

幼虫饲粮中添加叶酸对雌性意大利蜜蜂 DNA 甲基化及发育的影响*

景洪雨** 姚玉凤 韩 凯 雷 丽 孙桂云 王红芳 胥保华***

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要 【目的】本文旨在探究意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 幼虫饲粮中添加叶酸对雌性蜜蜂 DNA 甲基化及发育的影响。【方法】从姊妹蜂群中选用 2 日龄意大利蜜蜂雌性幼虫, 平均分为 6 组, 任选一组以饲喂不添加叶酸的基础日粮为对照组 (CK), 其余 5 组为试验组, 分别饲喂添加 0.02%、0.04%、0.06%、0.08% 和 0.10% 叶酸的基础日粮。在室内温度 (34.5 ± 0.5) °C, 相对湿度为 $90\% \pm 5\%$ 的条件下, 按照饲养流程饲养意大利蜜蜂至出房。取 3-5 日龄的幼虫, 测定叶酸代谢指标及 DNA 甲基化相关指标, 计算新蜂发育历期, 称量新蜂重。【结果】(1) 添加叶酸 (FA) 水平为 0.04% 的试验组, 3、4 和 5 日龄幼虫蜂体内叶酸 (FA) 和 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 并且显著提高了幼虫时期蜂体的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因、丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 基因和亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因的表达量 ($P < 0.05$), 显著提高了 MTHFR 酶活性 ($P < 0.05$)。 (2) 与对照组相比, 添加叶酸为 0.04% 的试验组显著提高了 3 日龄幼虫 DNA 甲基转移酶 1a (Dnmt1a) 基因的表达量 ($P < 0.05$), 且显著提高了 3 日龄和 4 日龄幼虫的 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 酶活性 ($P < 0.05$)。添加 0.04% 的叶酸试验组相较于对照组显著降低了 3 日龄幼虫 DNA 甲基转移酶 3 (DNMT3) 的酶活性 ($P < 0.05$), 显著降低了 4 日龄幼虫 *Dnmt3* 基因的表达量和 DNMT3 酶活性 ($P < 0.05$)。叶酸添加剂量为 0.04% 时, 4 日龄蜂体 DNA 甲基化水平显著降低 ($P < 0.05$)。 (3) 与对照组相比, 添加 0.04% 的叶酸试验组的意大利蜜蜂平均发育历期 (19.95 d) 显著小于对照组 ($P < 0.05$), 平均新蜂重 (0.17 g) 显著大于对照组 ($P < 0.05$)。【结论】在基础日粮中添加适量叶酸能够降低 4 日龄意大利蜜蜂幼虫的 DNA 甲基化水平, 并能缩短发育历期和增加新蜂重。在饲粮中添加 0.04% 的叶酸有助于雌性意大利蜜蜂幼虫向蜂王方向发育。

关键词 意大利蜜蜂; 叶酸; DNA 甲基化; 发育

Effect of adding folic acid to the larval diet of *Apis mellifera ligustica* on DNA methylation and female development

JING Hong-Yu** YAO Yu-Feng HAN Kai LEI Li SUN Gui-Yun
WANG Hong-Fang XU Bao-Hua***

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the effect of adding folic acid to the larval diet of *Apis mellifera ligustica* on DNA methylation and female development. 【Methods】Two-day-old female *A. m. ligustica* larvae were randomly selected from sister colonies and divided into six equal-sized groups. The control group (CK) was fed a diet without additional folic acid, whereas the remaining five groups were fed the same diet with the addition of either 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% or 0.10% folic acid. Larvae were reared at room temperature of (34.5 ± 0.5) °C at a relative humidity of $90\% \pm 5\%$ until they emerged. Indices of folic acid metabolism and DNA methylation related indices were measured in 3- to 5-day-old larvae, and the

*资助项目 Supported projects: 泰山产业领军人才高效生态农业创新类项目 (项目编号: LJNY202003); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-44)

**第一作者 First author, E-mail: 2992165820@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bhxu@sdau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-07-03; 接受日期 Accepted: 2021-08-18

developmental duration and weight of newly emerged bees was recorded. **[Results]** (1) The 0.04% treatment group had significantly higher levels of folic acid (FA) and 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) than the control group at 3, 4 and 5 days of age ($P < 0.05$). This group also had significantly higher expression of the dihydrofolate reductase (DHFR) gene, the serine hydroxymethyltransferase (SHMT) gene and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene ($P < 0.05$), and significantly higher MTHFR enzyme activity ($P < 0.05$), in the larval period. (2) This treatment group also had significantly higher expression of the DNA methyltransferase 1a (Dnmt1a) gene in 3-day-old larvae ($P < 0.05$), and significantly higher DNA methyltransferase 1 (DNMT1) enzyme activity in 3- and 4-day-old larvae, than the control group ($P < 0.05$). The 0.04% treatment group had significantly lower DNA methyltransferase 3 (DNMT3) enzyme activity in 3-day-old larvae compared to the control group ($P < 0.05$), and significantly lower *Dnmt3* gene expression and DNMT3 enzyme activity in 4-day-old larvae ($P < 0.05$). The level of DNA methylation in this treatment group was also significantly lower in 4-day-old bees ($P < 0.05$). (3) The average developmental duration (19.95 d) of the 0.04% treatment group was significantly lower ($P < 0.05$), and the average weight (0.17 g) of newly emerged bees was, significantly higher, than that of the control group ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The addition of 0.04% folic acid to the larval diet can reduce DNA methylation in 4-day-old *A. m. ligustica* larvae, shorten developmental duration and increase the weight of newly emerged bees. The addition of 0.04% folic acid to the larval diet helps female *A. m. ligustica* larvae develop into Queens.

Key words *Apis mellifera ligustica*; folic acid; DNA methylation; development

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 具有发育可塑性, 蜂王和工蜂都是由受精卵发育而成的雌性蜜蜂, 拥有相同的遗传物质, 但由于发育过程中得到的食物和发育空间不同, 结果使得两者不仅在外观形态上差异很大, 而且在生殖能力、寿命、行为等方面迥然不同(曾志将, 2009, 2020)。

DNA 甲基化是指在甲基转移酶 (DNA methyltransferase, Dnmt) 的催化下, DNA 的 CpG 二核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基, 形成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC) 的过程, 也有少量非 CpG 甲基化(王丽, 2017)。蜜蜂具有 3 种 DNA 甲基转移酶: 即 2 种 DNMT1, 负责 DNA 甲基化的维持; 1 种 DNMT2, 负责非 CpG 甲基化; 1 种 DNMT3, 负责 DNA 的从头甲基化(Wang *et al.*, 2006; Schaefer and Lyko, 2007)。近年来, 已有研究证明 DNA 甲基化与蜜蜂的发育可塑性息息相关。Kucharski 等(2008)使用 RNA 干扰技术敲除蜜蜂 1 龄幼虫的 DNMT3, 结果 72% 的蜜蜂长成具有 120-190 根卵巢小管且卵巢发育完全的蜂王, 其余 28% 的蜜蜂长成只有 2-6 根卵巢小管且卵巢发育不全的工蜂。Elango 等(2009)采用计算方法分析了意大利蜜蜂 DNA 甲基化的总体模式, 并将基因分为低 CpG 二核苷酸含量和高 CpG 二核苷酸含量两大类, 发现低 CpG 基因被预测为高甲基化通常参与代谢以及基因表

达和翻译的管家基因功能, 高 CpG 基因被预测为低甲基化参与了发育过程、细胞通讯和黏附过程, 并且有强烈级型特异性表达偏向的基因富集在高 CpG 类别中。Lyko 等(2010)利用亚硫酸氢盐测序技术确定甲基胞嘧啶 (mC) 在成年蜂王和工蜂大脑中的分布, 发现超过 550 个基因在蜂王和工蜂之间显示出显著的甲基化差异, 同时发现甲基化模式和剪接位点之间有很强的相关性。Foret 等(2012)在对幼虫头部的甲基化测序研究中发现, 4 日龄蜂王和工蜂幼虫头部的差异甲基化基因数量为 2 399 个, 超过 80% 的差异甲基化基因甲基化程度在工蜂幼虫中上调。Shi 等(2013)对 2、4 和 6 日龄的蜂王幼虫和工蜂幼虫进行了 DNA 甲基化测序, 发现蜂王幼虫的 DNA 甲基化水平在 2-4 日龄时升高, 6 日龄时降低, 工蜂幼虫的 DNA 甲基化水平随着年龄的增长而增加。Wang 等(2020)比较了蜂王和工蜂幼虫 3、4 和 5 日龄的全基因组甲基化情况, 发现蜂王和工蜂幼虫基因组甲基化的基本特征相同, 但蜂王和工蜂幼虫甲基化水平随年龄呈不同趋势, 3 日龄时蜂王幼虫甲基化水平高于工蜂幼虫, 4 日龄时低于工蜂幼虫, 5 日龄时与工蜂幼虫甲基化水平相近。这些研究均证实 DNA 甲基化是影响蜜蜂发育可塑性的重要机制。

叶酸是一种水溶性的 B 族维生素, 因其参与

一碳代谢而与 DNA 甲基化相关(喻小琼, 2014)。叶酸对基因组 DNA 甲基化的影响研究多集中在模式生物上。例如, 在斑马鱼上发现补充叶酸减弱了暴露于 EOM 的斑马鱼胚胎中 CCGG 位点的 DNA 低甲基化和高甲基化变化, 同时减弱了 EOM 对参与 DNA 甲基化调控的 *Dnmt1* 和 *Dnmt4* 基因表达的影响 (Jiang *et al.*, 2019)。在对老年大鼠模型上叶酸和基因组 DNA 甲基化之间关系的研究中发现, 喂食含有 0、4.5 或 18 $\mu\text{mol/kg}$ 叶酸的食物 (分别为叶酸缺乏组、正常供应组和额外补充组), 到 20 周时叶酸缺乏组、正常供应组和额外补充组大鼠的肝脏 DNA 甲基化程度递增, 故提出饮食中的叶酸可以调节基因组 DNA 甲基化 (Choi *et al.*, 2005)。矛盾的是, 在叶酸对大鼠结肠基因组的时间依赖性影响试验中, 叶酸缺乏并没有在结肠中诱发明显的基因组 DNA 低甲基化, 甚至在试验中期, 叶酸缺乏增加了结肠中基因组 DNA 甲基化的程度, 而且额外补充叶酸并没有调节结肠中任何时间点的基因组 DNA 甲基化 (Sohn *et al.*, 2003)。在昆虫上, 叶酸是否是必需营养素至今存在争议。23 种昆虫 (包括 6 个目) 在喂食含有叶酸的食物情况下比喂食缺乏叶酸的食物更有活力或多产性, 但是饲料中叶酸的存在减缓了甲虫 *Rhizoptera dominica* 和蟑螂 *Blatella germanica* 的生长, 而甲虫 *Oryzaephilus mercator* 和蚜虫 *Myzus persicae* 不受叶酸的影响 (Noland *et al.*, 1949; Raccach *et al.*, 1973; Saxena and Kaul, 1974; Anand and Pant, 1988)。科研人员提出一些昆虫可能从细菌或真菌共生体中获得叶酸 (Harington, 1960)。支持性的研究表明, 只有当食物中的细菌共生体被抗生素杀死时, 一些昆虫才需要这种维生素 (Harington, 1960; Jordan and Trewern, 1973; Baker, 1975)。在果蝇上, Blatch 等 (2015) 用抗生素以及叶酸干扰药物甲氨蝶呤来控制果蝇的叶酸摄入量, 结果发现, 与叶酸摄入量低的哺乳动物类似, 果蝇幼虫的生长和 DNA 合成率明显变慢。在蜜蜂上, 叶酸是否能影响蜜蜂的发育还不清楚。本研究通过在蜜蜂幼虫基础饲料中添加不同剂量的叶酸, 探究叶酸对意大利蜜蜂幼虫

时期 DNA 甲基化以及蜜蜂发育历期和新蜂重的影响, 为探索叶酸对蜜蜂发育的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

意大利蜜蜂雌性幼虫取自山东农业大学试验蜂群。

1.2 主要仪器和试剂

Total RNA Kit II 试剂盒购自 OMEGA 公司, Evo M-MLV 反转录预混液购自艾科瑞生物科技有限公司, Real Time PCR 试剂盒购自全式金试剂公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自康为世纪有限公司, 四氢叶酸 (THF) 酶联免疫试剂盒、叶酸 (FA) 酶联免疫试剂盒、5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 酶联免疫试剂盒、亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 酶联免疫试剂盒和二氢叶酸还原酶 (DHFR) 酶联免疫试剂盒购自江苏酶免实业有限公司, 甲基转移酶 1 (DNMT1) 酶联免疫试剂盒和甲基转移酶 3 (DNMT3) 酶联免疫试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司, 叶酸 (纯度 98%) 购自索莱宝生物科技有限公司。

HWS-328 型恒温培养箱购自宁波江南仪器厂, BS 124S 型分析天平购自赛多利斯 (北京) 科学仪器有限公司, 7500 型实时荧光定量仪购自美国 ABI 公司。

1.3 试验设计及饲养管理

本研究从姊妹蜂群中选用 2 日龄意大利蜜蜂雌性幼虫 1 440 只, 平均分为 6 组, 每组 5 个重复, 每个重复 48 只幼虫。其中一组为对照组 (CK), 饲喂基础日粮 (Vandenberg and Shimanuki, 1987), 不额外添加叶酸, 其余 5 组为试验组, 叶酸添加水平分别为 0.02%、0.04%、0.06%、0.08% 和 0.10%。饲料配方见表 1。

从蜂群中用移虫针移取 2 日龄幼虫放在 48 孔细胞培养板中饲养, 按不同处理分组饲养, 每个孔中加入 150 μL 预热的幼虫日粮, 每个孔中移入一只幼虫。幼虫放于恒温恒湿培养箱中, 温度为 $(34.5 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $90\% \pm 5\%$ 。

每天用移虫针将幼虫转移至盛有新的幼虫日粮的 48 孔细胞培养板中。在恒温恒湿培养箱中饲养至排尿酸盐时,清理体表的饲料或粪便并将幼

虫转移到 24 孔细胞培养板中准备化蛹,蛹期温度不变,设置相对湿度为 $75\% \pm 5\%$ 。每天及时清理死亡蜜蜂。

表 1 幼虫人工饲料配方及叶酸添加水平
Table 1 Artificial diet formulation and folic acid addition level for larvae

原料 (%) Ingredients (%)	处理 Treatments					
	CK	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%
蜂王浆 Royal jelly	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
葡萄糖 Glucose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
叶酸 FA	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
果糖 Fructose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
酵母提取物 Yeast extract	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
无菌水 Sterile water	37.00	36.98	36.96	36.94	36.92	36.90
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

1.4 蜂体叶酸代谢物质含量的测定

随机选取饲喂不同处理组的 3、4 和 5 日龄幼虫各 2 只,分别置于离心管中,按质量体积比 1 : 9 加入预冷的 PBS 缓冲液进行组织匀浆,配置成 10%匀浆液,4 °C 条件下 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为待测液。上清液蛋白浓度用 BCA 法进行测定,蜂体叶酸 (FA) 含量、5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 含量和四氢叶酸 (THF) 含量用酶联免疫分析 (ELISA) 方法测定。测定的物质含量用虫体蛋白浓度校准。每个处理 5 个重复。

1.5 蜂体叶酸代谢及 DNA 甲基化过程相关基因表达量的测定

随机选取饲喂不同处理组的 3、4 和 5 日龄幼虫各 1 只,每个处理 5 个重复。对叶酸代谢相关的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因、丝氨酸羟甲基转移酶 (SHMT) 基因和亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因以及 DNA 甲基化相关的 DNA 甲基转移酶 1a (Dnmt1a) 基因和 DNA 甲基转移酶 3 (Dnmt3) 基因的表达量进行测定。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测基因的表达量。用动物总 RNA 提取试剂盒提取样本总 RNA;利用 Evo M-MLV 反转录预混液将 RNA

反转录为 cDNA,反转录操作步骤如下: 10 μL 体系混匀后,在 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s, 4 °C 终止反应,共 1 循环,随后将 cDNA 样品浓度调节为相同水平后, - 20 °C 保存待用。参照 Real Time PCR 试剂盒操作指南配置 20 μL 体系,使用 7500 Real-Time PCR 仪 (ABI 7500, USA) 检测基因相对表达量,反应条件: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算基因的相对表达量。本试验所使用的所有引物均委托上海生工生物科技有限公司合成,引物序列信息见表 2。

1.6 叶酸代谢及 DNA 甲基化相关酶活的测定

随机选取饲喂不同处理组的 3、4 和 5 日龄幼虫各 2 只,分别置于离心管中,按质量体积比 1 : 9 加入预冷的 PBS 缓冲液进行组织匀浆,配置成 10%匀浆液,4 °C 条件下 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为待测液。上清液蛋白浓度用 BCA 法进行测定,二氢叶酸还原酶 (DHFR)、亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR)、DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 以及 DNA 甲基转移酶 3 (DNMT3) 酶活用酶联免疫分析 (ELISA) 方法测定。酶活用虫体蛋白质浓度进行校准。每个处理 5 个重复。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

目的基因 Target genes		引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 (bp) Product length (bp)	登录号 GenBank number
<i>DHFR</i>	F:	CCATGGAAACTCAAAAGTGAATTGGC	102	XM_393902
	R:	CCATGTTCTACGTCCCATCAATACAA		
<i>SHMT</i>	F:	TCAACGCTGTTTTCTGATTGGTTGA	114	XM_006562405
	R:	TTGAGATTCGAAACGCCGCG		
<i>MTHFR</i>	F:	TCCATTTGTGTGTGCTGGTTATCCA	95	XM_006566916
	R:	GCTCCTGCATCAACTTTTTCTTTCA		
<i>Dnmt1a</i>	F:	AGTAAGCGTGCGTGAATGTG	113	NM_001171051
	R:	CAAGTGGTGGAGGAACTGC		
<i>Dnmt3</i>	F:	CGGCATTTGTTCTGGTTGTA	162	NM_001190421
	R:	TGGCTCTATGGGAAAGTTGTG		
<i>β-actin</i>	F:	GTTTTCCTCATCTATCGTCGG	142	NM_001185145
	R:	TTTTCTCCATATCATCCCAG		

1.7 蜂体 DNA 甲基化情况测定

随机选取饲喂不同处理组的 4 日龄幼虫各 2 只, 使用 QIAGEN 血液和组织 DNA 提取试剂盒, 根据产品说明书分离不同处理组的蜂体基因组 DNA。根据说明书使用 EPIGENTEK 的 MethylFlash Global DNA methylation 进行 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, 5-mC) 分析。将纯化的样品 DNA (100 ng) 和未甲基化 (阴性) 对照 DNA 在条带孔中与专门开发的溶液一起温育, 以促进 DNA 结合和对样品孔的黏附。用稀释的 5-mC 捕获和检测抗体处理样品孔以测量 DNA 的甲基化部分, 结果通过酶标仪进行检测。每个处理 3 个重复。

1.8 生长发育指标测定

分别从对照组和各试验组中随机选取 2 日龄幼虫 120 只, 在室内恒温恒湿培养箱中, 从幼虫 2 日龄饲养至预蛹期后, 将蜜蜂转移到化蛹板上化蛹, 化蛹率为成功化蛹成白眼蛹的数目占用于测定幼虫化蛹率幼虫总数的百分比。继续饲养, 直到所有蛹羽化, 羽化率为成功羽化的个体数占成功化蛹的个体数目的百分比。新蜂出房后, 每组随机选取 38 只测新蜂重, 首先使用电

子天秤称量平皿的重量, 再将蜜蜂放入平皿中, 称量蜜蜂和平皿的总重量, 总重量减去平皿的重量即为新蜂重。新蜂出房后, 每组随机选取 38 只计算发育历期, 发育历期为从 2 日龄幼虫起饲养到羽化出房时的天数加上 4 d (3 d 卵期加上 1 d 幼虫期)。

1.9 数据处理与分析

试验数据均采用平均值±标准误 (Mean ± SE) 表示, 数据统计采用 SAS 9.2 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Tukey's 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 饲料中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫叶酸代谢产物的影响

如表 3 所示, 基础日粮中叶酸添加量为 0.04% 时, 分析 FA 和 5-MTHF 的含量发现, 3 日龄幼虫蜂体 FA 含量为 $(2.00 \pm 0.04) \mu\text{L/L}$, 5-MTHF 含量为 $(32.06 \pm 1.18) \text{ ng/g}$, 均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 4 日龄幼虫蜂体 FA 含量为 $(1.52 \pm 0.06) \mu\text{L/L}$, 5-MTHF 含量为 $(24.81 \pm 0.83) \text{ ng/g}$, 同样显著高于对照组 ($P < 0.05$); 5

日龄幼虫蜂体 FA 含量为 $(0.91 \pm 0.01) \mu\text{L/L}$, 5-MTHF 含量为 $(21.29 \pm 0.30) \text{ ng/g}$, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对 THF 的分析发现, 不同处理对 3 日龄幼虫蜂体 THF 含量的影响和对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$); 幼虫 4 日龄时, 0.10% 试验组中 4 日龄幼虫蜂体的 THF 含量为 $(0.37 \pm 0.08) \mu\text{L/L}$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其它试验组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$); 幼虫 5 日龄时, 0.02% 试验组中 5 日龄幼虫蜂体的 THF 含量显著高于对照组 ($P > 0.05$), 其它试验组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。总的来说, 饲粮中添加 0.04% 的叶酸显著提高了 3、4 和 5 日龄的蜜蜂蜂体 FA 含量和 5-MTHF 含量 ($P < 0.05$), 促进了蜂体叶酸代谢。

2.2 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫叶酸代谢相关基因表达的影响

如表 4 所示, 通过分析 3-5 日龄幼虫蜂体叶酸代谢相关基因的相对表达量, 发现 *DHFR*、*SHMT* 和 *MTHFR* 基因均随叶酸添加量增多, 表达量呈现先升高后降低的趋势。叶酸添加剂量为 0.04% 时, 3 日龄幼虫蜂体 *DHFR*、*SHMT* 和 *MTHFR* 基因的表达量与对照组相比显著提高 ($P < 0.05$); 4 日龄时蜂体 *DHFR*、*SHMT* 和 *MTHFR* 基因的表达量同样显著高于对照组 ($P < 0.05$), 分别是对照组的 2.49 倍、1.15 倍和 1.20 倍; 5 日龄时蜂体 *DHFR*、*SHMT* 和 *MTHFR* 基因的表达量分别是对照组的 1.53 倍、1.89 倍和 1.38 倍。总的来说, 饲粮中添加 0.04% 的叶酸显著提高了 3-5 日龄幼虫蜂体 *DHFR*、*SHMT* 和 *MTHFR* 基因的表达量 ($P < 0.05$)。

2.3 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫叶酸代谢相关酶活的影响

如表 5 所示, 幼虫 3 日龄时, 饲粮中添加 0.10% 的叶酸, 相较于对照组, 显著降低了 3 日龄蜂体的 *DHFR* 酶活性 ($P < 0.05$), 而 0.04% 和 0.06% 的叶酸添加显著增加了 3 日龄蜂体的 *MTHFR* 酶活性 ($P < 0.05$); 幼虫 4 日龄时, 饲粮中添加 0.02% 的叶酸, 和对照组相比显著增加了 4 日龄蜂体的 *DHFR* 酶活性 ($P < 0.05$), 且

0.04% 试验组的 *MTHFR* 酶活性显著增加 ($P < 0.05$); 幼虫 5 日龄时, 饲粮中添加 0.02% 的叶酸显著增加了 5 日龄蜂体的 *DHFR* 酶活性 ($P < 0.05$), 而且饲粮中添加 0.04% 的叶酸显著增加了 5 日龄蜂体的 *MTHFR* 酶活性 ($P < 0.05$)。总的来说, 叶酸添加剂量为 0.04% 时, 3-5 日龄蜂体的 *MTHFR* 酶活性显著提高 ($P < 0.05$)。

2.4 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫 DNA 甲基化相关基因表达的影响

如表 6 所示, 幼虫 3 日龄时, 不同处理下 *Dnmt1a* 基因的表达量和对照组相比均上调; 幼虫 4 日龄时, 不同处理下 *Dnmt3* 基因的表达量和对照组相比均下调。叶酸添加剂量为 0.04% 时, 显著提高了 3 日龄蜂体 *Dnmt1a* 基因的表达量 ($P < 0.05$), 显著降低了 4 日龄蜂体 *Dnmt3* 基因的表达量 ($P < 0.05$)。

2.5 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫 DNA 甲基化相关酶活性的影响

如表 7 所示, 幼虫 3 日龄时, 0.04% 试验组的蜂体 DNMT1 酶活性为 $(29.60 \pm 4.26) \text{ U/g}$, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), DNMT3 酶活性为 $(12.79 \pm 0.21) \text{ U/g}$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 幼虫 4 日龄时, 不同处理下 DNMT1 酶活性和对照组相比均上调, 0.04% 试验组的蜂体 DNMT3 酶活性为 $(9.40 \pm 0.15) \text{ U/g}$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 幼虫 5 日龄时, 不同处理对 5 日龄蜂体 DNMT1 酶活性的影响和对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 0.02% 试验组中 5 日龄蜂体 DNMT3 酶活性显著升高 ($P < 0.05$), 其余各组 and 对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。总的来说, 叶酸添加剂量为 0.04% 时, 幼虫 3 日龄和 4 日龄时蜂体 DNMT1 的酶活性显著提高 ($P < 0.05$), 且 DNMT3 的酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。

2.6 饲粮中添加叶酸对 4 日龄意大利蜜蜂幼虫蜂体 DNA 甲基化水平的影响

如图 1 所示, 叶酸添加剂量为 0.04% 和 0.06% 时, 4 日龄蜂体 DNA 甲基化水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)

表 3 饲料中叶酸添加水平对 3-5 日龄幼虫叶酸代谢物的影响
Table 3 Effect of folic acid addition level in the diet on folic acid metabolites of 3- to 5-day-old larvae

不同处理 Different treatments	叶酸 (μL/L) FA (μL/L)			5-甲基四氢叶酸 (ng/g) 5-MTHF (ng/g)			四氢叶酸 (μL/L) THF (μL/L)		
	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old
CK	1.54 ± 0.01bc	1.28 ± 0.10b	0.72 ± 0.04b	16.92 ± 0.65cd	20.96 ± 0.27bc	11.99 ± 0.75b	1.00 ± 0.04ab	0.55 ± 0.02ab	0.18 ± 0.01b
0.02%	1.98 ± 0.06a	1.34 ± 0.03ab	0.87 ± 0.02a	21.15 ± 2.04bc	22.33 ± 0.60b	13.08 ± 0.45b	1.05 ± 0.01ab	0.69 ± 0.02a	0.29 ± 0.03a
0.04%	2.00 ± 0.04a	1.52 ± 0.06a	0.91 ± 0.01a	32.06 ± 1.18a	24.81 ± 0.83a	21.29 ± 0.30a	1.19 ± 0.09a	0.66 ± 0.01ab	0.25 ± 0.02ab
0.06%	1.68 ± 0.06b	1.31 ± 0.04b	0.36 ± 0.06c	23.05 ± 2.08b	20.91 ± 1.18bc	13.24 ± 1.32b	1.04 ± 0.10ab	0.50 ± 0.08bc	0.21 ± 0.05ab
0.08%	1.50 ± 0.12bc	0.91 ± 0.09c	0.31 ± 0.06c	16.66 ± 1.47cd	19.81 ± 0.13c	12.05 ± 0.76b	0.87 ± 0.08b	0.56 ± 0.02ab	0.19 ± 0.02b
0.10%	1.41 ± 0.08c	0.73 ± 0.03c	0.26 ± 0.03c	12.44 ± 0.33d	20.02 ± 0.03c	14.43 ± 0.37b	0.96 ± 0.02b	0.37 ± 0.08c	0.17 ± 0.02b

同列数据后标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 4-表 7 同。

Data followed by the same letters in the same column indicate no significant difference ($P > 0.05$), while followed by the different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as table 4-table 7.

表 4 饲料中叶酸添加水平对 3-5 日龄幼虫叶酸代谢相关基因表达的影响
Table 4 Effect of folic acid addition level in the diet on the expression of genes related to folic acid metabolism of 3- to 5-day-old larvae

不同处理 Different treatments	二氢叶酸还原酶基因 <i>DHFR</i>			丝氨酸羟甲基转移酶基因 <i>SHMT</i>			亚甲基四氢叶酸还原酶基因 <i>MTHFR</i>		
	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old
CK	1.00 ± 0.05b	1.00 ± 0.10b	1.00 ± 0.08c	1.00 ± 0.00b	1.00 ± 0.06bc	1.00 ± 0.08c	1.00 ± 0.11b	1.00 ± 0.06bc	1.00 ± 0.11b
0.02%	1.57 ± 0.07a	2.37 ± 0.10a	1.27 ± 0.04b	0.99 ± 0.00b	1.09 ± 0.04ab	1.55 ± 0.21ab	2.40 ± 0.23a	1.07 ± 0.03b	1.10 ± 0.10ab
0.04%	1.64 ± 0.06a	2.49 ± 0.08a	1.53 ± 0.06a	1.09 ± 0.03a	1.15 ± 0.00a	1.89 ± 0.18a	2.40 ± 0.24a	1.20 ± 0.01a	1.38 ± 0.13a
0.06%	0.54 ± 0.04c	2.36 ± 0.10a	1.25 ± 0.14b	0.35 ± 0.00c	0.95 ± 0.03c	1.94 ± 0.14a	2.34 ± 0.23a	0.93 ± 0.01c	1.28 ± 0.09ab
0.08%	0.46 ± 0.07c	2.28 ± 0.12a	1.06 ± 0.00bc	0.32 ± 0.01c	0.94 ± 0.02c	1.18 ± 0.10bc	2.03 ± 0.15a	0.31 ± 0.02d	0.58 ± 0.07c
0.10%	0.42 ± 0.03c	0.71 ± 0.09b	0.99 ± 0.01c	0.32 ± 0.00c	0.65 ± 0.02d	1.13 ± 0.11bc	1.78 ± 0.22a	0.30 ± 0.02d	0.68 ± 0.06c

表 5 饲料中叶酸添加水平对 3-5 日龄幼虫叶酸代谢相关酶活的影响
Table 5 Effect of folic acid addition level in the diet on folic acid metabolism-related enzyme activities of 3- to 5-day-old larvae

不同处理 Different treatments	二氢叶酸还原酶 (U/g) DHFR (U/g)			亚甲基四氢叶酸还原酶 (U/g) MTHFR (U/g)		
	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old
CK	62.81 ± 0.29ab	46.61 ± 0.00b	37.38 ± 3.89b	50.94 ± 2.87cd	46.51 ± 0.97b	37.75 ± 1.10b
0.02%	66.45 ± 0.01a	55.67 ± 1.85a	49.76 ± 2.46a	55.70 ± 6.12bc	43.48 ± 0.27b	40.45 ± 3.65b
0.04%	67.15 ± 0.09a	40.45 ± 3.19bc	31.92 ± 2.87b	71.00 ± 3.87a	60.83 ± 1.58a	52.93 ± 3.63a
0.06%	60.97 ± 3.88ab	38.05 ± 4.32c	19.36 ± 2.85c	66.86 ± 5.35ab	36.53 ± 1.81c	18.21 ± 2.55c
0.08%	58.33 ± 0.78b	33.30 ± 1.22cd	19.30 ± 3.08c	24.40 ± 4.67e	33.83 ± 0.85c	35.54 ± 7.70b
0.10%	46.11 ± 2.44c	27.54 ± 0.67d	18.17 ± 0.28c	38.62 ± 2.84d	17.13 ± 1.36d	21.77 ± 0.40c

表 6 饲料中叶酸添加水平对 3-5 日龄幼虫 DNA 甲基化相关基因表达的影响
Table 6 Effect of folic acid addition level in the diet on DNA methylation related gene expression of 3- to 5-day-old larvae

不同处理 Different treatments	DNA 甲基转移酶 1a 基因 <i>Dnmt1a</i>			DNA 甲基转移酶 3 基因 <i>Dnmt3</i>		
	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old
CK	1.00 ± 0.09b	1.00 ± 0.17a	1.00 ± 0.19a	1.00 ± 0.09a	1.00 ± 0.06a	1.00 ± 0.07c
0.02%	1.80 ± 0.14a	0.89 ± 0.13a	1.13 ± 0.11a	1.14 ± 0.11a	0.52 ± 0.02c	1.47 ± 0.15b
0.04%	2.20 ± 0.43a	0.85 ± 0.12a	1.15 ± 0.08a	1.17 ± 0.08a	0.60 ± 0.05bc	2.04 ± 0.09a
0.06%	2.47 ± 0.20a	0.68 ± 0.10a	0.99 ± 0.12a	0.95 ± 0.06a	0.49 ± 0.03c	1.71 ± 0.13b
0.08%	2.02 ± 0.28a	1.02 ± 0.08a	0.47 ± 0.04b	0.62 ± 0.03b	0.74 ± 0.06b	0.93 ± 0.07c
0.10%	1.72 ± 0.26ab	0.24 ± 0.03b	0.54 ± 0.05b	0.63 ± 0.06b	0.32 ± 0.04d	0.74 ± 0.03c

表 7 饲料中叶酸添加水平对 3-5 日龄幼虫 DNA 甲基化相关酶活性的影响
Table 7 Effect of folic acid addition level in the diet on DNA methylation related enzyme activities of 3- to 5-day-old larvae

不同处理 Different treatments	DNA 甲基转移酶 1 (U/g) DNMT1 (U/g)			DNA 甲基转移酶 3 (U/g) DNMT3 (U/g)		
	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old	3 日龄 3-day-old	4 日龄 4-day-old	5 日龄 5-day-old
CK	17.58 ± 0.10b	20.69 ± 0.48c	27.94 ± 1.98ab	16.76 ± 0.15a	12.71 ± 1.00b	10.56 ± 0.40bc
0.02%	22.12 ± 0.49b	30.21 ± 0.38b	34.53 ± 7.73a	16.35 ± 0.63a	15.71 ± 0.57a	14.50 ± 1.26a
0.04%	29.60 ± 4.26a	26.58 ± 0.86b	20.67 ± 1.19b	12.79 ± 0.21b	9.40 ± 0.15c	8.76 ± 0.06c
0.06%	22.95 ± 1.14b	35.73 ± 1.50a	19.45 ± 2.48b	15.94 ± 0.98a	12.62 ± 0.20b	10.54 ± 0.19bc
0.08%	18.62 ± 0.24b	21.73 ± 0.96c	22.16 ± 1.73ab	16.84 ± 0.06a	13.22 ± 0.53ab	8.87 ± 0.25c
0.10%	21.00 ± 0.03b	27.30 ± 2.47b	28.79 ± 4.79ab	15.48 ± 0.20a	11.29 ± 1.70bc	13.02 ± 1.49ab

2.7 饲料中添加叶酸对意大利蜜蜂幼虫化蛹率和羽化率的影响

如表 8 所示,叶酸添加剂量为 0.08%和 0.10% 时,幼虫的化蛹率显著低于对照组和其它试验组

($P < 0.05$)。叶酸添加剂量为 0.06%和 0.08%时,羽化率显著低于对照组 ($P < 0.05$)。总的来说,饲料中添加 0.08%以上的叶酸能够抑制幼虫化蛹和羽化。

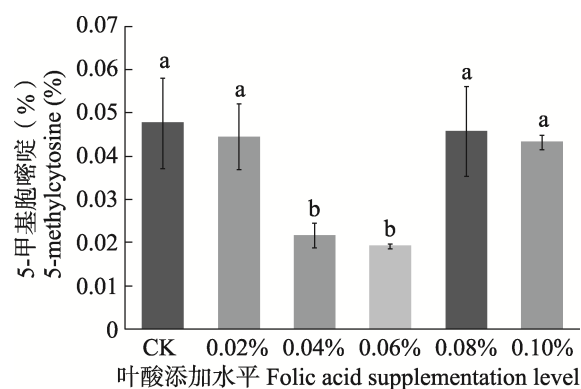


图 1 饲粮中叶酸添加水平对 4 日龄幼虫总 DNA 甲基化水平的影响

Fig. 1 Effect of folic acid addition level in the diet on total DNA methylation level of 4-day-old larvae

柱上标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 同。

Histograms with the same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while with the different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as Fig. 2.

2.8 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂新蜂重的影响

如图 2 所示, 随叶酸添加剂量的增加新蜂重呈现先升高后降低的趋势; 叶酸添加剂量为 0.04% 时, 新蜂重显著高于对照组 ($P < 0.05$); 叶酸添加剂量为 0.08% 和 0.10% 时, 新蜂重显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.9 饲粮中添加叶酸对意大利蜜蜂发育历期的影响

饲粮叶酸添加水平对意大利蜜蜂幼虫发育历期的影响见图 3。叶酸添加剂量为 0.04% 时, 幼虫的发育历期显著低于对照组和其它试验组 ($P < 0.05$), 相较于对照组缩短了 0.79 d; 叶酸添加剂量为 0.10% 时, 幼虫的发育历期显著高于对照组 ($P < 0.05$), 延长了 1.08 d。

表 8 饲粮中叶酸添加水平对幼虫化蛹率和羽化率的影响

Table 8 Effect of folic acid addition level in the diet on pupation rate and eclosion rate of larvae

项目 Items	组别 Groups					
	CK	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%
化蛹率 (%) Pupation rate (%)	95.40 ± 0.75a	91.10 ± 4.02a	91.10 ± 1.10a	87.67 ± 2.84a	71.13 ± 2.94b	68.77 ± 9.84b
羽化率 (%) Eclosion rate (%)	95.40 ± 0.75a	96.55 ± 0.08a	91.10 ± 1.10ab	87.63 ± 2.81b	73.35 ± 1.93c	94.33 ± 2.85a

同行数据后标有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 同行数据后标有不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Date followed by the same letters in the same row indicate no significant difference ($P > 0.05$), while followed by the different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

叶酸代谢能够产生四氢叶酸 (THF)、5, 10-亚甲基四氢叶酸 (5, 10-MTHF) 及 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF) 等中间产物。一碳单位与 THF 结合以后可以在不同的氧化态之间相互转化, 5, 10-亚甲基四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸和 10-甲酰基四氢叶酸各自支持不同的生物合成功能, 包括为嘌呤合成、蛋氨酸循环途径 (通过同型半胱氨酸甲基化) 和胸苷酸合成贡献一碳单元 (Ducker and Rabinowitz, 2016)。本文通过对蜂体叶酸代谢物的含量分析发现, 饲粮中添加 0.04% 叶酸的试验组 3、4 和 5 日龄幼虫的 5-MTHF 含量显著

高于对照组, 依据高 5-MTHF 含量推测蜂体含有较多的一碳单元, 同时试验发现 *SHMT* 基因的表达量显著高于对照组, 说明丝氨酸和甘氨酸转化活跃, 推测在该浓度下蜂体进行活跃的叶酸代谢, 通过中间产物向核苷酸合成提供碳原子, 进而促进核酸和蛋白质的合成, 使得该处理下幼虫生长速率更快。在其它动物上也有类似的发现, 在生长期肉用隆林黑山羊饲料中添加叶酸, 具有与单胃动物相似的效果, 可加快山羊体内嘌呤和嘧啶的生物合成、氨基酸的甲基化过程, 从而提高肝脏对血清蛋白质的合成能力, 使生长期肉用隆林黑山羊血清总蛋白、血清白蛋白含量升高 (段赛星等, 2009)。

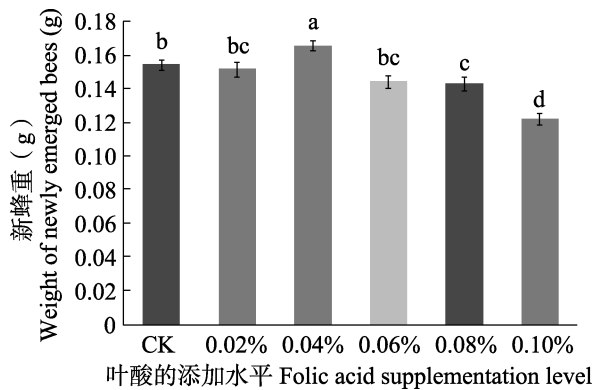


图2 饲料中叶酸添加水平对新蜂重的影响

Fig. 2 Effect of folic acid addition level in the diet on the weight of newly emerged bees

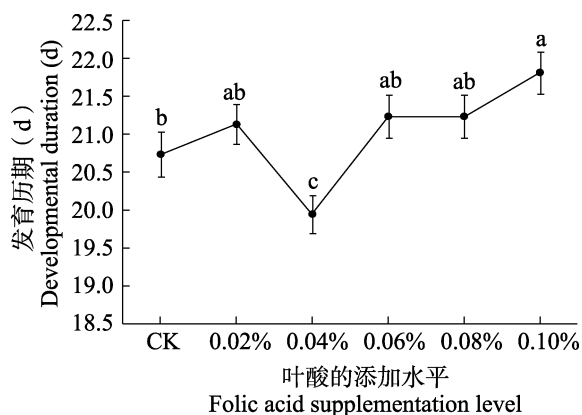


图3 饲料中叶酸添加水平对发育历期的影响

Fig. 3 Effect of folic acid addition level in the diet on developmental duration

图中标有相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

The same lowercase letters on the map indicate no significant difference ($P > 0.05$), while with the different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 和二氢叶酸还原酶 (DHFR) 是叶酸代谢的关键酶 (Wang *et al.*, 2012; Bhatia *et al.*, 2020)。因此, 本研究选取 MTHFR 和 DHFR 进行分析。对各组不同发育时期的蜂体基因表达分析发现, 饲料中添加 0.04% 叶酸的试验组显著提高了幼虫时期 (3、4 和 5 日龄) 蜂体的 DHFR 和 MTHFR 基因表达量, 同时显著提高了幼虫期 MTHFR 酶活性, 推测饲料中 0.04% 的叶酸添加能够促进蜜蜂的叶酸代谢。这可能是当添加浓度为 0.04% 时, 蜂体能最大限度地进行叶酸的吸收转运, 在适宜的添加剂量下, 叶酸代谢的关键酶拥有适宜的底物浓度,

从而进行活跃的酶促反应。杨光波 (2010) 的研究发现基础日粮 2.5 mg/kg 叶酸添加组的仔猪肝脏 MTHFR 基因表达量显著高于对照组, 并且能够促进仔猪肝脏蛋白质的合成; 另有研究表明孵化期 11 胚龄进行叶酸处理可提升肉仔鸡体重并且显著影响 1 日龄和 42 日龄肉仔鸡肝脏 MTHFR 基因的表达量 (支丽慧, 2014)。

日粮中氨基酸、微量元素和维生素等除了作为营养物质外, 亦可参与动物特殊生理阶段的生长发育调控。叶酸作为一种 B 族维生素, 因其参与一碳单位代谢而与 DNA 甲基化具有密不可分的联系 (Crider *et al.*, 2012)。研究发现用 Dnmt3 siRNA 处理 1 龄幼虫出现了更高比例的蜂王个体, 相比之下, 对照组幼虫发育出更高比例的工蜂, 说明 Dnmt3 对蜂王发育是负调控的 (Kucharski *et al.*, 2008); Shi 等 (2011) 研究发现幼虫采食期采食更长时间的蜂王浆, 6 日龄时幼虫头部的 DNMT3 酶活性和基因相对表达量均下调, 对应到表型上表现为更高比例的蜂王个体; 10-羟基-2-癸烯酸 (10-HDA) 是一种蜂王浆中特有的脂肪酸, Wang 等 (2014) 研究发现在基础日粮中添加 10-HDA, 随着添加剂量的增加 3 龄幼虫 Dnmt3 的表达水平最初下调之后上调, 与之对应的表型为羽化新蜂体重呈现持续降低趋势; 王丽 (2017) 测定了蜂王和工蜂 2 种级型 3、4 和 5 日龄 DNA 甲基化相关的基因表达和酶活性差异, 发现 3、4 和 5 日龄蜂王 DNMT3 的酶活性均高于工蜂, 而 Dnmt3 基因的表达水平在 3 日龄和 4 日龄时蜂王个体高于工蜂个体, 5 日龄时蜂王个体低于工蜂个体; 联系这些已发表的成果我们可以看到 Dnmt3 对蜜蜂的幼虫期起到复杂的调控作用, 对于以上 Dnmt3 的不同应答推测该基因的表达及其酶活性不仅与试验条件等外部环境有关还与虫体本身的发育阶段及取样部位有关, 日龄不同部位不同该基因的应答模式可能会存在较大差异。本试验通过在基础日粮中添加不同剂量的叶酸, 3 日龄时饲料中添加 0.04% 叶酸的试验组蜂体 DNMT3 的酶活性显著低于对照组, 4 日龄时饲料中添加 0.04% 叶酸的试验组蜂体 Dnmt3 的基因表达量显著低于对照组, 相对应的 DNMT3 的酶活性显著低于对照组

且达到所有组间最低值, 对应到表型上, 添加 0.04% 叶酸试验组的蜜蜂发育历期显著降低, 新蜂重显著增加, 更偏向于蜂王型个体, 这个试验结果更偏向于 Shi (2011) 的结果, 即发育早期 *Dnmt3* 负调控蜜蜂于蜂王方向的分化。

幼虫 4 日龄时, 饲料中添加 0.04% 叶酸试验组蜂体的 DNA 甲基化水平降低, 同时表型上偏向于蜂王, 这和 Shi 等 (2013) 的研究有相似性, 他们通过甲基化 DNA 免疫沉淀测序技术发现 4 日龄蜂王幼虫 DNA 甲基化的比率低于工蜂幼虫。Wang 等 (2020) 同样研究发现, 4 日龄时蜂王幼虫的甲基化水平低于工蜂幼虫。有趣的是, 我们在对 4 日龄幼虫总 DNA 甲基化水平分析时发现, 饲料中添加 0.06% 叶酸的试验组, 蜂体的 DNA 甲基化水平同样显著低于对照组, 但在表型上却偏向于工蜂, 结合饲料中添加 0.06% 叶酸的试验组中 4 日龄蜂体的叶酸代谢酶活性显著降低的结果, 我们推测饲料中 0.06% 的叶酸添加剂量对幼虫叶酸代谢有抑制作用, 由此带来了生长发育的抑制现象, 结果反应出该组幼虫的羽化率降低, 更深层次的原因需要后续试验进行探究。

蜂王和工蜂不仅外部形态和内部解剖有明显不同, 而且在生理和行为上也有巨大差异。意大利蜜蜂蜂王体重约 300 mg, 工蜂体重约 100 mg, 蜂王体型明显大于工蜂。蜂王与工蜂发育时间不同, 蜂王比工蜂未封盖期少 1 d, 封盖期少 4 d, 所以从卵到成蜂, 蜂王需要 16 d, 工蜂需要 21 d。本研究发现, 饲料中添加 0.04% 叶酸的试验组平均出房新蜂重 0.17 g, 对照组为 0.15 g; 饲料中添加 0.04% 叶酸的试验组平均发育历期 19.95 d, 对照组平均发育历期 20.74 d。说明饲料中添加 0.04% 的叶酸有助于雌性蜜蜂幼虫向蜂王方向发育。

综上所述, 蜜蜂幼虫饲料中添加适宜水平的叶酸能促进幼虫的叶酸代谢过程, 影响 DNA 甲基化过程, 缩短幼虫发育历期, 增加出房新蜂重, 从而对蜜蜂的发育产生促进作用。饲料中添加 0.04% 的叶酸有助于雌性蜜蜂幼虫向蜂王方向发育。

参考文献 (References)

- Anand M, Pant NC, 1988. Vitamin requirement of *Rhizoptera dominica* (Fabricius). *Indian Journal of Entomology*, 50(1): 476–479.
- Baker JE, 1975. Vitamin requirements of larvae of *Sitophilus oryzae*. *Journal of Insect Physiology*, 21(7): 1337–1342.
- Bhatia M, Thakur J, Suyal S, Oniel R, Chakraborty R, Pradhan S, Sharma M, Sengupta S, Laxman S, Masakapalli K, Bachhawat AK, 2020. Allosteric inhibition of MTHFR prevents futile SAM cycling and maintains nucleotide pools in one carbon metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(47): 16037–16057.
- Blatch SA, Stabler SP, Harrison JF, 2015. The effects of folate intake on DNA and single-carbon pathway metabolism in the fruit fly *Drosophila melanogaster* compared to mammals. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2015 (189): 34–39.
- Choi SW, Friso S, Keyes MK, Mason JB, 2005. Folate supplementation increases genomic DNA methylation in the liver of elder rats. *British Journal of Nutrition*, 93(1): 31–35.
- Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB, 2012. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Advances in Nutrition*, 3(1): 21–38.
- Duan SX, Chen XQ, Yang YB, Xu GX, Pang ZK, 2009. Study on the effect of folic acid on serum protein in captive Longlin black sheep. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2009(9): 228–229. [段赛星, 陈兴乾, 杨膺白, 徐高骛, 庞则鹏, 2009. 叶酸对圈养隆林黑山羊血清蛋白质的影响研究. 现代农业科技, 2009(9): 228–229.]
- Ducker GS, Rabinowitz JD, 2016. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metabolism*, 25(1): 27–42.
- Elango N, Hunt BG, Goodisman MAD, Yi SV, 2009. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27): 11206–11211.
- Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S, Jacobsen SE, Robinson GE, Maleszka R, 2012. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 109(13): 4968–4973.
- Harington JS, 1960. Synthesis of thiamine and folic acid by *Nocardia rhodnii*, the micro-symbiont of *Rhodnius prolixus*. *Nature*, 188(4755): 1027–1028.
- Jiang Y, Li JX, Ren F, Ji C, Aniaqu S, Chen T, 2019. PM2.5-induced extensive DNA methylation changes in the heart of zebrafish

- embryos and the protective effect of folic acid. *Environmental Pollution*, 255(Pt3): 113331.
- Jordan AM, Trewern MA, 1973. Sub-lethal effect of sulphaquinoxaline on the tsetse fly, *Glossina austeni* Newst. *Nature*, 245(5426): 462–462.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827–1830.
- Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R, 2010. The honey bee epigenomes: Differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biology*, 8(11): e1000506.
- Noland JL, Lilly JH, Baumann CA, 1949. Vitamin requirements of the cockroach *Blattella germanica* (L.). *Annals of the Entomological Society of America*, 42(2): 154–164.
- Racch B, Applebaum SW, Tahori AS, 1973. The role of folic acid in the appearance of alate forms in *Myzus persicae*. *Journal of Insect Physiology*, 19(9): 1849–1855.
- Saxena SC, Kaul S, 1974. Qualitative vitamin requirements of *Oryzaephilus mercator* fauvel and their deficiency effects on the survival and growth of F1-progeny. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 82(1): 49–54.
- Schaefer M, Lyko F, 2007. DNA methylation with a sting: An active DNA methylation system in the honeybee. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(3): 208–211.
- Shi YY, Huang ZY, Zeng ZJ, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, 2011. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PLoS ONE*, 6(4): e18808.
- Shi YY, Yan WY, Huang ZY, Wang ZL, Zeng ZJ, 2013. Genomewide analysis indicates that queen larvae have lower methylation levels in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*, 100(2): 193–197.
- Sohn KJ, Stempak JM, Reid S, Shirwadkar S, Mason JB, Kim YI, 2003. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. *Carcinogenesis*, 24(1): 81–90.
- Vandenberg JD, Shimanuki H, 1987. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *Journal of Apicultural Research*, 26(2): 90–97.
- Wang HF, Liu ZG, Wang Y, Ma LT, Xu BH, 2020. Genome-wide differential DNA methylation in reproductive, morphological, and visual system differences between queen bee and worker bee (*Apis mellifera*). *Frontiers in Genetics*, 11: 770.
- Wang L, 2017. Effects of methionine borne methyl donors on the caste determination of honey bee (*Apis mellifera* L.). Master dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [王丽, 2017. 蛋氨酸源甲基供体对意大利蜜蜂级型分化的影响. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Wang WJ, Gao JS, Wang J, Liu CL, Meng Y, 2012. Cloning, expression and enzymatic properties analysis of dihydrofolate reductase gene from the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 39(12): 10285–10291.
- Wang WX, Tian LQ, Huang Q, Wu XB, Zeng ZJ, 2014. Effects of 10-Hydroxy-2-decenoic acid on the development of honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Journal of Apicultural Research*, 53(1): 171–176.
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799): 645–647.
- Yang GB, 2010. Effects of dietary supplementation of folic acid on the growth performance, serum biochemical parameters and hepatic folate metabolism-related gene expressions in weaned piglets. Master dissertation. Chengdu: Sichuan Agricultural University. [杨光波, 2010. 饲料添加叶酸对断奶仔猪生长性能、血清指标以及肝脏叶酸代谢基因表达的影响. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学.]
- Yu XQ, 2014. Study of the effect of folic acid on fat deposition and the underlying epigenetic mechanisms in chicken. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [喻小琼, 2014. 叶酸对鸡脂肪沉积的影响及表观遗传调控机制研究. 硕士学位论文, 北京: 中国农业科学院.]
- Zeng ZJ, 2009. Apiology. Beijing: China Agriculture Press. 35–36. [曾志将, 2009. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 35–36.]
- Zeng ZJ, 2020. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]
- Zhi LH, 2014. The nutri-epigenetic mechanism of immune function regulated by folic acid in broilers during incubation period. Master dissertation. Yangling: Northwest A&F University. [支丽慧, 2014. 胚期叶酸调控肉仔鸡免疫功能的营养表观遗传机制. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学.]