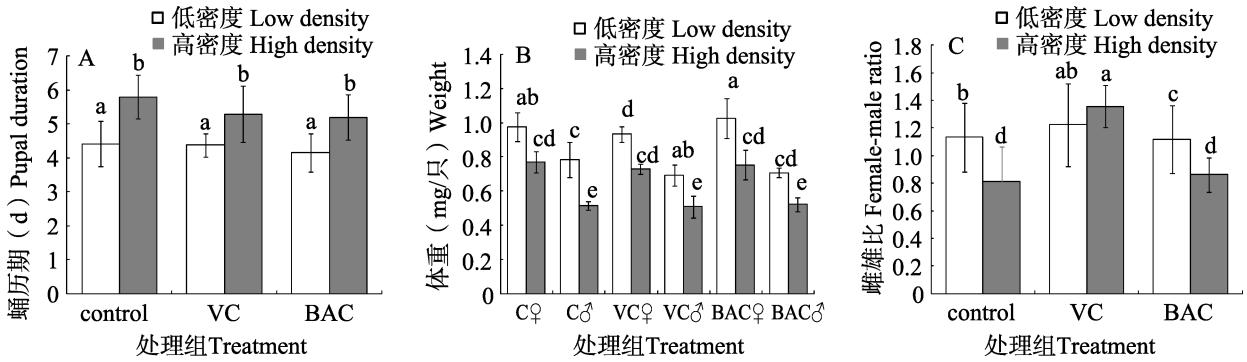

图 3　VC 和 BAC 对拥挤胁迫果蝇生长发育的影响

Fig. 3　Effects of VC and BAC on growth and development of flies under crowding stress

A：蛹历期；B：体重；C：雌雄比。

A: Pupal duration; B: Weight; C: Female-male ratio.

活性则显著上升；VC 组 MDA 的含量显著下降，SOD 和 CAT 的活性显著上升；BAC 组雌蝇的 MDA 水平显著下降，CAT 活性显著上升，BAC 组雄蝇 MDA 水平无影响，而 CAT 和 SOD 的活性都显著上升（图 4）。以上结果说明，高密度组下，各处理组果蝇的胁迫应激反应加强，氧化损伤减少，这与拥挤胁迫和药物处理激发果蝇的胁迫保护反应和增强抗氧化能力相关，且雌蝇变化比雄蝇大。

药物组与对照组的比较结果显示：在低密度

表 2 果蝇 ***HPS70*** 表达和氧化应激指标主体间效应的检验结果

Table 2 Tests of between-subjects effects of *HPS70* expression and oxidative stress indicators

源 Source	*HSP70*		MDA		SOD		CAT	
	F	Sig.	*F*	Sig.	*F*	Sig.	*F*	Sig.
性别 Gender	1 149.33	0.00	67.07	0.00	798.76	0.00	56.35	0.00
药物 Medicine	110.95	0.00	21.01	0.00	98.97	0.00	27.62	0.00
拥挤 Crowding	1 296.85	0.00	172.91	0.00	71.49	0.00	49.13	0.00
性别 * 药物 Gende * Medicine	5.99	0.01	1.18	0.33	41.30	0.00	3.64	0.04
性别 * 拥挤 Gende * Crowding	458.60	0.00	16.64	0.00	37.25	0.00	59.29	0.00
药物 * 拥挤 Medicine * Crowding	20.51	0.00	5.27	0.01	107.56	0.00	38.50	0.00
性别 * 药物 * 拥挤 Gende * Medicine * Crowding	67.97	0.00	8.31	0.00	6.12	0.01	18.33	0.00

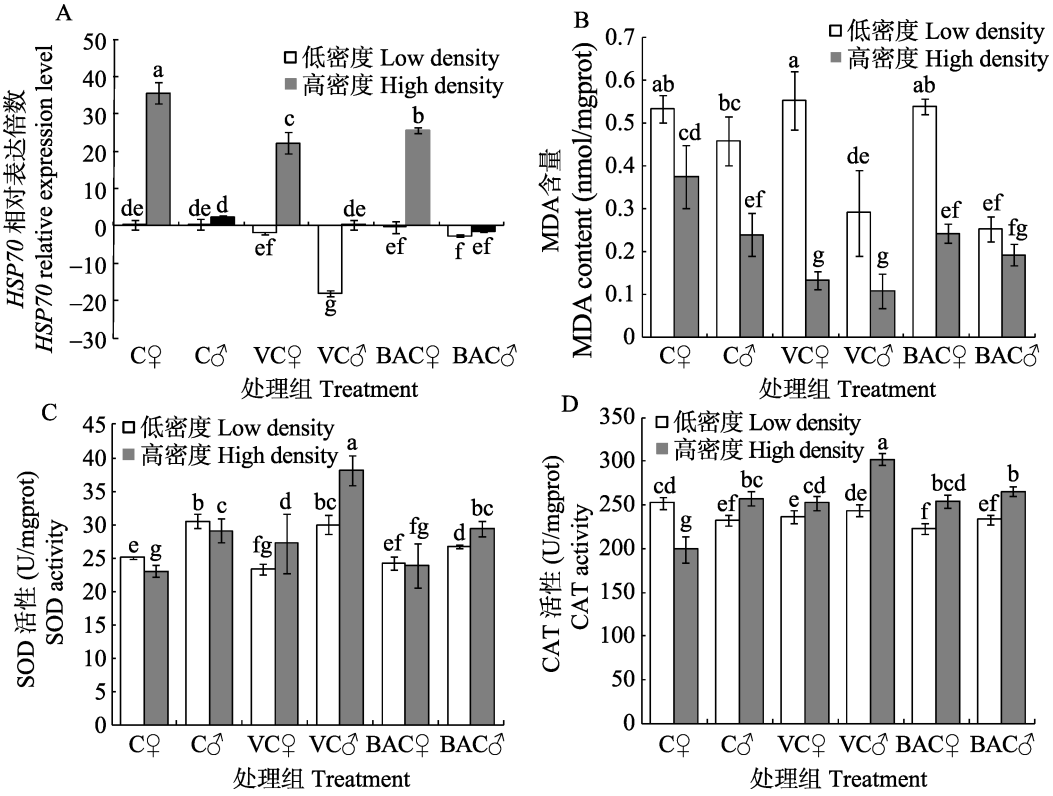

图 4 VC 和 BAC 对拥挤胁迫果蝇 ***HPS70*** 表达和氧化应激指标的影响

Fig. 4 Effects of VC and BAC on *HPS70* expression and oxidative stress indicators of flies

A： *HSP70* 相对表达量；B：MDA 含量；C：SOD 活性；D：CAT 活性。

A: *HSP70* relative expressional folds; B: MDA content; C: SOD activity; D: CAT activity.

条件下，VC 和 BAC 组雄蝇 *HSP70* 的表达水平和 MDA 含量都显著降低，对雌蝇无显著影响。VC 组雌蝇 SOD 和 CAT 活性都显著下降，对雄蝇无影响；BAC 组雌蝇 CAT 和雄蝇 SOD 的活性显著下降。高密度条件下，VC 和 BAC 组雌蝇 *HSP70* 的表达水平和 MDA 含量都显著降低；对于雄蝇，BAC 显著降低其 *HSP70* 的表达水平，VC 降低其 MDA 水平。VC 组雌雄蝇 SOD 的活性和 CAT 的活性都显著上升，BAC 组除了显著提高雌蝇 CAT 的活性外，对雌雄 SOD 和雄蝇

CAT 的活性都无显著影响（图 4）。以上结果说明，低密度下 VC 和 BAC 组果蝇特别是雄蝇的应激反应和氧化损伤水平都较低，高密度下 VC 和 BAC 组果蝇特别是雌蝇的应激反应和抗氧化能力加强，MDA 的积累减少，VC 组表现更明显。

从各密度组的雌雄果蝇对比来看，在低密度下：对照和 BAC 组雌雄蝇 *HSP70* 的表达水平无显著差异，VC 组雌蝇 *HSP70* 的表达水平显著高于雄蝇；对照组雌雄果蝇 MDA 的含量无显著差异，而 VC 和 BAC 组中，雌蝇 MDA 含量显著高于雄蝇；3 个处理组雄蝇 SOD 活性都显著高于雌蝇，CAT 活性则无显著差异。在高密度条件下：3 个处理组雌蝇 *HSP70* 的表达水平都显著高于雄蝇；对照组雌蝇 MDA 水平显著高于雄蝇，而 VC 和 BAC 组则无差异；3 个处理组雄蝇 SOD 和 CAT 的活性都高于雌蝇，除 BAC 雌蝇组外均达显著水平（图 4）。以上结果说明低密度下，雄蝇对 VC 和 BAC 处理更敏感，氧化损伤水平较低；而高密度下各处理组雌蝇的应激反应更强而酶活性则较低，说明雌蝇对拥挤胁迫更敏感，拥挤损伤更大，因此 VC 和 BAC 在高密度下对雌蝇的修复效果更明显。

3　讨论

拥挤胁迫会给动物体带来心理和生理上的双重影响，心理主要来源于空间的压力造成的精神紧张，生理更多来自于食物数量的限制及质量的下降、生存环境的恶化等方面的影响（Sorensen and Loeschcke，2001；Miao，2008），由此将引发一系列胁迫应激反应和氧化应激反应等。花青素作为植物体内广泛存在的水溶性天然色素，具有很强的抗氧化活性和自由基清除功能（Moyer *et al.*，2002）。本文研究了拥挤胁迫和 BAC 分别及协同处理时对果蝇生长发育的影响，并探讨了 BAC 在缓解拥挤损伤方面的功效。

已有研究表明，拥挤胁迫会延缓果蝇的发育速度，降低果蝇幼虫的存活率，减小成蝇的体积及降低繁殖能力等（Lazebnyi *et al.*，1996；Bosenko and Imasheva，1998）。在本研究中也得到了类似的结果，在高密度拥挤胁迫下，果蝇开始结蛹的时间及结蛹高峰期都延后，蛹历期也延长，这些都说明拥挤胁迫下，果蝇幼虫的发育变缓。羽化后成蝇个体变小、体重下降，同时我们还发现拥挤胁迫下果蝇的雌雄比发生了变化，其中雄蝇的数量大大超过了雌蝇的数量，这可能与雌蝇对拥挤胁迫更为敏感相关。一般认为拥挤胁迫对果蝇的影响主要由于幼虫增多导致的食物短缺和竞争，及食物中有毒有害代谢废物积累导致食物质量下降引发一系列的胁迫反应（Sorensen and Loeschcke，2001）。*HSP70* 家族是生物体内最保守的热休克蛋白家族，几乎能被所有的逆境胁迫所诱导，因此常作为环境应激反应的一个潜在分子标志物，用于评价生物体受胁迫的程度（Singh *et al.*，2009；Wang *et al.*，2009）。本研究中拥挤胁迫下雌性果蝇 *HSP70* 的表达水平急剧上升，说明雌性果蝇的应激反应强烈，这也验证了雌性果蝇对拥挤胁迫更为敏感的推断。氧化应激是生物体受到胁迫时体内产生的重要生理生化和免疫性综合反映（Singh *et al.*，2009）。通过对果蝇主要抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性，及主要氧化损伤产物 MDA 的检测发现，拥挤胁迫下果蝇的酶活性下降，但 MDA 的含量也下降，这可能由于拥挤胁迫激发果蝇的应激保护机制，降低氧化损伤，对果蝇起积极的作用。已有相关报道发现幼虫拥挤胁迫能够提高成虫果蝇的寿命和耐热能力（Sorensen and Loeschcke，2001）。以上结果说明，拥挤胁迫对果蝇发育速度、体重及雌雄比的影响与拥挤胁迫所诱导的胁迫应激反应和氧化应激相关。

大量研究数据表明 BAC 在动物体内能够被直接吸收，具有很强的抗氧化功能，如对脑损伤、紫外损伤、氧化剂等引发的氧化应激都具有很好的修复及保健功效（Bornsek *et al.*，2012；Liu *et al.*，2013；Mao *et al.*，2015）。本研究中发现在正常培养密度下（低密度）BAC 增加了果蝇蛹的数量及缩短了蛹历期，这可能与 BAC 改善果蝇的内环境，提高果蝇幼虫的存活率，并加快其发育相关。从 F_2 代的分析结果还可以看出，BAC 还可能增强果蝇的繁殖能力。进一步分析

发现 BAC 处理后，雄蝇中 *HSP70* 的表达水平和 MDA 的含量都显著下降，说明果蝇的应激反应和氧化损伤都得到很好的改善，但这过程与 SOD 和 CAT 抗氧化酶的相关性不大，这可能与 BAC 能够直接与自由基分子反应，从而终止自由基链式反应相关（Ramirez *et al*.，2015；Yousuf *et al*.，2015）。当在高密度组果蝇培养基中添加 VC 和 BAC 后，果蝇的生长发育依然受拥挤胁迫的影响，发育变缓及体重下降，但果蝇中 *HSP70* 的表达水平显著下降，说明添加 VC 和 BAC 后果蝇的应激反应下降。从 MDA 含量、SOD 和 CAT 活性的变化情况可以看出，VC 和 BAC 处理能够显著降低拥挤胁迫果蝇的氧化应激水平，表现为在拥挤胁迫下两种药物均降低果蝇 MDA 的水平，VC 则主要通过提高 SOD 和 CAT 的活性来实现，而 BAC 对酶活性的影响较小，说明 VC 和 BAC 对果蝇氧化损伤的影响机制存在差异。此外，雌雄蝇间的差异可能与雌雄果蝇对拥挤胁迫、VC 及 BAC 的敏感性不同相关，雄蝇对 VC 和 BAC 处理更敏感，而雌蝇对拥挤胁迫更敏感，所以拥挤胁迫对雌蝇的损伤比雄蝇大，VC 和 BAC 在高密度下对雌蝇的影响效果也比雄蝇明显。

综上所述，拥挤胁迫下果蝇的胁迫应激反应和氧化应激水平加强，从而使果蝇的发育变缓，体重和雌雄比下降。BAC 虽然对改善拥挤胁迫导致的果蝇体重下降及发育延缓方面无显著效应，但其能够降低正常培养和拥挤胁迫下果蝇的应激和氧化损伤水平，改善果蝇机体的内环境及减少拥挤损伤。因此，在食物中添加一定浓度的 BAC 对缓解拥挤胁迫导致的各种损伤有一定作用，这为解决集约化养殖过程中的拥挤胁迫问题提供了思路，并为进一步开发 BAC 的应用范围提供了科学的依据。

参考文献 (References)

Baldal EA, van der Linde K, van Alphen JJ, Brakefield PM, Zwaan BJ, 2005. The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mech. Ageing. Dev.*, 126(3): 407–416.

Basrur TV, Longland R, Wilkinson RJ, 2010. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (Salmo salar). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3): 445–450.

Bornsek SM, Ziberna L, Polak T, Vanzo A, Ulrih NP, Abram V, Tramer F, Passamonti S, 2012. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem*., 134(4): 1878–1884.

Bosenko DV, Imasheva AG, 1998. Effect of larval density on phenotypic and genetic variability of morphological traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetika*, 34(6): 757–761.

Chi MW, Griffith LC, Vecsey CG, 2014. Larval population density alters adult sleep in wild-type *Drosophila melanogaster* but not in amnesiac mutant flies. *Brain Sciences*, 4(3): 453–470.

Gao HY, Xu L, Chen HJ, Fang XJ, 2013. Research progress on postharvest quality control and antioxidant activity of blueberries. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 13(6): 1–8. [郜海燕, 徐龙, 陈杭君, 房祥军, 2013. 蓝莓采后品质调控和抗氧化研究进展. 中国食品学报, 13(6): 1–8.]

Khafipour E, Munyaka PM, Nyachoti CM, Krause DO, Rodriguez-Lecompte JC, 2014. Effect of crowding stress and *Escherichia coli* K88+ challenge in nursery pigs supplemented with anti-*Escherichia coli* K88+ probiotics. *Journal of Animal Science*, 92(5): 2017–2029.

Kong HL, Lv M, Zhu SD, 2012. Effects of larval density on disease resistance in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1572–1576. [孔海龙, 吕敏, 祝树德, 2012. 幼虫密度对斜纹夜蛾抗病能力的影响. 应用昆虫学报, 49(6): 1572–1576.]

Lazebnyi OE, Zakharchuk EB, Imasheva AG, 1996. Larval density and variability of body size in laboratory cultures of *Drosophila melanogaster*. *Genetika*, 32(7): 1010–1012.

Liu B, Xu P, Xie J, Ge X, Xia S, Song C, Zhou Q, Miao L, Ren M, Pan L, Chen R, 2014. Effects of emodin and vitamin E on the growth and crowding stress of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol*., 40(2): 595–602.

Liu W, Lu X, He G, Gao X, Li M, Wu J, Li Z, Wu J, Wang J, Luo C, 2013. Cytosolic protection against ultraviolet induced DNA damage by blueberry anthocyanins and anthocyanidins in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Biotechnol. Lett*., 35(4): 491–498.

Li JX, Hu ZH, 2013. Advances in research on anthocyanins of blueberry. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 27(6): 817–822. [李金星, 胡志和, 2013. 蓝莓花青素的研究进展. 核农学报, 27(6): 817–822.]

Li Y, Jang XF, Zhang L, Cheng YX, Liu YQ, Luo LZ, 2014. Effects of larval density on the development and reproduction of *Athetis*

lepigone. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(3): 623–629. [李艳, 江幸福, 张蕾, 程云霞, 刘彦群, 罗礼智, 2014. 幼虫密度对二点委夜蛾生长发育及繁殖的影响. 应用昆虫学报, 51 (3): 623–629.]

Ming JH, Xie J, Xu P, Liu WB, Ge XP, Liu B, Zhou QL, 2011. Effects of emodin, Vitamin C and their combiantion on crowding stress resistance of Wuchang bream. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 35(3): 400–413. [明建华, 谢骏, 徐跑, 刘文斌, 戈贤平, 刘波, 周群兰, 2011. 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂抗拥挤胁迫的影响. 水生生物学报, 35(3): 400–413.]

Mao X, Hao S, Zhu Z, Zhang H, Wu W, Xu F, Liu B, 2015. Procyanidins protects against oxidative damage and cognitive deficits after traumatic brain injury. *Brain Inj.*, 29(1): 86–92.

Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE, 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *J. Agric. Food Chem.*, 50(3): 519–525.

Ramirez JE, Zambrano R, Sepulveda B, Kennelly EJ, Simirgiotis MJ, 2015. Anthocyanins and antioxidant capacities of six *Chilean berries* by HPLC-HR-ESI-ToF-MS. *Food Chem.*, 176(1: 106–114.

Singh MP, Reddy MM, Mathur N, Saxena DK, Chowdhuri DK, 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235(2): 226–243.

Sorensen JG, Loeschcke V, 2001. Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *J. Insect Physiol.*, 47(11): 1301–1307.

Wang X, Tang L, Xia Y, Hu L, Feng X, Du W, Liu BF, 2013. Stress response of *Caenorhabditis elegans* induced by space crowding in a micro-column array chip. *Integrative Biology*, 5(4): 728–737.

Wang W, Han LL, Zhao KJ, 2009. Research advance of heat shock protein 70 in Entomology. *Journal of Northeast Agricultural University*, 40(11): 129–132. [王薇, 韩岚岚, 赵奎军, 2009. 昆虫热休克蛋白 Hsp70 的研究进展. 东北农业大学学报, 40(11): 129–132.]

Yu M, 2008. Research progress in the effect of crowding stress on fish. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 36(3): 1078–1080. [于淼, 2008. 拥挤胁迫对鱼类影响研究进展. 安徽农业科学, 36(3): 1078–1080.]

Yousuf B, Gul K, Wani AA, Singh P, 2015. Health benefits of Anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, DOI: 0.1080/10408398.2013.805316.