

# 不同注射条件对中华蜜蜂工蜂微量注射后生存的影响

刘佳霖<sup>1,2</sup> 李亚迎<sup>2</sup> 罗文华<sup>1</sup> 曹兰<sup>1</sup> 高丽娇<sup>1</sup> 刘怀<sup>2</sup>

(1 重庆市畜牧科学院, 荣昌 402460; 2 西南大学植物保护学院, 重庆 400715)

**摘要:** 为了优化中华蜜蜂成年工蜂的微量注射技术, 明确不同注射条件对工蜂注射后的影响, 本研究利用单因素试验评价了不同注射日龄、麻醉方式、注射部位及注射量对工蜂微量注射后 15d 生存的影响。结果表明: 7 日龄和 12 日龄工蜂微量注射后的生存风险显著高于 3 日龄工蜂 ( $P < 0.01$ ); 工蜂从背部第 2~3 腹节节间膜注射后的平均生存时间显著低于从第 3~4 腹节、第 4~5 腹节和第 5~6 腹节节间膜注射 ( $P < 0.01$ ); 低温麻醉和注射量 ( $0.5 \mu\text{L}$ 、 $1.0 \mu\text{L}$  和  $2.0 \mu\text{L}$ ) 不能显著影响工蜂注射后的生存 ( $P > 0.05$ )。说明低日龄的工蜂更适宜于开展中华蜜蜂的微量注射试验, 在注射前, 低温麻醉工蜂可提高微量注射的效率, 推荐的注射方法为: 从中华蜜蜂工蜂背部第 4~5 腹节节间膜微量注射  $1.0 \mu\text{L}$  的注射液。

**关键词:** 微量注射; 中华蜜蜂; 生存; 日龄; 麻醉; 注射部位; 注射量

## Effect of Different Injection Conditions on the Survival of *Apis cerana cerana* Workers after Micro-injection

Liu Jialin<sup>1,2</sup>, Li Yaying<sup>2</sup>, Luo Wenhua<sup>1</sup>, Cao Lan<sup>1</sup>, Gao Lijiao<sup>1</sup>, Liu Huai<sup>2</sup>

(1 Chongqing Academy of Animal Sciences, Rongchang 402460, China;

2 College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** To improve the micro-injection of *Apis cerana cerana* workers, and determine the effects of different injection conditions on the honey bees, we used the single-factor experiments to evaluate the effects of day-old of bees, anesthesia method, injection site, and injection volume on the survival of workers after injection during 15d. The results showed that the survival risk of honey bees at 7-day-old and 12-day-old after micro-injection was significantly higher than at 3-day-old ( $P < 0.01$ ). The mean survival time of 3-day-old bees which micro-injected dorsally between the second and third abdominal segment was significantly lower than that between the third and fourth, fourth and fifth, and fifth and sixth abdominal segment ( $P < 0.01$ ). Cold anesthesia and injection volume did not affect the survival of honey bees after micro-injections ( $P > 0.05$ ). Our results suggested that young honey bees were more suitable for the micro-injection of *A. cerana cerana* workers and cold anesthesia before injection could improve the efficiency of the experiment. The recommended micro-injection method was that *A. cerana cerana* workers were dorsally injected with  $1 \mu\text{L}$  injecta between the fourth and fifth abdominal segment.

**Key words:** micro-injection; *Apis cerana cerana*; survival; day-old; anesthesia; injection site; injection volume

蜜蜂成年工蜂的微量注射技术已广泛应用于蜜蜂的生物学研究。在蜜蜂的 RNA 干扰试验中, 利用微量注射技术将目的基因的 dsRNA 注入工蜂体内, 可干扰目的基因的表达, 进而评价目的基因的功能<sup>[1]</sup>。例如, 中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 工蜂微量注射  $0.5 \mu\text{L}$  *CYP301A1*、*CYP303A1* 和 *CYP306A1* 的 dsRNA

能够显著降低虫体对应目的基因的相对表达量, 而下调的这 3 个 P450 (Cytochrome P450 monooxygenases) 基因能够显著提高工蜂饲喂敌敌畏、噻虫嗪、百草枯和溴氰菊酯后的死亡率, 表明 P450 家族基因参与了中华蜜蜂对多种农药的解毒代谢<sup>[2]</sup>。此外, 通过微量注射 dsRNA 干扰卵黄原蛋白 vitellogenin 基因的表达

基金项目: 重庆市科研机构绩效激励引导专项 (cstc2019jxjl80007); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (cars-45-syz15)

作者简介: 刘佳霖 (1988-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为授粉昆虫生物学研究, E-mail: liujialin5164@163.com

通讯作者: 刘怀 (1967-), 男, 教授, 博士, 研究方向为昆虫生态、有害生物监测与可持续治理研究, E-mail: liuhuai@swu.edu.cn

©1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中国蜂业

能够显著增加西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的嗅觉敏感性<sup>[3]</sup>, 干扰 *IRS* (Insulin receptor substrate) 基因的表达能够改变工蜂的采集行为<sup>[4]</sup>。这些研究表明, 基于成年工蜂微量注射的 RNA 干扰技术对研究蜜蜂基因的功能具有十分重要的作用。与此同时, 工蜂的微量注射还应用于评价不同物质及病原微生物对蜜蜂的影响, 如微量注射章鱼胺和酪胺能够显著影响蜜蜂的运动行为<sup>[5]</sup>。注射接种蜜蜂残翅病毒能够显著降低工蜂的寿命, 下调卵黄原蛋白 *vitellogenin* 基因的相对表达量; 同时暴露于 DWV 和噤虫嗉的工蜂表现出更低的寿命, 并导致工蜂提前开始采集行为<sup>[6]</sup>。注射接种蜜蜂以色列急性麻痹病毒能够改变采集蜂的嗅觉敏感性, 降低采集结束后的回巢成功率<sup>[7]</sup>。

尽管蜜蜂成年工蜂的微量注射技术已广泛地应用于蜜蜂的生物学研究, 但不同注射条件是否能够显著影响工蜂注射后的生存仍没有相关报道。因此, 本研究基于以前研究中的蜜蜂成年工蜂微量注射方法, 通过单因素试验评价了不同注射日龄、麻醉方式、注射部位及注射量对工蜂注射后 15d 生存的影响, 以优化蜜蜂成年工蜂的微量注射技术, 降低微量注射对蜜蜂的影响, 为后续开展相关试验奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 试验材料

本试验于 2020 年 9 月在重庆市荣昌区重庆市畜牧科学院进行, 试验蜜蜂为重庆本地中华蜜蜂, 2 个配置有姐妹蜂王的试验蜂群在自然条件下现代活框饲养, 试验蜂群群势为 5 足框蜂 (2 牌子脾和 2 脾蜜粉脾), 试验期间周围环境日平均温度 21~27℃。试验开始前, 将即将出房的封盖子脾带回实验室, 并放置在黑暗的人工气候箱 (34℃, 相对湿度 70%) 中过夜培养, 以获得新出房的工蜂。待工蜂出房后, 24h 内将来自不同蜂群的 33~35 只新出房工蜂随机移入塑料饲喂盒 (17cm × 10cm × 7cm) 中饲养, 每个饲喂盒提供 3mL 50% (w/w) 的蔗糖溶液, 并放入另一个人工气候箱 (30℃, 相对湿度 60%) 中黑暗饲养。每天更换饲喂盒中的蔗糖溶液。根据后续试验设计, 新出房的工蜂连续饲喂 3d、7d 和 12d 后用于中华蜜蜂成年工蜂的微量注射试验。

### 1.2 主要仪器

人工气候箱 (RXZ 智能型), 购自宁波江南仪器厂;

微量注射器 (7632-01), 购自美国 Hamilton 公司; 微量注射器针头 (30G), 购自美国 Hamilton 公司。

## 2 方法

基于已有研究的蜜蜂成年工蜂微量注射方法<sup>[3, 8-10]</sup>及预实验结果, 本研究选择的基础注射条件为: 3 日龄工蜂, 不麻醉, 从中华蜜蜂工蜂背部的第 4~5 腹节节间膜注入 1μL 的 DEPC 水。通过单因素试验评价不同注射日龄、麻醉方式、注射部位及注射量对工蜂注射后 15d 生存的影响。每个处理注射 30 只工蜂, 并重复 3 次。注射完成后的 30 只工蜂被放入一个新的饲喂盒中, 提供 3mL 50% 的蔗糖溶液, 置于人工气候箱 (30℃, 相对湿度 60%) 中黑暗饲养。试验共计持续 15d, 每天记录各组工蜂的死亡数, 移除死亡的工蜂, 并更换蔗糖溶液。

### 2.1 不同注射日龄对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

新出房的工蜂饲喂 50% 的蔗糖溶液 3d、7d 和 12d 后用于微量注射试验。3 日龄、7 日龄或 12 日龄的工蜂, 不麻醉, 从背部的第 4~5 腹节节间膜注入 1μL 的 DEPC 水。3 个日龄的工蜂于同一天上午完成注射, 注射完成后的工蜂被放入新的饲喂盒中, 提供蔗糖溶液, 每天检查工蜂的生存情况。

### 2.2 不同麻醉方式对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

用玻璃试管取 2~3 只 3 日龄的工蜂插入冰内放置 2~3min (低温麻醉), 待工蜂被麻醉后, 将工蜂取出并从背部的第 4~5 腹节节间膜注入 1.0μL 的 DEPC 水, 同时设置不麻醉对照组。注射完成后的工蜂被放入新的饲喂盒中, 提供蔗糖溶液, 每天检查工蜂的生存情况。

### 2.3 不同注射部位对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

3 日龄的工蜂, 不麻醉, 分别从背部的第 2~3 腹节、第 3~4 腹节、第 4~5 腹节或第 5~6 腹节节间膜注入 1.0μL 的 DEPC 水。注射完成后的工蜂被放入新的饲喂盒中, 提供蔗糖溶液, 每天检查工蜂的生存情况。

### 2.4 不同注射量对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

3 日龄的工蜂, 不麻醉, 从背部的第 4~5 腹节节间膜注入 0.5μL、1.0μL 或 2.0μL 的 DEPC 水。注射完成后的工蜂被放入饲喂盒中, 提供蔗糖溶液, 每天检查工蜂的生存情况。

### 2.5 统计学分析

试验数据的统计学分析在 SPSS 21.0 中实现。采用生存分析的 Kaplan-Meier estimator 获得不同试验组

工蜂的生存曲线,利用 Log-rank test 分析不同试验组生存曲线的统计学差异。与此同时,使用 Cox 比例风险回归模型(Cox proportional hazards model)获得不同注射条件与基础注射条件相比的风险比值,以明确不同注射条件对工蜂注射后生存的影响。当风险比值 <1 时,表明该注射条件对工蜂注射后生存的风险小于基础注射条件,当风险比值 >1 时,表明该注射条件对工蜂注射后生存的风险大于基础注射条件。当  $P < 0.05$  时,差异达到显著水平,当  $P < 0.01$  时,差异达到极显著水平。

### 3 结果与分析

#### 3.1 不同注射日龄对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

本研究显示,不同注射日龄能够显著影响中华蜜蜂工蜂注射后的生存时间(图 1A,  $\chi^2=24.82$ ,  $df=2$ ,  $P < 0.01$ )。7 日龄和 12 日龄工蜂注射后的平均生存时间分别为 9.22d ( $\chi^2=11.01$ ,  $P < 0.01$ ) 和 7.67d ( $\chi^2=23.82$ ,  $P < 0.01$ ), 极显著低于 3 日龄工蜂的 11.44d; 但 7 日龄工蜂和 12 日龄工蜂注射后的生存时间差异不显著 ( $\chi^2=3.16$ ,  $P > 0.05$ )。Cox 比例风险回归模型分析显示,与 3 日龄工蜂相比,7 日龄工蜂和 12 日龄工蜂注射后的风险比为 1.78 ( $\chi^2=9.33$ ,  $P < 0.01$ ) 和 2.38 ( $\chi^2=21.67$ ,  $P < 0.01$ ), 高日龄(7 日龄和 12 日龄)工蜂注射后的生存风险极显著高于 3 日龄工蜂。

#### 3.2 不同麻醉方式对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

如图 1B 所示,低温麻醉不能显著影响工蜂注射后的生存时间 ( $\chi^2=1.53$ ,  $df=1$ ,  $P > 0.05$ )。与不麻醉相比,中华蜜蜂工蜂低温麻醉后注射的风险比为 1.27, 虽然低温麻醉能够对工蜂注射后的生存产生更大的风险,但未达到显著水平 ( $\chi^2=1.44$ ,  $P > 0.05$ )。

#### 3.3 不同注射部位对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

不同注射部位能够显著影响工蜂注射后的生存时间(图 1C,  $\chi^2=134.28$ ,  $df=3$ ,  $P < 0.01$ )。工蜂从背部第 2~3 腹节节间膜注射后的平均生存时间为 4.48d, 极显著低于从第 3~4 腹节 ( $\chi^2=61.59$ ,  $P < 0.01$ )、第 4~5 腹节 ( $\chi^2=80.37$ ,  $P < 0.01$ ) 和第 5~6 腹节 ( $\chi^2=64.66$ ,  $P < 0.01$ ) 节间膜注射; 工蜂从第 3~4 腹节、第 4~5 腹节和第 5~6 腹节节间膜注射后的生存时间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。与第 4~5 腹节节间膜相比,从第 2~3 腹节、第 3~4 腹节和第 5~6 腹节节间膜注射的风险比为 4.91、1.27 和 1.24, 工蜂从背部第 2~3 腹节节间膜

微量注射的风险极显著高于从第 4~5 腹节节间膜注射 ( $\chi^2=72.42$ ,  $P < 0.01$ )。

#### 3.4 不同注射量对中华蜜蜂工蜂注射后生存的影响

注射量不能显著影响中华蜜蜂工蜂注射后的生存时间(图 1D,  $\chi^2=3.17$ ,  $df=2$ ,  $P > 0.05$ )。与 1.0  $\mu\text{L}$  相比,微量注射 0.5  $\mu\text{L}$  和 2.0  $\mu\text{L}$  的风险比为 1.04 ( $\chi^2=0.03$ ,  $P > 0.05$ ) 和 1.36 ( $\chi^2=2.39$ ,  $P > 0.05$ ), 差异不显著。

### 4 讨论

为了优化中华蜜蜂成年工蜂的微量注射技术,

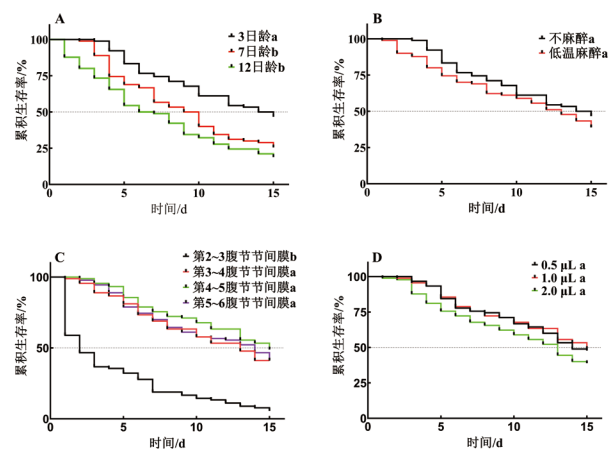


图1 不同注射条件对中华蜜蜂工蜂微量注射后生存的影响注:不同注射日龄(A)、麻醉方式(B)、注射部位(C)及注射量(D)对工蜂注射后生存的影响,不同小写字母表示差异显著(Log-rank test,  $P < 0.05$ )。

明确不同注射条件是否能够显著影响工蜂注射后的生存,本研究利用单因素试验评价了不同注射日龄、麻醉方式、注射部位及注射量对工蜂注射后 15d 生存的影响。结果显示,不同注射条件能够对工蜂注射后的生存产生不同的影响。工蜂进行微量注射时的日龄能够显著影响工蜂注射后的生存时间,7 日龄和 12 日龄工蜂微量注射后的生存风险显著高于 3 日龄工蜂。该结果表明,低日龄的工蜂可能更适宜于开展蜜蜂的微量注射试验。在以前的研究中,绝大部分学者采用低日龄(0~5 日龄)的工蜂进行微量注射<sup>[2,10-13]</sup>,间接表明利用低日龄的工蜂开展微量注射试验能够有效降低注射对蜜蜂的影响,提高后续试验的准确性。此外,本研究采用实验室饲养的方式获得不同日龄的工蜂,但长时间的实验室离群饲养可能会对工蜂产生不利的影响,进而提高微量注射对工蜂生存的风险。Li 等人<sup>[7]</sup>利用从蜂群中获得的采集蜂评价了注射接种 IAPV 对



蜜蜂嗅觉敏感性的影响,表明利用从蜂群中获得的高日龄工蜂开展微量注射试验可能降低了注射对蜜蜂的影响。因此,若必须选择高日龄的蜜蜂开展微量注射试验,建议直接从蜂群中选择对应日龄的工蜂,并缩短试验时间,以降低微量注射对后续试验结果的影响。

从工蜂腹部进行微量注射是以前研究中常用的注射方法,但不同研究中注射的部位存在很大差异<sup>[3, 5, 10, 11, 14]</sup>。本研究显示,中华蜜蜂工蜂从背部第2~3腹节节间膜注射后的平均生存时间显著低于从第3~4腹节、第4~5腹节和第5~6腹节节间膜注射,表明不同注射部位能够对工蜂产生不同的影响。腹部是蜜蜂消化和生殖的中心,包含复杂的消化、循环、呼吸、神经、生殖和分泌等系统<sup>[15]</sup>。从腹部不同的部位进行微量注射可能会对其内部的复杂结构造成不同的伤害,最终对工蜂产生不同的影响。在开展中华蜜蜂工蜂微量注射时,应选择从背部第3~4腹节、第4~5腹节或第5~6腹节节间膜进行注射,以降低微量注射对工蜂的影响。

低温麻醉是蜜蜂生物学研究中常用的麻醉方式<sup>[16-18]</sup>,也广泛应用于工蜂的微量注射<sup>[3, 7, 8]</sup>。本研究显示,低温麻醉并不能够显著影响工蜂注射后的生存。因此,低温麻醉仍是提高蜜蜂工蜂微量注射效率的有效方式。此外,本研究选择以前研究中常用的3个注射量(0.5 μL、1.0 μL和2.0 μL)<sup>[2, 5, 19]</sup>,评价了不同注射量对工蜂注射后生存的影响。结果显示,微量注射0.5 μL、1.0 μL和2.0 μL的DEPC水并不能显著影响注射后工蜂的生存,表明这3个注射量均可在工蜂的微量注射中使用。刘丽等人研究显示<sup>[10]</sup>,与微量注射1 μL和2 μL的DEPC水相比,注射3 μL和4 μL能够提高工蜂的死亡率,表明注射量的提高能够对蜜蜂产生更大的影响。因此,在实际的微量注射试验中,需要尽可能提高注射溶液的溶度,减少注射量,降低微量注射对工蜂的影响,以保证后续试验的准确性。

综上,本研究认为,低日龄的工蜂更适宜于开展中华蜜蜂的微量注射试验,在注射前可以采用低温麻醉工蜂的方式提高注射效率,推荐的注射方法为:从中华蜜蜂工蜂背部第4~5腹节节间膜微量注射1.0 μL的注射液。

#### 参考文献

[1] 刘芳,李志国,李文峰,等. RNAi技术在蜂学研究中的应用[J].

应用昆虫学报, 2011, 48(2): 417-420.

[2] Zhang W, Yao Y, Wang H, et al. The roles of four novel P450 genes in pesticides resistance in *Apis cerana cerana* Fabricius: expression levels and detoxification efficiency [J]. Front Genet, 2019, 10: 1000.

[3] Amdam G V, Norberg K, Page R E, et al. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*)[J]. Behav Brain Res, 2006, 169(2): 201-205.

[4] Wang Y, Mutti N S, Ihle K E, et al. Down-regulation of honey bee IRS gene biases behavior toward food rich in protein[J]. PLoS Genet, 2010, 6(4): e1000896.

[5] Fussnecker B L, Smith B H, Mustard J A. Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*)[J]. J Insect Physiol, 2006, 52(10): 1083-1092.

[6] Coulon M, Dalmon A, Prisco G D, et al. Interactions between thiamethoxam and deformed wing virus can drastically impair flight behavior of honey bees[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 766.

[7] Li Z, Chen Y, Zhang S, et al. Viral infection affects sucrose responsiveness and homing ability of forager honey bees, *Apis mellifera* L.[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77354.

[8] Schluns H, Crozier R H. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference[J]. Insect Mol Biol, 2007, 16(6): 753-759.

[9] Nunes F M F, Ihle K E, Mutti N S, et al. The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain[J]. J Exp Biol, 2013, 216(19): 3724-3732.

[10] 刘丽, 杨晓慧, 王瑞明. RNA干扰沉默KAT基因对蜜蜂合成10-HDA的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(4): 63-68.

[11] Antonio D S M, Guidugli-Lazzarini K R, Do Nascimento A M, et al. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers[J]. Naturwissenschaften, 2008, 95(10): 953-961.

[12] Brutscher L M, Daughenbaugh K F, Flenniken M L. Virus and dsRNA-triggered transcriptional responses reveal key components of honey bee antiviral defense[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6448.

[13] Formesyn E M, Cardoen D, Ernst U R, et al. Reproduction of honeybee workers is regulated by epidermal growth factor receptor signaling[J]. Gen Comp Endocr, 2014, 197: 1-4.

[14] 陈学新, 胡义镰, 何俊华, 等. 中蜂抗菌物质的诱导[J]. 昆虫知识, 1999, 36(4): 215-218.

[15] 曾志将. 蜜蜂生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

[16] Tan K, Wang C, Dong S, et al. The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17772.

[17] Bohme F, Bischoff G, Zebitz C P, et al. Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates[J]. Apidologie, 2017, 48(3): 353-363.

[18] Fleming J C, Schmehl D R, Ellis J D. Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera* L.)[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e132014.

[19] Amdam G V, Sim Es Z L P, Guidugli K R, et al. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA[J]. BMC Biotechnol, 2003, 3(1): 1.

编辑: 李瑞珍