



# 亚致死剂量吡虫啉胁迫对意大利蜜蜂工蜂嗅觉学习行为的影响及其脑部转录组分析

侯梦赏, 邱园妹, 赵必安, 蔚添添, 梁立强, 苏松坤, 李志国\*

(福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002)

**摘要:** 【目的】分析吡虫啉处理对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 嗅觉学习行为及脑部基因转录的影响, 为新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的负面影响提供依据。【方法】实验室条件下一次性饲喂意大利蜜蜂成年工蜂含有 4 ng 吡虫啉的 50% 蔗糖溶液, 以饲喂不含吡虫啉的 50% 蔗糖溶液为对照, 通过伸吻反应(proboscis extension response, PER) 行为实验测定其对意大利蜜蜂成年工蜂嗅觉学习行为的影响; 收集上述测试的意大利蜜蜂工蜂脑部提取 RNA, 进行 RNA-Seq 测序和生物信息学分析, 利用实时荧光定量 PCR 挑选 6 个差异表达基因( DEGs) 检测其在脑部的表达量以验证 RNA-Seq 测序结果。【结果】一次性饲喂意大利蜜蜂成年工蜂含 4 ng 吡虫啉的 50% 蔗糖溶液后, 意大利蜜蜂的嗅觉学习能力与对照组(饲喂 50% 蔗糖溶液) 相比显著降低。RNA-Seq 测序结果显示饲喂意大利蜜蜂含 4 ng 吡虫啉蔗糖溶液后, 处理组与对照组之间共有 123 个 DEGs [校正后的  $P$  值(  $p_{adj}$ ) < 0.05], 包括 82 个下调 DEGs 和 41 个上调 DEGs。GO 聚类分析发现下调 DEGs 主要富集在 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶活性、酸性磷酸酶活性、氧化还原酶活性、蛋白质异二聚化活性等, 上调 DEGs 主要富集在跨膜受体活性、分子传感器活性、神经学系统过程等功能条目。KEGG 富集分析显示下调 DEGs 主要富集在核糖体和溶酶体等细胞器、碳代谢和色氨酸代谢等代谢通路及 Toll 和 Imd 信号通路, 上调 DEGs 未富集在 KEGG 代谢通路。荧光定量 PCR 结果显示测试的 6 个 DEGs 相对表达量变化趋势与 RNA-Seq 测序结果 FPKM( fragments per kilobase million) 值变化趋势一致, 证明 RNA-Seq 测序结果可靠。【结论】亚致死剂量吡虫啉胁迫意大利蜜蜂成年工蜂显著降低意大利蜜蜂的嗅觉学习能力, 影响意大利蜜蜂脑部免疫解毒等相关基因的表达和酶活性及氧化还原等生物代谢过程; 亚致死剂量吡虫啉短时胁迫会刺激意大利蜜蜂的嗅觉感觉过程及神经信号传导过程。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 吡虫啉; 学习行为; 转录组; 差异表达基因

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2021)07-0817-11

## Effects of a sublethal dose of imidacloprid on the olfactory learning behavior of *Apis mellifera ligustica* workers and an analysis of their brain transcriptomes

HOU Meng-Shang, QIU Yuan-Mei, ZHAO Bi-An, YU Tian-Tian, LIANG Li-Qiang, SU Song-Kun, LI Zhi-Guo\* ( College of Animal Sciences ( College of Bee Science ), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** 【Aim】 This study aims to analyze the effect of imidacloprid treatment on the olfactory learning behavior and the gene transcription in the brain of *Apis mellifera ligustica* so as to provide evidence for the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702192); 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4)

作者简介: 侯梦赏, 男, 1995年3月生, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: hhousm@sina.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhiguo.li@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-11-02; 接受日期 Accepted: 2021-02-05

negative effects of neonicotinoid insecticides on honeybees. 【Methods】 Under laboratory conditions, *A. m. ligustica* adult workers were fed with 50% sucrose solution containing 4 ng imidacloprid at one time, with those fed with 50% sucrose solution without imidacloprid as the control, and its effect on the olfactory learning behavior of *A. m. ligustica* adult workers was measured via proboscis extension response (PER) behavior test. Total RNA was extracted from the brain of *A. m. ligustica* workers tested above for RNA-Seq sequencing and bioinformatics analysis. To verify the RNA-Seq sequencing results, the expression levels of six selected differentially expressed genes (DEGs) in the brain of *A. m. ligustica* adult workers were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. 【Results】 The olfactory learning ability of *A. m. ligustica* adult workers fed with 50% sucrose solution containing 4 ng imidacloprid was significantly decreased as compared to the control group (fed with 50% sucrose solution). RNA-Seq sequencing results showed that there were 123 DEGs [adjusted  $P$ -value ( $p_{adj}$ )  $< 0.05$ ] between the treatment group and the control group, including 82 down-regulated DEGs and 41 up-regulated DEGs. GO enrichment analysis revealed that the down-regulated DEGs were mainly enriched in S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity, acid phosphatase activity, oxidoreductase activity, and protein heterodimerization activity. The up-regulated DEGs were mainly enriched in functional items such as transmembrane receptor activity, molecular transducer activity, and neurological system processes. KEGG enrichment analysis showed that the down-regulated DEGs were mainly enriched in such organelles as ribosome and lysosome, metabolism pathways like carbon metabolism and tryptophan metabolism, and Toll and IMD signaling pathways, while the up-regulated DEGs were not enriched in KEGG pathways. Real-time fluorescent quantitative PCR results showed that the relative expression levels of the six DEGs tested showed the same trend with the RNA-Seq sequencing results of FPKM (fragments per kilobase million) value, verifying the reliability of the sequencing results. 【Conclusion】 Exposure of sublethal dose of imidacloprid significantly reduces the olfactory learning ability of *A. m. ligustica* adult workers, and also affects the expression of immune and detoxification related genes, enzyme activity, redox and other biological metabolic processes in the brain of *A. m. ligustica*. Short-term stress of sublethal dose of imidacloprid can stimulate the olfactory sensory process and nerve signal transduction process of *A. m. ligustica*.

**Key words:** *Apis mellifera ligustica*; imidacloprid; learning behavior; transcriptome; differentially expressed genes

随着新烟碱类农药的大范围使用,蜜蜂的健康与生存受到了巨大的威胁(van der Sluijs *et al.*, 2013)。新烟碱类农药是典型的系统性神经毒性农药,主要作用于昆虫突触后膜的烟碱型乙酰胆碱受体,刺激神经信号传导,促使神经元亢奋,导致昆虫死亡(Belzunces *et al.*, 2012)。蜜蜂作为新烟碱类农药的非靶标昆虫,在出巢采集过程中会经常遭受低剂量农药的胁迫,导致蜜蜂处于一种亚致死胁迫状态,损害蜜蜂的嗅觉学习记忆行为、归巢行为和舞蹈行为(Gonalons and Farina, 2015)等,还可以与其他致病因子协同作用进而影响蜜蜂的健康(Pettis *et al.*, 2015)。

前人研究表明,吡虫啉对单头成年意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 24 h 急性致死中量  $LD_{50}$  为

7.8 ~ 118.74 ng (Laurino *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017), 而从新烟碱类农药的环境残留及蜜蜂的采蜜量分析,大部分农药残留剂量并不会造成蜜蜂急性致死,而会对蜜蜂造成亚致死影响,因此研究农药对蜜蜂的亚致死效应更为重要。蜜蜂的脑部大约有 100 万个神经细胞,支撑着蜜蜂的学习记忆行为(Srinivasan, 2009),蜜蜂脑部含有大量易与吡虫啉结合的烟碱型乙酰胆碱受体,吡虫啉胁迫蜜蜂后阻断胆碱能神经元和章鱼胺能信号传递(Nauen *et al.*, 2001),产生大量的活性氮与活性氧,与相对应的生物大分子相互作用,影响线粒体呼吸链,导致神经元供能不足,降低氧化应激反应,损害蜜蜂的学习记忆行为(Farooqui, 2013)。虽然关于不同剂量、不同类型杀虫剂胁迫对意大利蜜蜂学习记忆行为的研究已

有诸多报道,然而关于吡虫啉胁迫影响蜜蜂学习记忆行为的脑部基因表达变化模式等分子机制报道尚少。

Karahan 等(2015)通过一次饲喂单头意大利蜜蜂含 7.2 ng 吡虫啉的蔗糖溶液后,发现该剂量吡虫啉对蜜蜂采集行为产生亚致死影响。本研究通过一次饲喂单头意大利蜜蜂含 4 ng 吡虫啉的蔗糖溶液,经过 3 次伸吻反应(proboscis extension response, PER)行为实验后,探究亚致死剂量吡虫啉胁迫对意大利蜜蜂工蜂学习行为的影响及对蜜蜂脑部转录组分析,探究吡虫啉胁迫影响蜜蜂学习行为的分子机制,分析比较对照组与吡虫啉胁迫组蜜蜂的联想性嗅觉学习行为差异,进一步比较这两组蜜蜂脑部转录组差异表达情况,分析影响蜜蜂学习行为的相关基因表达情况及其调控通路,以期为后续相关研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试蜜蜂的准备

意大利蜜蜂取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)实验蜂场。从 3 个蜂群中取 3 张老熟意大利蜜蜂子脾,装入限王产卵框中,在恒温恒湿培养箱中培养(温度 34.5℃,相对湿度 70%),每天收集 3 张子脾的刚出房意大利蜜蜂(1 日龄成蜂),使用荧光笔标记后放入蜂群中饲养。从蜂群中抓取标记的 18 日龄意大利蜜蜂成年工蜂放入玻璃小瓶中并置于冰盒里冷冻麻痹,然后使用特制的固定装置固定意大利蜜蜂,使头部留在管外,保证意大利蜜蜂吻部可以自由伸出,将固定好的意大利蜜蜂置于恒温恒湿培养箱中(温度 30℃,相对湿度 70%)用于接受亚致死剂量吡虫啉处理。

### 1.2 亚致死剂量吡虫啉处理意大利蜜蜂成年工蜂

吡虫啉纯品(Sigma) 0.01 g 溶于 50 mL 丙酮中,制成 200 ng/ $\mu$ L 的吡虫啉母液,使用 50% 的蔗糖溶液稀释吡虫啉母液到 2 ng/ $\mu$ L,处理组意大利蜜蜂饲喂含 2 ng/ $\mu$ L 吡虫啉的 50% 蔗糖溶液 2  $\mu$ L,对照组意大利蜜蜂饲喂含对应剂量丙酮的 50% 蔗糖溶液 2  $\mu$ L。实验中,使用移液枪饲喂意大利蜜蜂,饲喂后置于恒温恒湿培养箱中(温度 30℃,相对湿度 70%) 2 h。

### 1.3 PER 行为实验

1.2 节处理 2 h 后的意大利蜜蜂成年工蜂置于实验台上,选择对 50% 蔗糖溶液触碰触角有伸吻反

应的意大利蜜蜂工蜂作为实验对象,参考 Bitterman 等(1983)和 Sandoz 等(1995)的气味联想性学习过程。每头蜜蜂重复学习 3 次,每次学习行为间隔 10 min。记录在前 2 s 只给予柠檬气味时蜜蜂伸吻状况。对照组与处理组每次各测试 50 头意大利蜜蜂成年工蜂,实验重复 3 次。在 3 次学习训练完成后,液氮冻毙,收取蜜蜂头部储存在 -80℃ 冰箱,用于后续实验。

### 1.4 cDNA 文库构建和测序

解剖 1.3 节处理组和对照组蜜蜂成年工蜂脑部,对照组与处理组各收集 3 个样本,每个样本 20 头蜜蜂脑部。使用 TRIZOL 法提取样本总 RNA,并利用 NanoDrop2000 核酸浓度测定仪测定 RNA 的质量和浓度。样本检测合格后, mRNA 为模板,在 M-MuLV 反转录酶反应体系中合成 cDNA 的第 1 链,随后用 RNaseH 降解 RNA 链,在 DNA polymerase I 反应体系下合成 cDNA 第 2 条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾及连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选纯化 PCR 产物,最终获得 cDNA 文库。使用 Qubit2.0 进行初步定量,随后使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测,以确保文库质量。测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成,使用 IlluminaHiSeq<sup>TM</sup> 2500 测序平台。

### 1.5 测序数据分析

得到 1.4 节测序原始数据后,利用 Illumina HiSeq 2000 分析数据,去除带接头的 reads; 去除无法确定碱基信息的 reads; 去除低质量 reads。原始数据经过过滤、测序错误率检查、GC 含量分布检查,通过测序数值 Phred( $Q_{phred}$ )对测序数据进行质量评估,获得后续分析使用的有效读段(clean reads),选用 HISAT 软件将过滤后的有效读段映射到意大利蜜蜂参考基因组上进行基因组定位分析。通过 featureCounts(v1.5.0-p3)计算映射到每个基因上的 clean reads 数目,根据 FPKM(fragments per kilobase million)计算基因表达量,将数据进行归一化处理。使用 DESeq2(R package, version 1.16.1)软件分析对照组和处理组样本的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),在 GO 富集数据库和 KEGG 数据库基础上,利用 clusterProfiler R package 软件对差异表达基因进行注释、功能富集分析和通路富集分析。

### 1.6 荧光定量 PCR 验证

为了进一步验证 RNA 测序所得基因表达变化趋势的准确性,随机选择 6 个 DEGs,包括防御素 1

基因 *Def1*、葡萄糖脱氢酶基因 *LOC410734*、酯酶 A2 基因 *LOC406105*、葡萄糖氧化酶基因 *LOC406081*、酸性磷酸酶基因 *AcpH-1* 和气味受体基因 *Or10* 进行荧光定量 PCR 验证, *Actin* 为内参基因 (Villar and Grozinger, 2017), 引物序列见表 1。提取 1.3 节收集蜜蜂脑部总 RNA, 反转录合成 cDNA。使用 TaKaRa 公司的 SYBR® Premix Ex Taq™ II

(TliRNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应。反应体系 (10  $\mu$ L): SYBR Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus) (2  $\times$ ) 5  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L。每个基因做 3 个样本重复和 3 个技术重复。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5'-3') Primer sequences	产物长度(bp) Product size	基因描述 Gene description
<i>Actin</i>	GB44311	F: CCTAGCACCATCCACCATGAA R: GAAGCAAGAATTGACCCACCAA	87	Actin 相关蛋白 Actin-related protein
<i>Def1</i>	GB41428	F: CCTTCTTTCATGGCTATGGTTGCT R: TTCTATGTCTGTCGGCAGGTTCTTC	104	防御素 1 Defensin 1
<i>LOC410734</i>	GB43007	F: CGATCCAGCCGAACAGGTGAAG R: TGGGTCAGGTTGGCAGATTC	175	葡萄糖脱氢酶 Glucose dehydrogenase
<i>LOC406105</i>	GB43571	F: GATACCGTTCGCAACACCTCCTG R: TGGCTGACGCTGAGAGCAGTAAT	124	酯酶 A2 Esterase A2
<i>LOC406081</i>	GB44549	F: GCTCGGTGAACACTCCTCAACTG R: TGATTGTGAAGTTCTCGCCAATC	121	葡萄糖氧化酶 Glucose oxidase
<i>AcpH-1</i>	GB12546	F: TGGAGCGTGGCAATTGACTAAC R: GCGACTACGAGTTCCAGAGACATT	169	毒液酸性磷酸酶 Venom acid phosphatase
<i>Or10</i>	GB52369	F: TGCCGCATCTGAACAGTATCGTG R: CGTCGATTCTCCTCCGTGGCTAT	127	气味受体 10 Odorant receptor 10

## 1.7 数据分析

使用 SPSS 软件的  $\chi^2$  检验分析吡虫啉胁迫对意大利蜜蜂工蜂嗅觉学习行为的影响; 用 DESeq2 分析差异基因的表达, 并使用校正后的  $P$  值 ( $p_{adj}$ ) 分析转录组测序结果; 采用比较  $C_T$  值法计算目的基因的相对表达量 (目的基因表达量 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), 采用独立样本  $T$  检验对处理组和对照组意大利蜜蜂的基因表达进行差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 吡虫啉胁迫对意大利蜜蜂学习行为的影响

如图 1 所示, 对 148 头 4 ng 吡虫啉处理的 (吡虫啉处理组) 意大利蜜蜂和 154 头丙酮处理的 (对照组) 意大利蜜蜂成年工蜂进行 PER 行为实验, 在第一次嗅觉学习过程中, 两组意大利蜜蜂均未对气味表现伸吻行为。对照组意大利蜜蜂在第 2 次和第 3 次的嗅觉学习过程中, 伸吻反应率分别达到 60% 和 62%, 处理组意大利蜜蜂伸吻反应率分别达到 19% 和 41%, 两组意大利蜜蜂的学习能力有显著差异 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$  检验) 4 ng 吡虫啉处理后意大利蜜蜂成年工蜂的嗅觉学习能力显著下降。

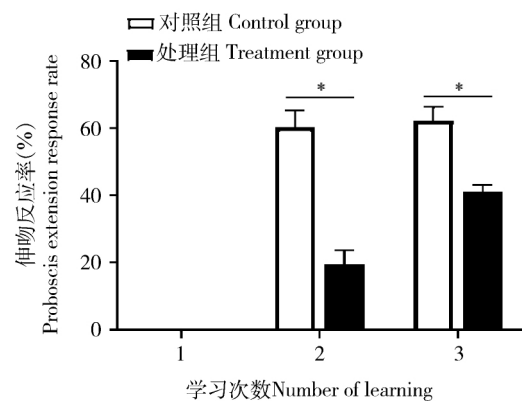


图 1 伸吻反应检测 4 ng 吡虫啉对意大利蜜蜂成年工蜂学习行为影响

Fig. 1 Effects of 4 ng imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera ligustica* adult workers based on proboscis extension response

图中数据为平均值  $\pm$  标准误; 柱上星号表示处理组与对照组间差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$  检验)。处理组饲喂含 4 ng 吡虫啉的 50% 蔗糖溶液, 对照组成年工蜂饲喂含对应剂量丙酮的 50% 蔗糖溶液 2  $\mu$ L。Data in the figure are mean  $\pm$  SE. Asterisk above bars indicates significant difference ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$ -test) between the treatment group and the control group. The adult workers in the treatment group were fed with 50% sucrose solution containing 4 ng imidacloprid, and those in the control group were fed with 2  $\mu$ L of 50% sucrose solution containing the corresponding dose of acetone. 下同 The same below.

## 2.2 意大利蜜蜂工蜂脑部转录组数据质控与评估

构建处理组与对照组意大利蜜蜂工蜂脑部转录组文库, 转录组测序数据分析如表 2 所示, 构建的 6 个文库(处理组与对照组各 3 个)中获得的原始数据库范围为  $2.42 \times 10^7 \sim 3.21 \times 10^7$  reads, 数据清除后, 有效数据库范围缩小为  $2.38 \times 10^7 \sim 3.16 \times 10^7$  reads, 占原始数据的 98.4% 以上, 文库中低质量读段所占比率很低, 符合检测标准。结果表明 6 个文库中 Q20 比例均在 96.81% 以上, Q30 比例均在 91.51% 以上, 测序数据良好, 可以用于后续分析。测序原始数据已上传 NCBI 的 SRA 数据库, 获取号为 SRR13425963 - SRR13425968。

表 2 4 ng 吡虫啉处理意大利蜜蜂成年工蜂脑部转录组数据统计

Table 2 Summary of statistics for brain transcriptome of *Apis mellifera ligustica* adult workers exposed to 4 ng imidacloprid

样本 Samples	原始读段 Raw reads	有效读段 Clean reads	Q20 (%)	Q30 (%)
Ctrl1	31 689 127	31 296 295	97.00	91.97
Ctrl2	24 203 632	23 890 863	97.14	92.20
Ctrl3	27 725 222	27 369 547	96.96	91.78
IMD1	26 433 505	26 074 634	96.87	91.69
IMD2	32 114 925	31 628 359	97.01	91.98
IMD3	28 097 608	27 686 511	96.81	91.51

Ctrl: 对照组 Control group; IMD: 处理组 Treatment group. 下同 The same below. Q20: 碱基正确率达到 99% Base accuracy rate reaches 99%; Q30: 碱基正确率达到 99.9% Base accuracy rate reaches 99.9%.

## 2.3 意大利蜜蜂工蜂脑部转录组差异表达基因功能注释

利用 HISAT 软件将过滤后的测序序列进行基因组定位分析, 将 clean reads 映射到意大利蜜蜂参考基因组上, 从基因表达分析得出, 对照组意大利蜜蜂脑部共有 9 478 个基因表达, 吡虫啉处理组意大利蜜蜂脑部共有 9 469 个基因表达, 在两组意蜂中共同表达的基因有 9 103 个。差异表达基因分析表明, 吡虫啉处理组与对照组相比, 共有 123 个 DEGs ( $p_{adj} < 0.05$ ), 其中有 82 个下调 DEGs 和 41 个上调 DEGs。NCBI 功能注释结果如图 2 所示, 吡虫啉胁迫意大利蜜蜂之后主要影响意大利蜜蜂的免疫、解毒、抗氧化、气味结合蛋白和神经信号传导蛋白等相关基因的表达。

GO 聚类分析表明, 差异表达基因功能主要集中在分子功能、细胞组分和生物学进程(图 3: A, B)。在分子功能大类中下调的 DEGs 主要富集在酶

活性及离子结合条目, 包含 S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶活性 (S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity)、磷酸酶活性 (phosphatase activity)、氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)、DNA 结合 (DNA binding)、蛋白质异二聚化活性 (protein heterodimerization activity)、酸性磷酸酶活性 (acid phosphatase activity)、辅酶结合 (coenzyme binding)、辅因子结合 (cofactor binding)、作用于供体的 CH-OH 功能团的氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors)、黄素腺嘌呤二核苷酸结合 (flavin adenine dinucleotide binding) 等功能条目; 上调的 DEGs 主要富集在受体活性及分子结合条目, 包括跨膜受体活性 (transmembrane receptor activity)、分子传感器活性 (molecular transducer activity)、核苷结合 (nucleoside binding)、嘌呤核苷结合 (purine nucleoside binding)、GTP 结合 (GTP binding)、核糖核苷结合 (ribonucleoside binding)、嘌呤核糖核苷结合 (purine ribonucleoside binding)、脒基核苷酸结合 (guanidyl ribonucleotide binding)、鸟苷酸结合 (guanyl nucleotide binding) 等功能条目。在细胞组分大类中下调的 DEGs 主要富集在细胞器部分 (organelle part)、细胞质部分 (cytoplasmic part)、大分子复合物 (macromolecular complex)、催化络合物 (catalytic complex)、转移酶复合物 (transferase complex)、染色体部分 (chromosomal part) 等功能条目; 上调的 DEGs 主要富集在大分子复合物 (macromolecular complex)、细胞质部分 (cytoplasmic part)、蛋白质复合物 (protein complex) 等功能条目。在生物学进程大类中下调的 DEGs 主要富集在甲基化 (methylation)、蛋白质定位到细胞器 (protein localization to organelle)、蛋白质靶向 (protein targeting)、染色质组织 (chromatin organization)、单生物代谢过程 (single-organism metabolic process)、DNA 构象变化 (DNA conformation change)、DNA 包装 (DNA packaging)、氧化还原过程 (oxidation-reduction process) 等功能条目; 上调的 DEGs 主要富集在应激反应 (response to stress)、细胞对 DNA 损伤的反应 (cellular response to DNA damage stimulus)、DNA 修复 (DNA repair)、多细胞生物过程 (multicellular organismal process)、神经系统过程 (neurological system process)、对化学刺激的感知 (sensory perception of chemical stimulus)、感官知觉 (sensory perception)、嗅觉感知 (sensory perception of smell) 等功能条目。

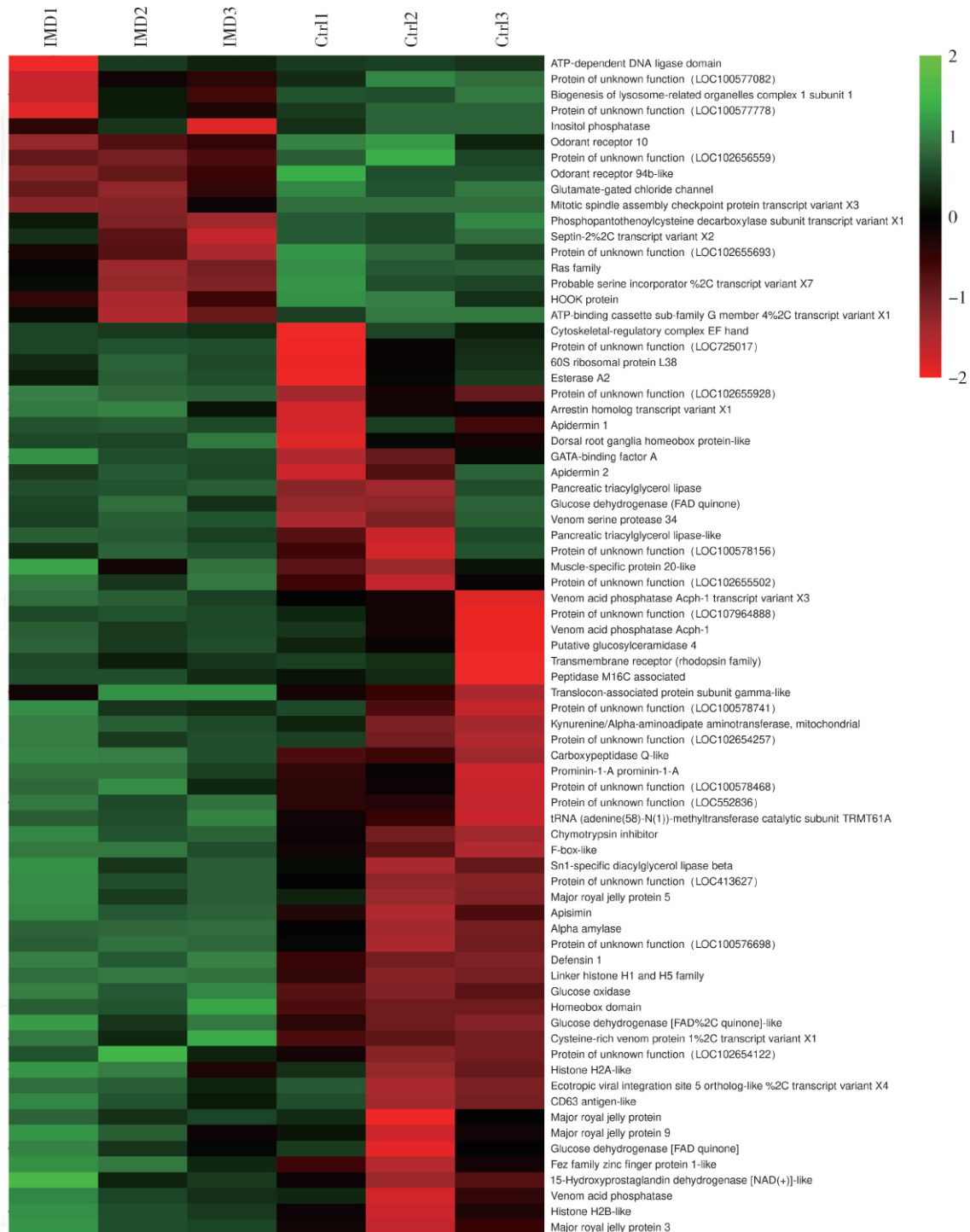


图 2 4 ng 吡虫啉处理组和对照组间意大利蜜蜂成年工蜂脑部差异表达基因( DEGs) 功能注释

Fig. 2 Functional annotation of differentially expressed genes ( DEGs) in the brain of *Apis mellifera ligustica* adult workers between the treatment group with 4 ng imidacloprid and the control group

KEGG 富集分析如图 4 所示, 下调的 DEGs 主要富集在细胞器和代谢通路, 包括核糖体( ribosome), 碳代谢( carbon metabolism), 代谢通路( metabolic pathways), 溶酶体( lysosome), Toll 和 Imd 信号通路( Toll and Imd signaling pathway), 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢( glycine, serine and threonine

metabolism) 赖氨酸降解( lysine degradation), 光信号传导-果蝇( phototransduction-fly), 鞘脂代谢( sphingolipid metabolism), 色氨酸代谢( tryptophan metabolism), 磷酸戊糖通路( pentose phosphate pathway) 等途径; 上调的 DEGs 未富集到相关 KEGG 代谢通路。

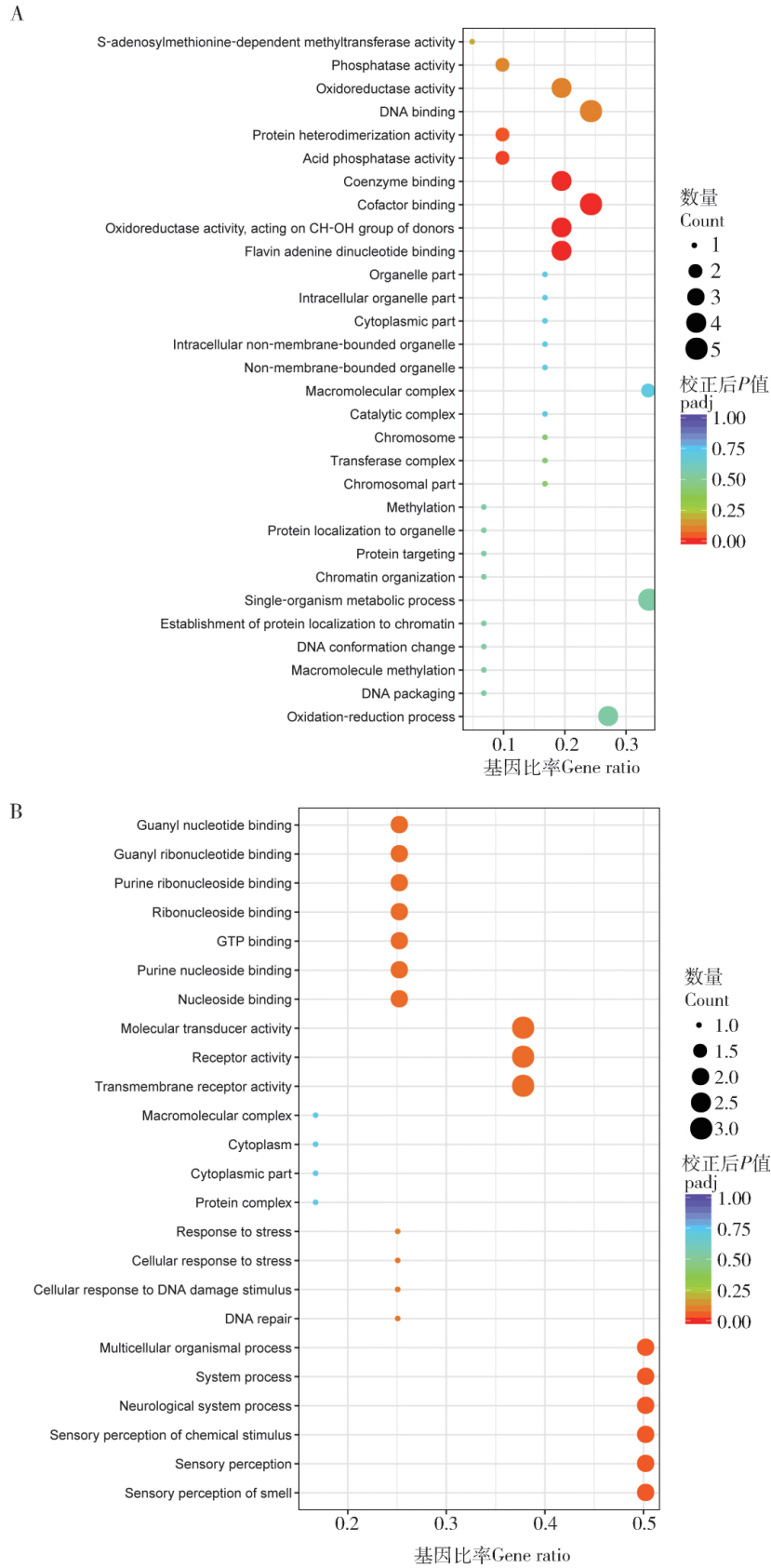


图 3 4 ng 吡虫啉胁迫后意大利蜜蜂成年工蜂脑部下调 (A) 和上调 (B) 差异表达基因( DEGs) GO 富集分析  
 Fig. 3 GO enrichment of down-regulated ( A) and up-regulated ( B) differentially expressed genes ( DEGs) in the brain of *Apis mellifera ligustica* adult workers after exposure to 4 ng imidacloprid  
 padj: 校正后的 P 值 Adjusted P-value. 图 4 同 The same for Fig. 4.



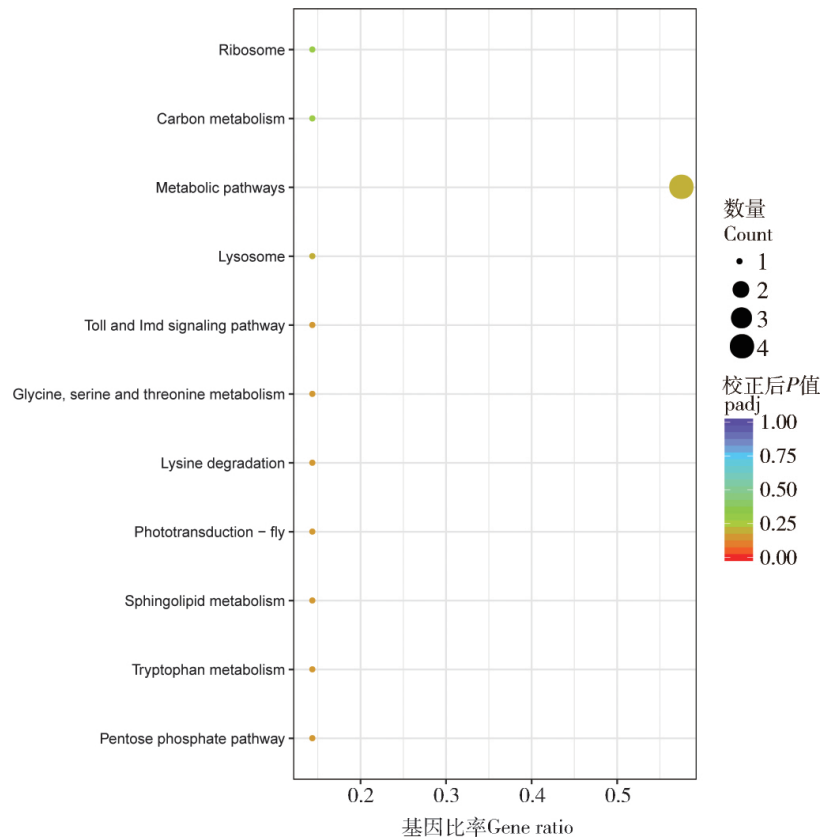


图4 4 ng 吡虫啉胁迫后意大利蜜蜂成年工蜂脑部下调差异表达基因( DEGs) KEGG 富集散点图

Fig. 4 KEGG enrichment scatter plot of down-regulated differentially expressed genes ( DEGs) in the brain of *Apis mellifera ligustica* adult workers after exposure to 4 ng imidacloprid

## 2.4 差异表达基因的荧光定量 PCR 验证

根据高通量测序数据 FPKM 值,挑选 6 个与吡虫啉胁迫相关的差异表达基因(图 5: A),通过荧光定量 PCR 验证测序数据的准确性,如图 5( B) 所示。一次性饲喂意大利蜜蜂 4 ng 吡虫啉蔗糖溶液后,意大利蜜蜂脑部 *Def1*, *LOC410734*, *LOC406105*, *LOC406081* 和 *AcpH-1* 的表达均显著下调( $P < 0.05$ ), *Or10* 显著上调表达( $P < 0.05$ ),与测序数据 FPKM 值变化趋势(图 5: A) 相同,表明荧光定量 PCR 结果与测序结果一致,测序结果准确。

## 3 讨论

本研究采用等量一次性饲喂单头意大利蜜蜂方式,减少因吡虫啉摄入量不同引起的误差。采用蜂群饲养蜜蜂方式,避免因笼养造成蜜蜂之间的交哺饲喂及蜜蜂不能排泄引起的应激反应,使实验结果更加真实、可靠。实验结果显示一次性饲喂意大利蜜蜂 18 日龄成年工蜂含 4 ng 吡虫啉的蔗糖溶液显著降低意大利蜜蜂工蜂的嗅觉学习能力(图 1)。

Decourtye 等(2004) 研究表明意大利蜜蜂经口饲喂 12 ng 吡虫啉显著影响意大利蜜蜂的条件反射及记忆能力,降低意大利蜜蜂的学习能力; Erica 和 Nieh (2015) 研究表明连续饲喂意大利蜜蜂 4 d 含吡虫啉 0.02 ng/ $\mu\text{L}$  的蔗糖溶液显著降低意大利蜜蜂的厌恶型学习行为及短期记忆能力; 蔚添添等(2017) 研究表明连续饲喂意大利蜜蜂 9 d 含吡虫啉 0.01 ng/ $\mu\text{L}$  的蔗糖溶液显著降低意大利蜜蜂的嗅觉学习能力; Li 等(2019) 研究表明连续饲喂意大利蜜蜂 11 d 含吡虫啉 0.02 ng/ $\mu\text{L}$  的蔗糖溶液显著降低意大利蜜蜂的嗅觉联想性学习行为; Tan 等(2015) 发现中华蜜蜂饲喂 0.1 ng 吡虫啉后,中华蜜蜂的嗅觉学习行为显著降低。以上研究结果均表明蜜蜂经口饲喂一定剂量的吡虫啉蔗糖溶液后,其嗅觉学习行为显著降低。

本研究高通量测序结果显示,一次性饲喂意大利蜜蜂成年工蜂含 4 ng 吡虫啉的 50% 蔗糖溶液后,处理组意大利蜜蜂脑部免疫及解毒基因如 *Def1*, *LOC410734*, *LOC406105*, *LOC406081* 和 *AcpH-1* 等显著下调(图 5)。 *Def1* 作为蜜蜂血淋巴中重要的抗菌



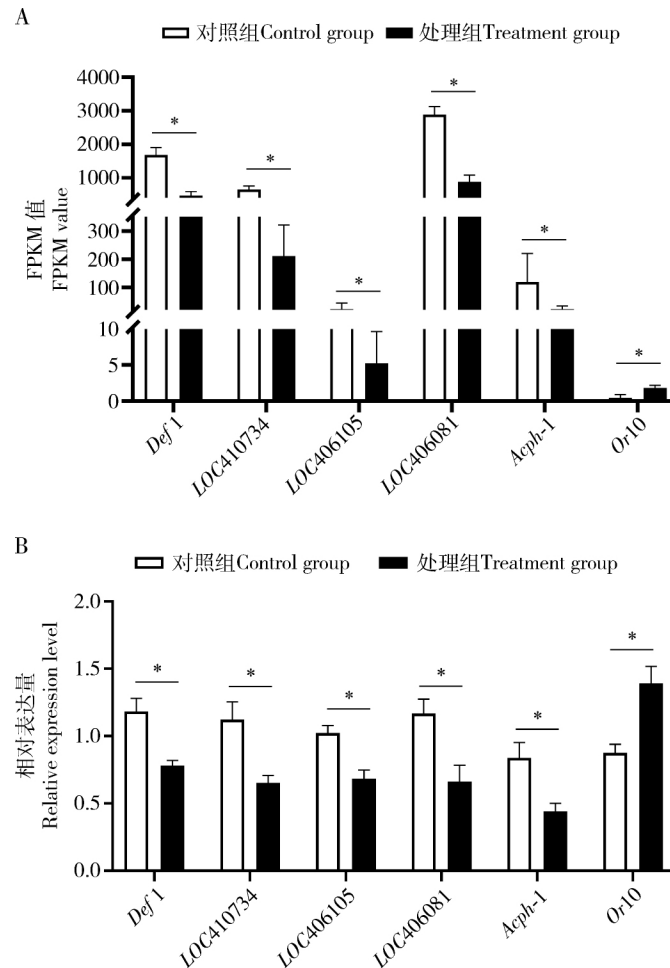


图5 4 ng 吡虫啉胁迫后意大利蜜蜂成年工蜂脑部差异表达基因( DEGs) RNA-Seq 测序数据( A) 和荧光定量 PCR 验证( B)

Fig. 5 Quantitative PCR verification ( B) of RNA-Seq sequencing data ( A) of differentially expressed genes ( DEGs)

in the brain of *Apis mellifera ligustica* adult workers after exposure to 4 ng imidacloprid

图中数据为平均值  $\pm$  标准误; 柱上星号表示差异显著 ( $P < 0.05$ ,  $T$  检验)。Data in the figure are mean  $\pm$  SE. The single asterisk above bars indicates significant difference ( $P < 0.05$ ,  $T$ -test).

肽 在防御革兰氏阳性细菌入侵时具有重要功效, 是蜜蜂免疫系统中重要的防御性抗菌肽 (Richard *et al.*, 2012)。LOC410734 是昆虫体内重要的氧化还原酶, 参与昆虫的细胞免疫过程, 在杀死病原菌的包膜反应中发挥着重要的作用 (Cox-Foster and Stehr, 1994); LOC406105 与昆虫抗药性相关, 在抵抗农药胁迫时有重要作用 (Wirth *et al.*, 1990), 蜜蜂通过氧化过程对农药等外源性物质进行解毒反应 (James and Xu, 2012)。LOC406081 将昆虫体内的葡萄糖氧化, 为机体提供能量, 进行氧化反应, 促进机体的解毒, 氧化产生  $H_2O_2$ , 具有抗菌功能 (Bucekova *et al.*, 2014)。Acph-1 是一种非专一性的磷酸单酯水解酶, 是有机体代谢过程中重要的调控酶, 参与生物体的解毒反应、代谢调节、能量转化及信号传导等生物学功能 (Strivastava and Gupta, 1986)。荧光定

量 PCR 验证结果表明, 4 ng 吡虫啉胁迫意大利蜜蜂成年工蜂后, 脑部 *Def1*, *LOC410734*, *LOC406105*, *LOC406081* 和 *Acph-1* 表达量均显著下调, 与测序数据结果一致, 揭示了急性亚致死剂量吡虫啉胁迫意大利蜜蜂成年工蜂后, 一方面影响意大利蜜蜂工蜂脑部神经信号传导, 进而影响工蜂的嗅觉学习行为, 另一方面影响意大利蜜蜂脑部免疫解毒相关基因的表达。研究报道蜜蜂大脑与免疫系统相互作用是诱导蜜蜂个体免疫应答反应的重要机制 (Hart, 1990; Alaux, 2012)。亚致死剂量吡虫啉胁迫导致意大利蜜蜂学习行为的受损与蜜蜂脑部免疫解毒相关基因之间的交互关系仍需进一步探究。

GO 分析显示, 意大利蜜蜂成年工蜂被吡虫啉胁迫后, 其脑部的分子功能、细胞组分和生物学进程相关基因的表达量与对照组间存在较大差异, 下调

基因主要富集在酶活性、氧化还原过程(图3)。研究表明农药等外源性物质影响昆虫的免疫应答机制和解毒反应(James and Xu, 2012),与对照组相比,吡虫啉处理组意大利蜜蜂脑部调控氧化还原反应过程相关基因表达量显著下调,产生氧化型自由基。James和Xu(2012)研究报道在接触新烟碱类杀虫剂的蜜蜂体内观察到过量氧化型自由基的产生,并可以增强蜜蜂的氧化应激反应。吡虫啉还会影响蜜蜂头部和胸部线粒体的正常呼吸,使ATP大量消耗,导致蜜蜂缺氧死亡(Nicodemo *et al.*, 2014)。对蜜蜂基因组分析发现蜜蜂基因组中含有大量的气味受体结合蛋白(Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006),在果蝇的相关研究中已经证实气味结合蛋白基因在嗅觉感受器中表达,对维持昆虫的嗅觉功能具有重要作用(Galindo and Smith, 2001)。Li等(2019)研究发现连续饲喂意大利蜜蜂11 d含0.02 ng/mL的吡虫啉蔗糖溶液后,转录组测序结果表明影响意大利蜜蜂的氧化还原过程、气味结合蛋白受体活性、神经信号传导过程。与本研究结果相似,吡虫啉胁迫会影响蜜蜂的免疫解毒系统,但是,本研究结果发现一次性饲喂意大利蜜蜂含4 ng吡虫啉的蔗糖溶液后,气味结合蛋白受体活性显著上调,神经信号传导过程增强(图3:A)。由此可见,意大利蜜蜂接触吡虫啉的剂量高低及时间长短会对意大利蜜蜂造成不同的生理影响,短期胁迫会提高受体活性、嗅觉感觉过程及神经信号传导,而长期胁迫会损害蜜蜂的嗅觉反应及神经系统过程。

KEGG分析结果表明下调差异表达基因主要注释在代谢途径、细胞器及Toll和Imd信号通路,上调差异表达基因未富集在KEGG代谢通路(图4)。生物代谢过程是调节蜜蜂生理和行为表现的重要途径,本研究结果表明一次饲喂意大利蜜蜂成年工蜂含4 ng吡虫啉的蔗糖溶液影响其生理代谢,如糖酵解、赖氨酸降解、鞘脂代谢、色氨酸代谢及磷酸戊糖等途径。Christen等(2018)研究表明一定剂量吡虫啉胁迫后影响意大利蜜蜂的糖酵解及脂质代谢相关生理功能。本研究有相似结果,差异表达基因LOC410734与LOC406081注释到糖酵解代谢通路并显著下调表达。Toll通路和Imd通路是蜜蜂体液免疫的组成部分,是蜜蜂抵御外来致病因子的重要生理途径,激活Toll通路和Imd通路诱导抗菌肽大量产生,维持蜜蜂正常的生理反应。Gao等(2020)研究表明吡虫啉胁迫后影响蜜蜂的免疫应答,抑制抗菌肽的产生,影响Toll通路和Imd通路的表达。

本研究结果表明4 ng吡虫啉胁迫后意大利蜜蜂成年工蜂脑部抗菌肽基因*Def1*显著下调(图5),Toll通路和Imd通路基因下调表达(图5)。Li等(2019)转录组测序研究表明连续饲喂意大利蜜蜂11 d含吡虫啉0.02 ng/ $\mu$ L的蔗糖溶液,慢性亚致死剂量吡虫啉胁迫会影响蜜蜂的嗅觉敏感性,降低气味结合蛋白活性,抑制蜜蜂的条件反射,影响蜜蜂的嗅觉学习行为。本研究结果表明急性亚致死剂量吡虫啉胁迫意大利蜜蜂会提高气味结合蛋白受体活性、神经信号传导过程,但是未能造成神经传导通路的变化。吡虫啉影响意大利蜜蜂学习行为的分子机制是一个复杂的过程,是蜜蜂免疫、解毒、嗅觉、神经信号传导等通路共同作用的结果,蜜蜂的免疫解毒系统与蜜蜂的学习行为之间的关系需要进一步探究。

综上所述,亚致死剂量吡虫啉胁迫意大利蜜蜂成年工蜂显著降低意大利蜜蜂的嗅觉学习能力,影响意大利蜜蜂脑部的免疫解毒基因表达,氧化还原过程及生物代谢过程,短时胁迫会刺激意大利蜜蜂的嗅觉感觉过程及神经信号传导过程。

## 参考文献 (References)

- Alaux C, Kemper N, Kretschmar A, LeConte Y, 2012. Brain, physiological and behavioral modulation induced by immune stimulation in honeybees (*Apis mellifera*): A potential mediator of social immunity? *Brain Behav. Immun.*, 26(7): 1057–1060.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL, 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43(3): 348–370.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.*, 97(2): 107–119.
- Bucekova M, Valachova I, Kohutova L, Prochazka E, Klaudivny J, Majtan J, 2014. Honeybee glucose oxidase-Its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101(8): 661–670.
- Christen V, Schirrmann M, Frey JE, Fent K, 2018. Global transcriptomic effects of environmentally relevant concentrations of the neonicotinoids clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Technol.*, 52(13): 7534–7544.
- Cox-Foster DL, Stehr JE, 1994. Induction and localization of FAD-glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol.*, 40(3): 235–249.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delègue MH, 2004. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic.*

- Biochem. Physiol.*, 78(2): 83–92.
- Erica Z, Nieh JC, 2015. The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive learning of simulated predation. *J. Exp. Biol.*, 218(20): 3199–3205.
- Farooqui T, 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochem. Int.*, 62(1): 122–136.
- Galindo K, Smith DP, 2001. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics*, 159(3): 1059–1072.
- Gao J, Jin SS, He Y, Luo JH, Xu CQ, Wu YY, Hou CS, Wang Q, Diao QY, 2020. Physiological analysis and transcriptome analysis of Asian honey bee (*Apis cerana cerana*) in response to sublethal neonicotinoid imidacloprid. *Insects*, 11(11): 753.
- Gonalons CM, Farina WM, 2015. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS ONE*, 10(10): e0140814.
- Hart BL, 1990. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14(3): 273–294.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 444(7118): 512–512.
- James RR, Xu J, 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(2): 175–182.
- Karahan A, Cakmak I, Hranitz JM, Karaca I, Wells H, 2015. Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. *Ecotoxicology*, 24(9): 2017–2025.
- Laurino D, Manino A, Patetta A, Porporato M, 2013. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bull. Insectol.*, 66(1): 119–126.
- Li Z, Li M, He J, Huang J, Zhao X, Veeranan C, Huang W, Nie H, Zhao Y, Su S, 2017. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 140: 1–8.
- Li ZG, Yu TT, Chen YP, Heerman M, He JF, Huang JN, Nie HY, Su SK, 2019. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 156: 36–43.
- 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.
- Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HCD, Guelfi M, Balieira KVB, Mingatto FE, Jong DD, 2014. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 33(9): 2070–2075.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2): 153–158.
- Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13(1): 558.
- Sandoz JC, Roger B, Pham-Delègue MH, 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee: Comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *C. R. Acad. Sci. III*, 318(7): 749–755.
- Srinivasan MV, 2009. Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 267–284.
- Strivastava R, Gupta N, 1986. Acid phosphatase. *Sci. Ind. Res.*, 45: 402–412.
- Tan K, Chen WW, Dong SH, Liu XW, Wang YC, Nieh JC, 2015. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Sci. Rep.*, 7(1): 17772.
- van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP, 2013. Bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.*, 5(3–4): 293–305.
- Villar G, Grozinger CM, 2017. Primer effects of the honeybee, *Apis mellifera*, queen pheromone 9-ODA on drones. *Anim. Behav.*, 127: 271–279.
- Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP, Pasteur N, 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in organophosphate resistance and linkage. *J. Med. Entomol.*, 27(2): 202–206.
- Yu TT, He JF, Luo TT, Dong YB, Li ZG, Su SK, 2017. Effects of field realistic doses of imidacloprid on learning and memory of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) workers. *Acta Entomol. Sin.*, 60(11): 1300–1306. [蔚添添, 和静芳, 罗婷婷, 董应波, 李志国, 苏松坤, 2017. 吡虫啉大田使用剂量对意大利蜜蜂工蜂学习和记忆的影响. *昆虫学报*, 60(11): 1300–1306]

(责任编辑: 马丽萍)