



吡虫啉对蜜蜂行为与生理影响研究进展*

张祖芸^{1,2**} 李震¹ 曾志将^{1***}

(1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045; 2. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 蒙自 661101)

摘要 蜜蜂是一种社会性昆虫,也是重要的授粉昆虫,对发展农业生产、维护生态环境和物种多样性有极其重要的意义。吡虫啉是一种活性高、杀虫谱广的新烟碱类杀虫剂,对蜜蜂等传粉昆虫造成潜在危害。本文主要从吡虫啉对蜜蜂的作用机制、暴露途径、代谢过程、行为影响等方面进行叙述,重新评估蜜蜂接触杀虫剂的“安全水平”,从而确定最安全有效的施用浓度,为我国新烟碱类杀虫剂对蜜蜂安全性评价工作提供参考。

关键词 吡虫啉, 蜜蜂, 行为, 生理影响, 亚致死效应

Progress in research on the effects of imidacloprid on the behavior and physiology of honeybees

ZHANG Zu-Yun^{1,2**} LI Zhen¹ ZENG Zhi-Jiang^{1***}

(1. Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China)

Abstract The honeybee is a social insect and an essential pollinator that is vital for agriculture, horticulture, and the maintenance of the ecological environment and species diversity. Imidacloprid is a new type of neonicotinoid insecticide with a widespread insecticidal spectrum that is potentially harmful to pollinating insects such as bees. This paper reviews recent research on the toxic mechanism, exposure pathway, metabolic processes and behavioral effects, of imidacloprid on honeybees. We reassess the "safety threshold" of pesticides with respect to honeybees, thereby promoting the safe and effective application of pesticides. This paper provides a useful reference for evaluating the effects of neonicotinoid insecticides on bees in China.

Key words imidacloprid, honeybees, behaviour, physiological effects, sublethal effects

蜜蜂是一种分工协作、信息共享的高度社会化昆虫。蜜蜂社会行为学特性一直受到广大生物学家关注 (Robinson *et al.*, 2008; Chittka and Peng, 2013), 一方面蜜蜂是重要授粉昆虫,对农业生产和生态环境起重要作用;另一方面蜜蜂是典型的社会性昆虫,对蜜蜂社会行为学及其机理研究结果对社会生物学有深远影响 (Perry and Barron, 2013; Garibaldi *et al.*, 2016)。

世界上已知有 16 万种由昆虫授粉的显花植

物,其中依靠蜜蜂授粉的占 85% (Garibaldi *et al.*, 2016)。目前全球范围内都出现了 CCD 现象 (Colony collapse disorder, 简称 CCD, 即蜂群衰竭失调病),蜜蜂数量锐减,而农作物依赖蜜蜂授粉的需求越来越大,进而出现“授粉危机” (Ratnieks and Carreck, 2010)。CCD 的成因至今不明,涉及许多因素,包括杀虫剂、病原体、寄生虫、营养不良、环境退化、气候变化等 (Cox-Foster *et al.*, 2007; Stokstad, 2012)。

*资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系 (CARS-44-kxj15) 和国家自然科学基金 (31572469)

**第一作者 First author, E-mail: zhangzuyun1984@aliyun.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2018-02-01, 接受日期 Accepted: 2018-04-23

新烟碱类杀虫剂是一类具有新型杂环化学结构的超高效杀虫剂,主要作用于昆虫的中枢神经系统,是烟碱型乙酰胆碱受体(nAChRs)的抑制剂,对害虫高效,对高等动物低毒的高选择性(陈立和徐汉虹,1998;唐振华等,2006)。吡虫啉是一种活性高、杀虫谱广的新型烟碱类杀虫剂,在农业生产上被广泛用于种子、叶面和土壤中多种害虫的防治,对环境的负面影响也逐渐显露,特别是亚致死剂量的新烟碱类杀虫剂对蜜蜂等传粉昆虫的潜在威胁,引起了世界各国的广泛关注(张敏恒等,2012)。

1 吡虫啉对蜜蜂的作用机制

吡虫啉为无色晶体,有微弱气味,溶于水,水解稳定性好。吡虫啉可分为乳油、微乳剂、可湿性粉剂、悬浮剂、水分散粒剂、种子处理剂和可溶液剂等多种剂型(华纯,2007)。

吡虫啉是新烟碱类杀虫剂的典型代表,是作为竞争性抑制剂选择性地抑制昆虫神经系统烟碱型乙酰胆碱受体。该受体位于神经节突触后膜,是一种在神经信号传递过程中起着重要调节作用的配体门控离子通道蛋白,属于半胱氨酸类受体(Cysteine receptor)家族。烟碱型乙酰胆碱受体是由5个亚基组成的五聚体蛋白,每个亚基包含的结构是:N端结构域(其中包含吡虫啉竞争性结合位点)、3个跨膜结构TM1-TM3、巨大的胞内环、跨膜结构域TM4和C端胞外区(Tomizawa *et al.*, 2003)。

吡虫啉能够模拟乙酰胆碱(Acetylcholine, ACh)的作用方式,竞争结合ACh的结合位点,导致ACh结合能力下降,从而抑制ACh与乙酰胆碱受体的结合,并且吡虫啉能模拟乙酰胆碱不停地刺激乙酰胆碱受体,使神经冲动持续性传导,从而破坏神经系统信号的正常传导,起到杀虫作用(史晓斌和王鹏,2010)。

Moffat等(2015)研究表明熊蜂慢性接触 $1\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 吡虫啉,会导致乙酰胆碱受体的敏感性增加,引起神经元细胞线粒体快速去极化,从而导致线粒体功能障碍,增加了神经元脆

弱性。同时深入研究在田间试验条件下, $2.5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的吡虫啉能够刺激熊蜂大脑蕈状体的肯扬细胞(Kenyon cells),进而影响熊蜂的嗅觉和学习记忆行为(Moffat *et al.*, 2016)。

2 吡虫啉对蜜蜂的暴露途径

蜜蜂之间的合作能力特别强大,采集蜂从远离蜂巢的地方采集蜜粉,由于新烟碱类杀虫剂内吸性好,植物会吸收药剂并掺入花粉或花蜜中(David *et al.*, 2016)。如果接触到了喷洒杀虫剂的植物,很有可能喷药剂的土壤颗粒或粉尘直接粘附在蜜蜂身上,采集蜂将会受到污染,接着可能把这些杀虫剂带回蜂巢,从而会影响整个蜂群的健康。

蜜蜂对杀虫剂高度敏感,主要危害有2个途径:一是对蜜源植物不科学喷洒杀虫剂,二是对蜂群过度使用杀螨剂。这两方面都可能造成蜜蜂接触杀虫剂产生直接危害,或造成杀虫剂残留在花蜜和花粉中形成潜在危害。

为了研究蜜蜂在田间环境的真实暴露情况,用花粉中含 $6\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $12\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 的吡虫啉,花蜜中含 $0.7\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.4\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 的吡虫啉模拟田间逼真浓度(Bonmatin *et al.*, 2005)。在Dupree的研究中,蜂群被放置在被吡虫啉种子处理剂的田间,从蜂群中收集花粉和花蜜。结果在花粉和花蜜中分别发现了 $4.4\text{--}7.6\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $0.60\text{--}0.81\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 的吡虫啉(Cutler *et al.*, 2007)。

Byrne等(2014)研究发现,在吡虫啉处理过的柑橘树中,检测到花蜜中吡虫啉的残留量在 $3\text{--}39\ \mu\text{g}/\text{L}$ 之间(实验组处于封闭状态中,对照组是开放的田间试验),其中试验组花蜜中吡虫啉的平均残留量为 $16.4\ \mu\text{g}/\text{L}$,蜜蜂采集该花蜜后蜂蜜中平均残留量为 $15.3\ \mu\text{g}/\text{L}$,对照组中花蜜的平均残留量为 $5.0\ \mu\text{g}/\text{L}$,蜂蜜的平均残留量为 $3.5\ \mu\text{g}/\text{L}$ 。

杀虫剂在田间的大量使用,不仅可以有效防控有害昆虫,对于不属靶标的授粉类昆虫也有一定危害(Garbuzov *et al.*, 2015; Goulson, 2015)。例如,蜜蜂和胡蜂接触亚致死剂量的吡

虫啉后会导致其学习、觅食和归航能力降低 (Yang *et al.*, 2012)。蜜蜂作为社会性昆虫的模式生物, 在采蜜粉的过程中, 会接触到暴露在空气中或者植物表面的残留杀虫剂, 进而影响蜜蜂的行为、营养物质代谢及免疫系统 (Kessler *et al.*, 2015)。

近年来, 研究报道了吡虫啉在水环境和人群生物样本中的暴露情况, 有关遗传毒理学试验显示吡虫啉具有一定的遗传毒性, 可以导致 DNA 及染色体完整性改变 (郭婧怡等, 2017)。基于吡虫啉在农作物、环境、人体中的检出状况和遗传毒性评价结果, 我们认为有必要对吡虫啉的暴露情况进行更深入的研究, 为制定吡虫啉的浓度限值及相关政策提供理论依据。

3 吡虫啉在蜜蜂体内的代谢

吡虫啉在进入昆虫体内 20 min 后, 可代谢 70%, 4-5 h 后可全部代谢。其中吡虫啉的 5 种代谢产物中, 有 2 种含有与吡虫啉相同的药效官能团, 继续作用于昆虫神经系统。36 h 后, 昆虫可通过自身免疫机制消耗吡虫啉的代谢产物 (Suchail *et al.*, 2004; Singaravelan *et al.*, 2006; Casida, 2011)。

Suchail 等 (2004) 用致死中量的吡虫啉处理西方蜜蜂 72 h 后, 研究其头部、胸部、腹部、血淋巴、中肠和直肠内吡虫啉及其代谢物的分布, 发现吡虫啉在蜜蜂体内的代谢物主要为羟基吡虫啉、4, 5-二羟基吡虫啉、6-氯吡啶-3-羧酸、烯式吡虫啉和吡虫啉脲。其中, 吡虫啉脲和 6-氯吡啶-3-羧酸作为吡虫啉的主要代谢物, 主要存在于中肠和直肠中, 烯式吡虫啉、4-羟基吡虫啉和 5-羟基吡虫啉则在头部、胸部和腹部中相对较多。

吡虫啉及其羟基化代谢产物的生物活性从大到小顺序为吡虫啉, 4-羟基吡虫啉, 5-羟基吡虫啉, 4, 5-二羟基吡虫啉 (Nauen *et al.*, 1998)。羟基化吡虫啉和烯式吡虫啉等具有硝基亚胺药效基团的代谢产物对蜜蜂具有毒性, 并且其中 5-羟基吡虫啉和烯式吡虫啉对蜜蜂的急性毒性

与吡虫啉相当; 而不具有药效基团的代谢产物吡虫啉脲和 6-氯吡啶-3-羧酸则对蜜蜂无毒 (Nauen *et al.*, 2001)。

生物体内参与农药代谢的解毒代谢酶系主要有细胞色素 P450s、水解酶、谷胱甘肽 S-转移酶等。在新烟碱类杀虫剂的生物代谢中, 目前研究和报道较多的生物酶主要是细胞色素 P450s 和醛氧化酶。P450s 是生物体内极为重要的代谢系统, 能催化多种外源物质如药物、杀虫剂、植物毒素等的氧化代谢 (Scott, 2008)。研究发现, 在新烟碱类杀虫剂的代谢方面, 微粒体 CYP450s 家族既能氧化吡虫啉的咪唑环又可还原其硝基部分 (范银君等, 2012)。

4 吡虫啉对蜜蜂生长发育和繁殖力的影响

孟丽峰等 (2013) 用蜜蜂急性毒性 LC_{50} 剂量的吡虫啉饲喂蜂群后, 不仅显著降低蜜蜂卵的孵化率, 还导致蜂王出现产卵量减少或者不产卵的现象。季守民等 (2015) 研究发现, 随着吡虫啉亚致死浓度的提高, 蜜蜂幼虫的平均死亡率提高, 平均幼虫重、平均蛹重、化蛹率、羽化率和发育成功率均降低。Gill 等 (2012) 研究表明饲喂低剂量的吡虫啉 2 周后, 能够影响蜜蜂卵的孵化以及幼虫的发育, 从而会影响整个种群数量以及分工配比。

Yang 等 (2012) 通过研究蜂巢中不同剂量的吡虫啉对蜜蜂幼虫的影响, 发现当吡虫啉剂量每蜂达到 24 ng 时, 不会影响蜜蜂幼虫的化蛹率和羽化率, 当处理剂量越高, 化蛹率和羽化率越低。Abbott 等 (2008) 用 30-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的吡虫啉饲喂蜜蜂, 延长蜜蜂幼虫的羽化时间, 对种群发育产生不良影响。

谭丽超等 (2016 年) 研究发现蜜蜂幼虫对吡虫啉的耐受性高于成蜂, 是由于吡虫啉作为乙酰胆碱受体的抑制剂, 而蜜蜂幼虫缺失许多乙酰胆碱酯酶, 例如蕈状体内的内源神经细胞, 即吡虫啉的靶细胞。

Whitehorn 等 (2012) 研究发现将蜂群放在

田间连续 2 周进行吡虫啉经口暴露后,其蜂王的产卵量会减少。Chaimanee 等 (2016) 用浓度为 0.2 $\mu\text{g/g}$ 的吡虫啉喂食蜂王 7 d 后,然后解剖蜂王的贮精囊,测量其中的精子活性,结果表明精子的活力下降了 50%,验证了杀虫剂会造成蜂王生殖能力下降。另外有研究发现喂食含有亚致死剂量吡虫啉的糖水后,蜜蜂拒绝采食,大量消耗巢内蜜粉,子圈面积缩小,出现不规则的子脾 (Decourtye *et al.*, 2004)。

5 吡虫啉对蜜蜂采集行为和学习行为的影响

蜜蜂是一种以群体为单位生活的社会性昆虫,通过对花的形状、颜色、气味和位置学习后对蜜源进行定位、采集 (丁桂玲, 2011)。新烟碱类杀虫剂会对蜜蜂大脑中敏感信息集成部分造成影响,包括信息定位部分。蜜蜂接触新烟碱类杀虫剂后,药剂会作用于蜜蜂的中枢神经系统,对神经元造成破坏,致使不能准确传递信息,从而影响蜂群的采集能力 (孟丽峰, 2013)。Henry 等 (2012) 在实验室研究中发现蜜蜂即使在很低剂量的吡虫啉暴露下,大脑功能也会受到严重影响。Lambin 等 (2001) 发现 100 $\mu\text{g/kg}$ 的吡虫啉会致使蜜蜂的活动能力减弱,对蜜蜂的采集行为产生消极影响。研究表明 0.21 ng/蜂 的吡虫啉会对蜜蜂的舞蹈语言造成影响,提高蜜蜂对糖水的反应阈值,减少招引舞蹈次数,延长卸蜜时间,导致飞行障碍和行动迟缓,这些可能是由蜜蜂体内神经调节物质章鱼胺来改变的 (Landgraf *et al.*, 2011; Eiri and Nieh, 2012)。

Decourtye 等 (2004) 研究发现,12-24 $\mu\text{g/kg}$ 的吡虫啉会导致蜜蜂的嗅觉和记忆能力被破坏,致使蜂群内缺乏食物,蜜蜂幼虫出现免疫力下降和发育不良等症状。Aliouane 等 (2009) 在实验室条件下通过经典喙伸反应测定蜜蜂对气味的识别能力,发现连续 11 d 用 48 h 连续条件下的吡虫啉蜜药混合液饲喂蜜蜂后,蜜蜂对气味的识别能力显著下降。亚致死剂量吡虫啉降低了蜜蜂嗅觉敏感性 (Ramirez-Romero *et al.*, 2005), 影

响蜜蜂的移动速度从而影响蜜蜂的回巢 (Medrzycki *et al.*, 2003), 影响蜜蜂采集行为,对蜜蜂的视觉和嗅觉学习产生不利影响,损伤蜜蜂跳舞交流信息的能力,并且使蜜蜂失去定位飞行的能力 (Schneider *et al.*, 2012)。Fischer 等 (2014) 用雷达追踪饲喂非致死剂量的蜜蜂,成功返巢的频率减少,正确转弯的概率减少,影响蜜蜂导航能力。

Kirchner (1999) 研究发现,吡虫啉能造成蜜蜂表现出消极的采集行为,产生拒食反应,驱避行为,学习障碍,巢内活动减少等。Schneider 等 (2012) 用无线射频识别技术 (RFID) 研究表明口服吡虫啉能够减少采集活动,或延长采集飞行时间等。Tan 等 (2014) 研究发现饲喂 40 $\mu\text{g/L}$ 吡虫啉的糖水,能够降低蜜蜂的采集次数和摄入量,减弱蜜蜂对食物质量的认知能力,减少招募交流,并且会降低对采食风险预估的能力。Tosi 等 (2017) 发现新烟碱类杀虫剂虽然不会立刻杀死蜜蜂,但会导致蜜蜂远距离飞行出现不规律的状况,由此打乱蜂群社会的稳定性,从而对蜂群产生致命杀伤力。

6 吡虫啉对蜜蜂生理免疫能力的影响及相关分子机理研究

研究发现亚致死剂量吡虫啉不但影响蜜蜂学习行为,而且对成年工蜂脑神经细胞具有凋亡作用,以及抑制蜜蜂脑内视叶中 nAChR- $\alpha 7$ 的表达量 (周婷等, 2013; 吴艳艳等, 2014)。Hatjina 等 (2013) 用吡虫啉 2.1 ng/g 的糖水和 2.7 ng/g 的花粉饲喂蜜蜂,检测到蜜蜂的咽下腺 (HPGs) 腺叶直径与对照组相比显著减小,并且影响腹部的呼吸节律,间隔时间增加,通气的平均持续时间减少,从而影响蜜蜂哺育行为和呼吸系统。Zhu 等 (2017) 利用吡虫啉与其它 7 种杀虫剂进行二元混合物进行喷涂,蜜蜂的酯酶、乙酰胆碱酯酶等活性降低,而蜜蜂主要依靠细胞色素 P450s 等解毒,在这过程中,酯酶和乙酰胆碱酯酶作用明显减少。两种杀虫剂配合使用,对蜜蜂的毒性增强。

Wu 等 (2017) 用不同亚致死浓度 (0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 吡虫啉处理蜜蜂, 检测蜜蜂的行为反应和转录变化。结果显示亚致死浓度的吡虫啉并不能影响蜜蜂的存活与糖水的消耗, 但增加了对水的摄入量, 8 d 以后, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度组的蜜蜂攀爬能力受损严重。RNA 序列分析得出, 与肌肉相关的基因显著下调, 从而导致蜜蜂攀爬能力受损; GO (Gene ontology) 分析得出体蛋白基因上调, 进而导致细胞功能紊乱。

Chaimanee 等 (2016) 用亚致死剂量的吡虫啉饲喂蜂王和工蜂, 并进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明: 蜂王和工蜂体内的 P450 基因家族、CYP306A1、CYP4G11 和 CYP6AS14 的表达水平均有所降低, 这些基因是调控蜜蜂体内抗氧化剂合成的关键基因, 而抗氧化剂能够抵御化合物对蜜蜂的伤害。同时发现经过吡虫啉饲喂后, 工蜂体内的残翅病病毒 (Deformed wing virus, 简称 DWV) 的复制频率也会增加。Diao 等 (2018) 利用隐形感染低剂量慢性蜜蜂麻痹病毒 (CBPV) 的成蜂, 口服不同剂量吡虫啉, 96 h 后发现, CBPV 的浓度显著提高, 并与之呈正相关, 加剧了蜜蜂的死亡率。表明在蜜蜂持续受到 CBPV 感染后, 急性接触吡虫啉会对蜜蜂的生存产生负面影响, 加快病毒快速复制, 进一步的扩散和传播, 导致蜂群衰竭。同时说明, 急性杀虫剂的接触可能改变蜜蜂对病毒感染的耐受力。

Alaux 等 (2010) 研究发现, 传染性微生物体与吡虫啉结合可以使蜜蜂体内的葡萄糖氧化酶的活性降低, 使蜜蜂对细菌与病原体更加敏感。研究表明, 蜜蜂暴露在亚致死剂量的吡虫啉下, 会更容易被蜜蜂微孢子虫 (Nosema) 感染 (Pettis *et al.*, 2013)。2013 年, 用亚致死剂量的吡虫啉饲喂过的蜜蜂体内的抗毒病蛋白减少, 更容易感染病毒, 引起这些的原因可能是蜜蜂体内抗病毒蛋白的一些免疫信号通道受损, 免疫应答神经元受到了破坏 (Di Prisco *et al.*, 2013)。Brandt 等 (2016) 研究用 1-10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的吡虫啉等 3 种杀虫剂饲喂的蜜蜂, 检测细胞免疫参数, 血细胞密度降低、包囊反应和血淋巴的抗菌活性减少。说明吡虫啉能够影响蜜蜂

的免疫系统, 增加寄生虫和病原菌的侵染。

Abbo 等 (2016) 研究指出, 亚致死剂量的吡虫啉能够明显降低蜜蜂卵黄原蛋白的滴度, 这是一种与能量守恒有关的卵黄前体, 能够调节蜜蜂的发育和行为。说明对新烟碱类的亚致死暴露可能导致蜜蜂的能量消耗增加, 因为解毒是一种消耗能量的代谢过程, 而卵黄原蛋白可以作为一种有用的生物标志物, 用于测定杀虫剂对蜜蜂的能量胁迫和亚致死效应。

Wu 等 (2017) 研究表明, 在蜜蜂幼虫时接触亚致死剂量的吡虫啉后, 成年后蜜蜂的行为发生异常, 主要由于神经系统反应异常。检测刚出房成年工蜂头部的全部基因表达变化, 发现有 578 个基因表达发生了 2 倍以上的变化。列如, 利用荧光定量 PCR 对 6 d 的哺育蜂进行分析, 发现基因编码主要的蜂王浆蛋白 (MRJRs) 表达下调, 该蛋白对蜂群发展具有重要作用, 下调后可能进一步削弱蜂群。

Li 等 (2017) 研究表明吡虫啉能够作用中华蜜蜂的化学感受蛋白 (CSP1) 并抑制其功能。吡虫啉降低 CSP1 的荧光强度, 影响化学感受蛋白的疏水作用, 该蛋白主要是由色氨酸构成, 色氨酸的疏水性随着吡虫啉浓度的增加而降低。圆二色性光谱表明, 吡虫啉能够降低 CSP1 的 α -螺旋结构和肽链的延伸。这些揭示了亚致死剂量的新烟碱药物的分子物理化学机制, 并抑制了蜜蜂化学反应系统的生理功能。

Christen 将 (2016) 蜜蜂暴露在几种不同浓度新烟碱类杀虫剂下, 选择 8 个转录调控相关的基因进行评估, 检测乙酰胆碱受体 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚基, 卵黄原蛋白多功能基因、免疫系统相关的抗菌肽基因、防御基因、压力相关的过氧化氢酶基因、记忆相关的蛋白激酶 A (pka) 和环磷腺苷效应元件结合蛋白 (creb) 等转录合成的靶标基因。暴露在吡虫啉等新烟碱类杀虫剂的田间试验条件下, 卵黄原蛋白基因表达上调, 而记忆相关的 2 个基因 (pka, creb) 表达下调。卵黄原蛋白基因调控导致蜜蜂的采集活动产生消极影响, 2 个基因 (pka, creb) 表达下调, 可能损害蜜蜂的长期记忆。这将从转录调控等

方面解释长期暴露在杀虫剂环境浓度下对蜜蜂造成的负面效应。

Simmons 和 Angelini (2017) 用吡虫啉饲喂熊蜂, 用实时荧光定量 PCR 检测不同暴露时间和剂量下熊蜂抗菌肽 4 个基因家族的表达情况。结果表明熊蜂抗菌肽 abaecin, apidaecin 和 hymenoptaecin 的表达量随着吡虫啉浓度的增加而增加。结果表明吡虫啉能够损伤熊蜂的免疫功能, 在野外或栖息地喷洒农药, 会对熊蜂造成致命伤害。

可见杀虫剂等农药对蜜蜂的影响是多方面的, 不但造成工蜂的大量死亡, 即使低浓度仍可影响蜜蜂的发育, 引起蜜蜂生理和行为的改变, 危及蜂群的健康发展 (宋怀磊, 2011)。同时以吡虫啉为着眼点, 开展新烟碱类杀虫剂靶标的分子生物学研究, 在细胞分子水平上进行蜜蜂毒性机理研究, 虽然蜜蜂的中毒机理目前仍不明确, 亟需进一步探讨和研究, 但新的分子生物学方法将帮助人们揭示杀虫剂对蜜蜂的毒性机理。

7 进一步的研究方向及展望

随着蜜蜂授粉作用的突出, 各种杀虫剂对蜜蜂毒性评价体系将会成为一项新的研究热点, 有必要建立一套更为精确, 且受实验条件影响更小的检测方法来评价农药对蜜蜂的毒性。在养蜂领域, 研究吡虫啉对蜜蜂亚致死效应的作用机理, 不但可以预防和减轻杀虫剂对蜜蜂的危害, 而且为建立一套“有害物质对蜜蜂的毒性评价体系”奠定实验及理论基础。然而实验室中吡虫啉对蜜蜂的影响与实际生产中可能有很大差异, PER 试验作为研究毒物对蜜蜂的行为反应是很有效的方法, 可以很好的设置处理或条件参数, 但还不能确定它是衡量亚致死剂量杀虫剂危害的可靠指标, 因此开展田间条件下吡虫啉对蜜蜂种群的亚致死效应是未来研究的重点。

蜜蜂除了通过信息素与其他个体之间交流, 还会通过翅的振动与舞蹈动作进行信息传递。亚致死剂量吡虫啉除了影响蜜蜂的学习记

忆外, 是否还对蜜蜂之间的信息传递有影响, 尚未可知。目前杀虫剂对蜜蜂的影响研究仅存在几个蜂种内, 例如蜜蜂属的西方蜜蜂、东方蜜蜂, 熊蜂属、麦蜂属等, 而其它有益的野生传粉蜂类研究甚少。吡虫啉等杀虫剂对其它蜂种的危害程度、毒性作用机理、致死和亚致死效应等需要进一步研究, 对蜜蜂种群的繁衍和生物多样性保护提供参考。

除了避免接触农药, 对于如何预防蜜蜂中毒, 缺乏其它有效的防护途径, 尤其缺少在蜂群中毒后的缓解与治疗手段, 这些均严重制约着养蜂业和授粉产业的健康发展, 因此进行各种有毒物质对蜜蜂毒性的机理研究具有重要的意义。此外, 蜜蜂作为一种公认的环境污染的“生物指示器”, 以蜜蜂为研究对象进行生态环境毒理学及环境毒性风险评估的研究同样具有重要的理论及现实意义。杀虫剂中毒引起的蜜蜂死亡及亚致死效应严重制约着养蜂业的发展。但是为了农业防治病虫害, 人们在农业生产中还必须使用杀虫剂, 杀虫剂还无法被完全代替。因此, 研究新型高效低毒绿色农药, 如生物杀虫剂等, 并进一步制定相应的防护措施, 对于保护这种授粉昆虫具有重要的价值。同时继续研究蜜蜂与异种生物之间的相互作用, 不仅仅限于病源体感染、物候和种群遗传, 还将成为新杀虫剂开发时蜜蜂健康评价的基础。

参考文献 (References)

- Abbo PM, Kawasaki JK, Hamilton M, Cook SC, DeGrandi-Hoffman G, Li WF, Liu J, Chen YP, 2016. Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Science*, 24(3): 467–477.
- Abbott VA, Nadeau JL, Higo HA, Winston ML, 2008. Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(3): 784–796.
- Alaux C, Brunet J, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Balducci A, Belzunces L, Le Conte Y, 2010. Interactions between nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12(3): 774–782.

- Aliouane Y, Hassani AKE, Gary V, 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1): 113–122.
- Bonmatin JM, Marchand PA, Charvet R, Moineau I, Bengsch ER, Colin ME, 2005. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13): 5336–5341.
- Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R, 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.*, 86(1): 40–47.
- Byrne FJ, Visscher PK, Leimkuehler B, Fischer D, Grafton-Cardwell EE, Morse JG, 2014. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Manag. Sci.*, 70(3): 470–482.
- Casida JE, 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J. Agric. Food Chem.*, 59(7): 2923–2931.
- Chaimanee V, Evans JD, Chen Y, Jackson C, Pettis JS, 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera* L.) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89: 1–8.
- Chen L, Xu HH, 1998. A review on the insecticidal mechanism of imidacloprid a new nicotinic insecticide. *Journal of Hubei Agricultural College*, 18(1): 85–88. [陈立, 徐汉虹, 1998. 新型烟碱型杀虫剂吡虫啉作用机制研究进展. 湖北农学院学报, 18(1): 85–88.]
- Chittka L, Peng F, 2013. Caffeine boosts bees' memories. *Science*, 339(6124): 1157–1159.
- Christen V, Mittner F, Fent K, 2016. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50(3): 4071–4081.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, VanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.
- Cutler GC, Scott-Dupree CD, 2007. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *Ecotoxicology*, 100(3): 765–772.
- David A, Bot í as C, Abaul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D, 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment International*, 88: 169–178.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charretton M, Pham-Delegue MH, 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotox. Environ. Safe*, 57(3): 410–419.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F, 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(46): 18466–18471.
- Diao QY, Li BB, Zhao HX, Wu YY, Guo H, Dai PL, Chen DF, Wang Q, Hou CS, 2018. Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: A Chinese case study. *Science of the Total Environment*, 630(2): 487–494.
- Ding GL, 2011. Larvae pheromone and foraging behavior of honeybees. *Apiculture of China*, 62(10): 48. [丁桂玲, 2011. 幼虫信息素与蜜蜂的采集行为. 中国蜂业, 62(10): 48.]
- Eiri DM, Nieh JC, 2012. A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *J. Exp. Biol.*, 215(Pt 12): 2022–2029.
- Fan YJ, Shi XY, Gao XW, 2012. Research progresses on the metabolism of neonicotinoids imidacloprid and thiamethoxam. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 14(6): 587–596. [范银君, 史雪岩, 高希武, 2012. 新烟碱类杀虫剂吡虫啉和噻虫嗪的代谢研究进展. 农药学报, 14(6): 587–596.]
- Fischer J, Müller T, Spatz AK, Greggers U, Grunewald B, Menzel R, 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS ONE*, 9(3): e91364.
- Garbuzov M, Couvillon MJ, Schürch R, Ratnieks FLW, 2015. Honey bee dance decoding and pollen-load analysis show limited foraging on springflowering oilseed rape, a potential source of neonicotinoid contamination. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 203: 62–68.
- Garibaldi LA, Carvalheiro LG, Vaissiere BE, Gemmill-Herren B, Hipolito J, Freitas BM, Ngo HT, Azzu N, Saez A, Astrom J, An J, Blochtein B, Buchori D, Chamorro GF, Oliveira DSF, Devkota K, Ribeiro MF, Freitas L, Gaglianone MC, Goss M, Irshad M, Kasina M, Pacheco FA, Kiill LH, Kwapong P, Parra GN, Pires C, Pires V, Rawal RS, Rizali A, Saraiva AM, Veldtman R, Viana BF, Witter S, Zhang H, 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351(6271): 388–391.
- Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual and colony level traits in bees. *Nature*, 491(7422): 105–108.

- Goulson D, 2015. Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field; a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. *PeerJ*, 31(2): 390–409.
- Guo JY, Gao Y, Tian Y, 2017. Research progress on imidacloprid exposure and genotoxicity. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 34(11): 1013–1018. [郭婧怡, 高宇, 田英, 2017. 吡虫啉暴露及其遗传毒性研究进展. *环境与职业医学*, 34(11): 1013–1018.]
- Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Boga M, Emmanouil C, Arnold G, 2013. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie (Celle)*, 44(4): 467–480.
- Henry M, Béguin M, Requier F, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6101): 348–350.
- Hua C, 2007. Imidacloprid and its formulation. *Modern Agrochemicals*, 6(4): 11–13. [华纯. 2007. 浅议吡虫啉的剂型. *现代农药*, 6(4): 11–13.]
- Ji SM, 2015. Toxicity evaluation and sublethal effects of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. Master thesis. Jinang: Shandong Agricultural University. [季守民, 2015. 新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的毒性评价及亚致死效应. 硕士学位论文. 济南: 山东农业大学.]
- Kessler S, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, Stout JC, Wright GA, 2015. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*, 521(7550): 74–85.
- Kirchner WH, 1999. Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid (“Gaucho”) on the behavior of honey-bees. *Apidologie*, 30: 422.
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M, 2001. Imidacloprid induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48(3): 129–134.
- Landgraf T, Rojas R, Nguyen H, Kriegel F, Stettin K, 2011. Analysis of the waggle dance motion of honeybees for the design of a biomimetic honeybee robot. *PLoS ONE*, 6(8): e21354.
- Li H, Tan J, Song X, Wu F, Tang M, Hua Q, Zheng H, Hu F, 2017. Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2): 391–397.
- Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatini AG, Maini S, Porrini C, 2003. Effects of imidacloprid administered in sublethal doses on honey bee behaviour laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 56(1): 59–62.
- Meng LF, 2013. Effects of imidacloprid on activities of detoxifying enzymes and development on *Apis mellifera*. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [孟丽峰, 2013. 吡虫啉对蜜蜂解毒酶和生长发育的影响. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院蜜蜂研究所.]
- Moffat C, Buckland ST, Samson AJ, McArthur R, Chamosa Pino V, Bollan KA, Huang JT, Connolly CN, 2016. Neonicotinoids target distinct nicotinic acetylcholine receptors and neurons, leading to differential risks to bumblebees. *Sci. Rep.*, 6: 24764.
- Moffat C, Pacheco JG, Sharp S, Samson AJ, Bollan KA, Huang J, Buckland ST, Connolly CN, 2015. Chronic exposure to neonicotinoids increases neuronal vulnerability to mitochondrial dysfunction in the bumblebee (*Bombus terrestris*). *The FASEB Journal*, 29(5): 2112–2119.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R, 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.*, 57(7): 577–586.
- Nauen R, Tietjen K, Wagner K, Elbert A, 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Sci.*, 52(1): 53–57.
- Perry CJ, Barron AB, 2013. Honey bees selectively avoid difficult choices. *PNAS*, 110(47): 19155–19159.
- Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, Vanengelsdorp D, 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 8(7): e70182.
- Ramirez-Romero R, Josette C, Pham-Delègue MH, 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36(9): 601–611.
- Ratnieks FLW, Carreck NL, 2010. Clarity on honey bee collapse. *Science*, 327(5692): 152–153.
- Robinson GE, Fernald RD, Clayton DF, 2008. Genes and social behavior. *Science*, 322(5904): 896–900.
- Schneider CW, Tautz J, Grunewald B, Fuchs S, 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Ais mellifera*. *PLoS ONE*, 7(1): e30023.
- Scott JG, Liu N, 2008. Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification. *Recent Advances in Insect Physiology Toxicology & Molecular Biology*. 117–124.
- Shi XB, Wang P, 2010. Research progress on insect resistance and mechanism to imidacloprid. *Agrochemicals Research & Application*, 14(2): 1–3. [史晓斌, 王鹏, 2010. 吡虫啉的抗性现状及其机理研究进展. *农药研究与应用*, 14(2): 1–3.]
- Simmons WR, Angelini DR, 2017. Chronic exposure to a neonicotinoid increases expression of antimicrobial peptide

- genes in the bumblebee *Bombus impatiens*. *Scientific Reports*, 7: 44773.
- Singaravelan N, Inbar M, Néeman G, Distl M, Wink M, Izhaki I, 2006. The effects of nectar-nicotine on colony fitness of caged honeybees. *J. Chem. Ecol.*, 32(1): 49–58.
- Song HL, 2011. sublethal dose of deltamethrin and imidacloprid for *Apis mellifera ligustica* L. (Hymenoptera: Apidae). Master's thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [宋怀磊, 2011. 亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica* L.). 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Stokstad E, 2012. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. *Science*, 335(6076): 1555.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP, 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag. Sci.*, 60(3): 291–296.
- Tan K, Chen W, Dong S, Liu X, Wang Y, Nieh JC, 2014. Imidacloprid alters foraging and decreases bee avoidance of predators. *PLoS ONE*, 9(7): e102725.
- Tan LC, Bu YQ, Cheng Y, Zhou JY, Shan ZJ, 2016. Indoor toxicity research of imidacloprid on honeybee larvae. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 11(4): 253–257. [谭丽超, 卜元卿, 程燕, 周军英, 单正军, 2016. 吡虫啉对蜜蜂幼虫的室内毒性研究. *生态毒理学报*, 11(4): 253–257.]
- Tang ZH, Tao LM, Li Z, 2006. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides and management strategies. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 8(3): 195–202. [唐振华, 陶黎明, 李忠, 2006. 害虫对新烟碱类杀虫剂的抗药性及其治理策略. *农药学报*, 8(3): 195–202.]
- Tomizawa M, Zhang N, Durkin KA, Olmstead MM, Casida JE, 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinic cation- π interaction model. *Biochemistry*, 42(25): 7819–7827.
- Tosi S, Burgio G, Nieh JC, 2017. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Scientific Reports*, 7(1): 1201.
- Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D, 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079): 351–352.
- Wu MC, Chang YW, Lu KH, Yang EC, 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 88(7): 16.
- Wu YY, Luo QH, Hou CS, Wang Q, Dai PL, Gao J, Liu Y, Diao QY, 2017. Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Scientific Reports*, 7(1): 15943.
- Wu YY, Zhou T, Wubie AJ, Wang Q, Dai PL, Jia HR, 2014. Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) brain induced by imidacloprid. *Acta Entomologica Sinica*, 57(2): 194–203. [吴艳艳, 周婷, Wubie AJ, 王强, 代平礼, 贾慧如, 2014. 吡虫啉对成年意大利蜜蜂脑神经细胞致凋亡作用. *昆虫学报*, 57(2): 194–203.]
- Yang E, Chang H, Wu W, 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11): e49427.
- Zhang MH, Zhao P, Yan QX, Li X, 2012. The market and environmental impact of the neonicotinoid insecticides. *Agrochemicals*, 51(12): 859–962. [张敏恒, 赵平, 严秋旭, 李新, 2012. 新烟碱类杀虫剂市场与环境影响. *农药*, (12): 859–962.]
- Zhou T, Song HL, Wang Q, Dai PL, Wu YY, Sun JH, 2013. Effects of imidacloprid on the distribution of nicotine acetylcholine receptors in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*). *Acta Entomologica Sinica*, 56(11): 1258–1266. [周婷, 宋怀磊, 王强, 代平礼, 吴艳艳, 孙继虎, 2013. 吡虫啉对意大利蜜蜂脑乙酰胆碱受体分布的影响. *昆虫学报*, 56(11): 1258–1266.]
- Zhu YC, Yao JX, Adamczyk J, Luttrell R, 2017. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 12(5): e0176837.