研究论文

噻虫啉对西方蜜蜂王浆主蛋白、免疫和记忆相关基因表达的影响*

施腾飞[1**] 王宇飞[1] Sawyer Burton[2] 许圣云[2]
邓全艺[3] 章文信[2] 余林生[1, 3***]

（1. 安徽农业大学植物保护学院，合肥 230036；2. 安徽农业大学生命科学学院，合肥 230036；
3. 安徽农业大学动物科技学院，合肥 230036）

摘 要 **【目的】** 噻虫啉 Thiacloprid 是当今应用较为广泛的新烟碱类杀虫剂之一。研究表明亚致死剂量的噻虫啉不仅能够影响蜜蜂的采集和飞行能力，而且还能损害蜜蜂的免疫系统。本文主要探究了亚致死浓度的噻虫啉对西方蜜蜂 5 种王浆主蛋白基因 *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4* 和 *Mrjp5* 4 种免疫相关抗菌肽基因 *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1* 和 *Apidaecin* 以及 3 种记忆相关基因 *Pka*, *Creb* 和 *Nmdar1* 表达的影响。**【方法】** 对蜜蜂长期饲喂含有 0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉的糖水 10 d，然后运用荧光定量 PCR 技术分别检测了蜜蜂王浆腺中王浆主蛋白基因以及脑部免疫和记忆相关基因的表达变化。**【结果】** 0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉均能显著的抑制 5 种王浆主蛋白基因 *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4*, *Mrjp5* 和 *Apidaecin* 的表达水平（$P<0.05$），而仅有 2 mg/L 噻虫啉处理能够能显著抑制 *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1* 和 *Nmdar1* 表达（$P<0.05$）。不过，0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉处理对另外两种记忆相关基因 *Pka* 和 *Creb* 表达没有显著影响。**【结论】** 亚致死浓度噻虫啉可能通过抑制王浆主蛋白基因的表达影响蜜蜂王浆腺的发育，而 *Nmdar1*, *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1* 和 *Apidaecin* 的下调表达则可能预示着噻虫啉对蜜蜂记忆能力生成和免疫系统的损害。我们的研究为深入探究噻虫啉对西方蜜蜂健康影响的分子机制提供了基础。

关键词 西方蜜蜂，噻虫啉，王浆主蛋白基因，记忆相关基因，免疫相关基因

Effects of thiacloprid on the expression of major royal jelly protein genes, and immune and memory related genes, in the honey bee (*Apis mellifera* L.)

SHI Teng-Fei[1**] WANG Yu-Fei[1] Sawyer BURTON[2] XU Sheng-Yun[2]
DENG Quan-Yi[3] ZHANG Wen-Xin[2] YU Lin-Sheng[1, 3***]

(1. College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 3. College of Animal Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract **[Objectives]** Thiacloprid is one of the most widely used neonicotinoid insecticides. Previous studies have shown that sublethal doses of thiacloprid adversely affect the foraging behaviour, navigation and immunocompetence, of honey bees. In this study, the effects of thiacloprid on five major royal jelly protein genes; *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4*, and *Mrjp5*, four immune related antimicrobial peptide genes; *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1* and *Apidaecin*, and three genes related to memory formation; *Pka*, *Creb*, and *Nmdar1*, were investigated in the honey bee *Apis mellifera* L.. **[Methods]** Bees were chronically exposed to 0.2 mg/L and 2 mg/L thiacloprid over 10 d after which expression levels of the five major royal jelly

*资助项目 Supported projects：国家蜂产业技术体系建设专项资金（CARS-45-KXJ10）

**第一作者 First author，E-mail：stf0623@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yulinsheng@ahau.edu.cn

收稿日期 Received：2017-12-11，接受日期 Accepted：2018-03-27

protein genes in the hypopharyngeal gland, and the immune and memory related genes in the brain, were measured using RT-qPCR. **[Results]** Exposure to both 0.2 mg/L and 2 mg/L thiacloprid significantly inhibited the expression of *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4*, *Mrjp5* and *Apidaecin* (P<0.05), whereas expression of *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1* and *Nmdar1* was only reduced by exposure to 2 mg/L thiacloprid (P<0.05). However, thiacloprid did not affect the expression of *Pka* and *Creb*. **[Conclusion]** The thiacloprid-induced decrease in *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4*, and *Mrjp5* expression may reduce hypopharyngeal gland development, whereas the down-regulation of *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1*, *Apidaecin* and *Nmdar1* could be implicated in impaired memory and immune system performance. The results of this study suggest a potential molecular mechanism for some of the known negative effects of thiacloprid on honey bees.

Key words *Apis mellifera*, thiacloprid, major royal jelly protein gene, memory-related gene, immune related gene

新烟碱类杀虫剂当今被广泛用于农作物和园艺作物中治理多种农业害虫（Simon-Delso *et al.*，2015）。然而，这类杀虫剂在防治害虫的同时，也会对其他非靶标有益昆虫生存和健康造成影响，其中就包括重要的授粉昆虫蜜蜂。新烟碱类农药作为一种烟碱型乙酰胆碱受体（Nicotinic acetylcholine receptor，NAChR）激动剂，它主要通过与烟碱型的乙酰胆碱受体结合，使昆虫异常兴奋，全身痉挛麻痹而死（Brown *et al.*，2006）。新烟碱类农药被植物吸收后，能够通过其系统循环传输到花粉、花蜜和滴露中（Krupke *et al.*，2012；Stoner and Eitzer，2012）。采集蜂则通过采集受到污染的花粉和花蜜接触到新烟碱农药，并把它们储存在蜂巢内（Cresswell，2011；Goulson，2013），近年来很多调查在蜂蜜、蜂粮、花粉和蜂蜡中检测到各种新烟碱类农药的存在（Codling *et al.*，2016; Sánchez-Hernández *et al.*，2016；Tong *et al.*，2016），这样内勤蜂、幼蜂和幼虫等也能通过取食花蜜、花粉和蜂粮接触到此类农药。大量研究表明亚致死剂量的新烟碱类杀虫剂能够损害蜜蜂脑部和蘑菇体的发育（Oliveira *et al.*，2014；Peng and Yang，2016），并且影响其学习和记忆能力（Mengoni Goñalons and Farina，2015；Alkassab and Kirchner，2016）。田间实验表明新烟碱类农药还能够损害工蜂采集蜂的定位飞行和采集能力（Henry *et al.*，2012；Tison *et al.*，2016）。此外，新烟碱类杀虫剂还能影响蜜蜂的非靶标组织如中肠和马氏管的发育（Catae *et al.*，2014；Oliveira *et al.*，2014），损害其免疫系统（Brandt *et al.*，2016）。

噻虫啉作为一种新型低毒型的新烟碱杀虫剂，近年来在农作物中也得到了广泛的应用。同样的，采集蜂能通过采集含有噻虫啉残留的植物吐水、花蜜和花粉等接触到这种杀虫剂，并把它们储存在蜂巢内。调查发现蜂巢中花蜜、蜂粮和花粉中均有噻虫啉的残留，而且其在花粉和蜂粮中的残留量则高达 0.2 mg/kg 左右（Genersch *et al.*，2010）。尽管噻虫啉对蜜蜂是低毒的，其对蜜蜂的 $LD_{50(48h)}$ = 17.3 μg · bee^{-1}，仅为其他新烟碱类杀虫剂如噻虫嗪（$LD_{50(48h)}$ = 4-5 ng · bee^{-1}）和吡虫啉（$LD_{50(48h)}$ = 3.7-104 ng · bee^{-1}）的 1/1 000 以下（Blacquiere *et al.*，2012），然而其对蜜蜂的亚致死效应是不能忽视的。Brandt 等（2016）研究显示亚致死浓度噻虫啉（200 μg/L 和 2 000 μg/L）能够降低蜜蜂的血细胞密度和抗菌能力。Tison 等（2016）通过田间实验发现亚致死浓度噻虫啉（5 mg/L）能够损害蜜蜂的采集和归巢能力，影响蜜蜂群体个体间的交流。

目前关于新烟碱类杀虫剂对蜜蜂健康影响的研究主要都集中在对蜜蜂行为、形态发育和种群发展等方面的影响，而关于新烟碱类杀虫剂对蜜蜂健康影响的分子机制还了解甚少。而且新烟碱类杀虫剂也大多都集中在毒性较强的吡虫啉、噻虫胺和噻虫嗪等，其他低毒型杀虫剂如噻虫啉则很少被研究。因此，在本研究中我们主要探究了亚致死浓度噻虫啉 0.2 mg/L（田间浓度）和 2 mg/L 对西方蜜蜂 5 种王浆主蛋白基因 *Mrjp1*，*Mrjp2*，*Mrjp3*，*Mrjp4* 和 *Mrjp5*、4 种免疫相关基因 *Abaecin*，*Hymenoptaecin*，*Defensin1* 和 *Apidaecin* 以及 3 种记忆相关基因环腺苷酸反应元件结合蛋白 1（Cyclic AMP-responsive element-binding protein1，*Creb*）、环腺苷酸依赖性蛋白激

酶（cAMP-dependent kinase，*Pka*）和 N-甲基-D 天冬氨酸受体基因 1（NMDA glutamate receptor1，*Nmdar1*）表达的影响。以期为深入探究噻虫啉对西方蜜蜂健康影响的分子机制提供一定的生物学基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

ReverTra qPCR RT Master Mix gDNA remover Kit 购于东洋纺（上海）生物科技有限公司、Trizol 和 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) Kit 购于天根生化科技（北京）有限公司；原药噻虫啉（分析纯）购于 Aladdin 公司；荧光定量 PCR 仪为 ABI StepOnePlus^{TM} Real-Time PCR System；NanoDrop2000 分光光度计。

1.2　蜜蜂

在实验前的 2 个月对蜂群进行治螨处理，然后从西方蜜蜂 *Apis mellifera* L.蜂群中提出 1 张即将羽化的工蜂封盖子巢脾（采自安徽农业大学蜂业研究所种蜂场）至恒温恒湿培养箱里培养 12 h（33 ℃，RH 60%，黑暗），然后收集 12 h 内羽化的蜜蜂于蜂笼中。每笼 60 头刚羽化蜜蜂，共收集 9 笼。将收集的蜜蜂放在恒温恒湿培养箱中（28 ℃，RH 70%，黑暗）适应 1 d，并饲喂足量的 50%糖水和花粉。然后，2 日龄的蜜蜂用于下面的农药处理实验。

1.3　农药噻虫啉处理

取 10 mg 噻虫啉原药（分析纯）溶于 1 mL 丙酮中配置成 10^4 mg/L 的噻虫啉母液。然后取适量母液加入 50%的糖水中使噻虫啉的浓度分别为 0.2 mg/L 和 2 mg/L，丙酮的终体积比不超过 0.02%。研究表明这个浓度的丙酮不会对蜜蜂健康造成伤害。并将等体积的丙酮溶于 50%的糖水中作为对照。本实验共有 3 个处理组，分别为 0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉组以及对照组，每个处理组包含 3 笼健康且个体大小相似的 2 日龄蜜蜂，每笼 50 头。分别对各组蜜蜂饲喂足量被污染的 50%糖水和花粉，使其可以自由取食，糖水和花粉每 2 d 进行更换，并记录和清除死蜂。这样饲喂 10 d 后，收集每组活蜂备用。

1.4　总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成

将收集的活蜂在氮气条件下麻醉后，然后在冰上解剖蜜蜂头部获得蜜蜂脑部和王浆腺。分别将 15 头蜜蜂的脑部和王浆腺作为 1 组，然后加入 500 μL 的 Trizol，匀浆均匀后提取总 RNA，并对提取的总 RNA 浓度进行测定。对总 RNA 进行稀释，使其终的浓度为 500 ng/μL。每次使用 1 μL 稀释后的 RNA 溶液，然后按照 ReverTra qPCR RT Master Mix gDNA remover Kit 的步骤和反应条件说明进行反转录反应，获得第一链 cDNA。

1.5　引物的设计与合成

根据 NBCI 库中内参基因和目的基因的 mRNA 序列分别设计其进行荧光定量 PCR 的上游和下游引物。内参基因和目的基因的上游和下游引物均由上海捷瑞生物工程有限公司设计与合成。引物信息见表 1。

1.6　荧光定量 PCR

本实验采用 Ct 值比较法进行基因相对定量，20 μL 反应体系：2×SuperReal PreMix Plus 10 μL；PCR Forward Primer (10 μmol·L^{-1}) 0.6 μL；PCR Reverse Primer (10 μmol·L^{-1}) 0.6 μL；50×ROX Reference Dye 2.0 μL；cDNA 模板 1.0 μL；RNase-free ddH_2O 5.8 μL。以上步骤均在冰上操作。反应条件为：预变性反应：95 ℃ 15 min；PCR 反应：95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，40 个循环；溶解曲线：95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min。本反应以 *Ribosomal protein L32*（*RpL32*）作为内参基因，每个样本重复 3 次，并用 RNase Free dH_2O 代替 cDNA 模板作为阴性对照，以反应体系全部为 RNase Free dH_2O 作为空白对照。运用 $2^{-\triangle Ct}$ 法（Schmittgen and Livak，2008）对目的基因相对表达水平进行定量。

1.7　数据分析

运用 SPSS Statistics 单因素方差分析（ANOVA）

表 1 目的基因和内参基因的上游和下游引物
Table 1 The forward and reverse primers of genes

基因 Genes	序列 Sequences	扩增效率 Amplification efficiencies（%）
Mrjp1	F: TATTCCATTGCTTCGTTACTCG R: TCTTGTCTTCTTTCATCGCTACC	95.24
Mrjp2	F:AACTGTACCTGTATGTGCTCCAAA R:TATAGCTTGAACAGCCAAAGACAC	101.39
Mrjp3	F: CCTCTTCTTTCTCACGGTTTGT R: GTTCATTCACGCAGGCAATAC	95.61
Mrjp4	F: AATGGTTGCTGTTGATGGTATG R: CTTGCCTCCTTTCGTCGTTAT	94.59
Mrjp5	F: AATGTCGAAAAATGGCGTTC R: TGGGAGATGCATCATTTTCA	96.39
Pka	F: AAGACTATTGAAGTCGGTGACA R: CCTATCAAGGCCCCACCAAA	92.65
Nmdar1	F: GTATTTCCGTCGCCAAGTC R: TGTAAACCAATCCCATAGCCA	97.89
Creb	F: CGATGCAGCACCAGCAATAG R: AGTCTCAACCACCTGAAGCG	94.76
Abaecin	F: TGTCGGCCTTCTCTTCATGG R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	94.99
Hymenoptaecin	F: ATATCCCGACTCGTTTCCGA R: TCCCAAACTCGAATCCTGCA	97.32
Defensin1	F: GTTGAGGATGAATTCGAGCC R: TTAACCGAAACGTTTGTCCC	96.56
Apidaecin	F: TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG R: GAAGGTCGAGTAGGCGGATCT	94.89
RpL32	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	95.36

对各组蜜蜂基因表达差异进行分析，并运用 Duncan's 法进行显著性差异检验；文中的图形则都运用 GraphPad Prism 5 软件制作。

2 结果与分析

2.1 对蜜蜂生存的影响

蜜蜂在恒温恒湿培养箱中培养的 10 d，每 2 d 对蜂笼中的死蜂进行记录和清理。起初每笼中的蜜蜂均为 50 头，第 N 天的蜜蜂死亡数记为 N_d，那么第 N 天蜜蜂的存活率则为：$y = (50 - N_d)/50 \times 100\%$。由图 1 可知，在 10 d 的饲喂过程中，0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉对蜜蜂生存均没有显著的影响。

2.2 对蜜蜂功能基因表达的影响

本研究以 *RpL32* 为内参基因，以丙酮组蜜蜂作为对照组，运用荧光定量 PCR 技术检测了取食 0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉 10 d 后西方蜜蜂王浆腺中 5 种王浆主蛋白基因 *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*,

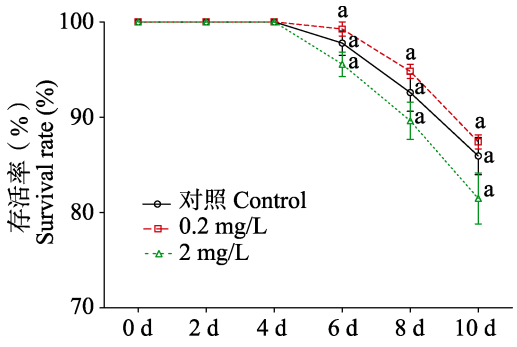

图 1　噻虫啉对西方蜜蜂生存的影响

Fig. 1　Effects of thiacloprid on survival of honey bees *Apis mellifera*

图中数据为平均值±标准误；标有不同字母表示差异显著（P<0.05）（Duncan's 新复极差检验）。下图同。

Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

Mrjp4 和 *Mrjp5* 以及脑部 4 种免疫相关抗菌肽基因 *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Defensin1*、*Apidaecin* 和 3 种记忆相关基因 *Pka*, *Creb*、*Nmdar1* 的表达变化。

2.2.1　蜜蜂王浆主蛋白基因的表达变化　0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉处理组蜜蜂王浆腺中 *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4* 和 *Mrjp5* 的表达水平均显著地低于对照组（P<0.05）（图 2）。噻虫啉对蜜蜂 *Mrjp1*, *Mrjp2*, *Mrjp3*, *Mrjp4* 和 *Mrjp5* 表达的影响具有显著地浓度相关性，2 mg/L 噻虫啉处理组蜜蜂这 5 种王浆主蛋白基因表达水平均显著低于 0.2 mg/L 农药组（P<0.05）（图 2）。

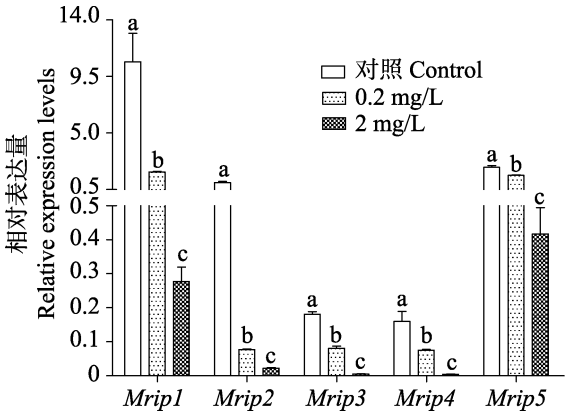

图 2　噻虫啉对西方蜜蜂 5 种王浆主蛋白基因表达的影响

Fig. 2　Effects of thiacloprid on five major royal jelly protein genes in *Apis mellifera*

2.2.2　蜜蜂免疫和记忆相关基因的表达变化

0.2 mg/L 和 2 mg/L 噻虫啉处理均能显著抑制西方蜜蜂脑部 *Hymenoptaecin* 和 *Apidaecin* 的表达（P<0.05）（图 3），2 mg/L 噻虫啉处理组 *Abaecin* 和 *Defensin1* 的表达水平显著低于对照组（P<0.05）（图 3）。由图 4 可知，蜜蜂脑部 *Nmdar1* 在 2 mg/L 噻虫啉处理组的表达水平显著低于对照组（P<0.05），而亚致死浓度噻虫啉对 *Pka* 和 *Creb* 的表达则没有显著的影响。

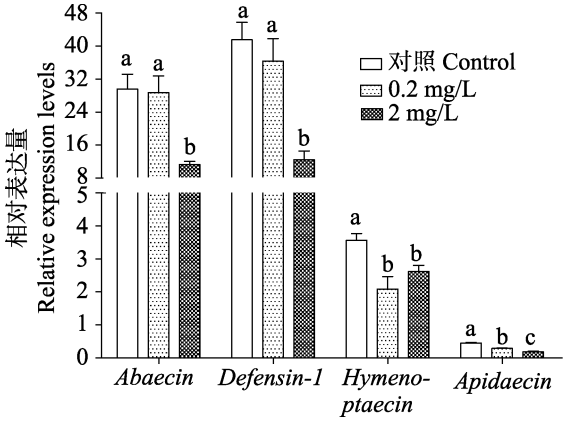

图 3　噻虫啉对西方蜜蜂 4 种免疫相关基因表达的影响

Fig. 3　Effects of thiacloprid on four immune related genes in *Apis mellifera*

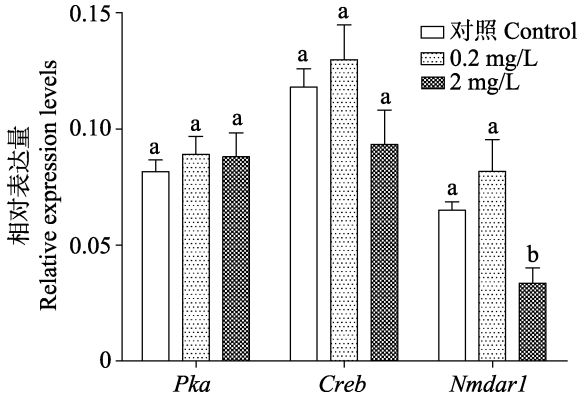

图 4　噻虫啉对西方蜜蜂 3 种记忆相关基因表达的影响

Fig. 4　Effects of thiacloprid on three memory related genes in *Apis mellifera*

3　讨论

噻虫啉是目前农业生产中应用较为广泛的新烟碱类杀虫剂之一。虽然噻虫啉对蜜蜂是低毒的，其毒性远远低于吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺等

其他新烟碱类杀虫剂（Blacquiere *et al.*，2012）。不过噻虫啉对蜜蜂的亚致死效应是不能忽视的（Brandt *et al.*，2016；Tison *et al.*，2016）。本文中我们主要探究了包括田间剂量（0.2 mg/L）在内的两个亚致死浓度（0.2 mg/L 和 2 mg/L）噻虫啉长期胁迫对西方蜜蜂王浆腺中王浆主蛋白基因以及脑部免疫和记忆相关基因的表达变化。

蜂王浆是由工蜂王浆腺分泌的用于饲喂蜂王和小幼虫的一种物质，蜂王浆中含有丰富的各类营养物质包括氨基酸、脂类、维他命和乙酰胆碱等。王浆中的蛋白质主要由王浆主蛋白组成，约占王浆中总蛋白含量的 90%。目前，已经有 9 种王浆主蛋白基因 *Mrjp1-Mrjp9* 在蜜蜂体内被验证和确定，其中王浆主蛋白 Mrjp1-Mrjp5 由于其在蜂王浆中的高表达量而被认为发挥着重要的营养功能（Buttstedt *et al.*，2014）。*Mrjp1* 特异性的在王浆腺中高表达，而且是王浆腺中表达量最高的王浆主蛋白基因，而且 Mrjp1 的一个单体物质 royalactin 已经被证明能够通过调控 EGFR 信号通路促进蜂王发育（Kamakura，2011）。本研究结果表明亚致死浓度噻虫啉能够抑制蜜蜂王浆腺中 *Mrjp1*，*Mrjp2*，*Mrjp3*，*Mrjp4* 和 *Mrjp5* 表达，而且我们之前的研究也显示了另一种新烟碱类农药噻虫嗪能够抑制蜜蜂 *Mrjp1*，*Mrjp3* 和 *Mrjp4* 的表达（Shi *et al.*，2017）。这可能预示了噻虫啉对西方蜜蜂王浆腺发育的损害，从而间接地影响了蜂群中蜂王和小幼虫的营养和发育。

蜜蜂体内共有 4 大抗菌肽基因家族，分别为：*Apidaecin*（Casteels *et al.*，1989）、*Abaecin*（Casteels *et al.*，1990）、*Hymenoptaecin*（Casteels *et al.*，1993）和 *Defensin*（Casteels and Tempst，1994），它们在蜜蜂的先天体液免疫系统中发挥着重要的作用。*Apidaecin* 和 *Hymenoptaecin* 均对革兰氏阴性菌有明显的抑制作用，而且 *Hymenoptaecin* 能够有效抑制对 *Apidaecin* 产生抗性的细菌（Casteels *et al.*，1989，1993；Chan *et al.*，2009）。虽然 *Abaecin* 具有广谱的抗菌能力（Evans，2004；Randolt *et al.*，2008），不过其抗菌活性比 *Apidaecin* 要弱很多（Casteels *et al.*，1990）。蜜蜂 *Defensin* 具有两个基因型：*Defensin-1* 和 *Defensin*-2（Evans *et al.*，2006），其中 *Defensin-1* 具有广谱性的抗菌能力，其对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和真菌均具有高效的抑制作用（Aronstein and Salivar，2005；Richard *et al.*，2012）。本研究结果表明亚致死浓度的噻虫啉能够显著抑制西方蜜蜂 *Abaecin*，*Hymenoptaecin*，*Defensin1* 和 *Apidaecin* 的表达，其中 *Hymenoptaecin* 和 *Defensin1*，在我们之前的研究也显示噻虫嗪能够抑制这两种抗菌肽基因的表达（施腾飞等，2017；Shi *et al.*，2017）。我们的结果可能预示了噻虫啉对西方蜜蜂免疫系统的影响。

我们还探究亚致死浓度噻虫啉对西方蜜蜂脑部 3 种记忆相关基因 *Pka*，*Creb* 和 *Nmdar1* 表达的影响。结果显示 2 mg/L 噻虫啉能够抑制 *Nmdar1* 的表达，而对 *Pka* 和 *Creb* 的表达没有显著影响。N-甲基-D 天冬氨酸受体（NMDA glutamate receptors，Nmdars）是中枢神经系统内的重要兴奋性氨基酸受体之一，对动物和人类记忆的生成发挥着重要的作用（Kandel，2001）。Si 等（2004）的研究表明对蜜蜂注射 Nmdars 拮抗剂能够破坏蜜蜂长期记忆的生成。

Nmdars 由两个亚基 Nmdar1 和 Nmdar2 组成，其中 Nmdar1 广泛在蜜蜂脑部表达，其被认为是 Nmdars 发挥功能的主要亚基（Zannat *et al.*，2006）。Müßig 等（2010）的报道称通过 RNAi 技术抑制蜜蜂脑部 *Nmdar1* 的表达能显著抑制蜜蜂的中期和长期记忆。本研究中显示的噻虫啉诱导的西方蜜蜂 *Nmdar1* 下调表达可能预示着对蜜蜂记忆能力生成的影响。

综上，亚致死浓度噻虫啉对西方蜜蜂王浆主蛋白基因 *Mrjp1-Mrjp5* 表达的影响可能预示着其对蜜蜂王浆腺的发育的损害；此外，*Abaecin*，*Hymenoptaecin*，*Defensin1*，*Apidaecin* 和 *Nmdar1* 的下调表达则可能表明了噻虫啉对蜜蜂记忆能力生成和免疫系统的破坏。本研究为深入探究噻虫啉对西方蜜蜂健康影响的分子机制提供了基础。

参考文献 (References)

Alkassab AT, Kirchner WH, 2016. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. *Ecotoxicology*, 25(5): 1000–1010.

Aronstein K, Saldivar E, 2005. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene *Am18w* and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie*, 36(1): 3–14.

Blacquiere T, Smagghe G, Van Gestel CA, Mommaerts V, 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(5): 973–992.

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: 40–47.

Brown LA, Ihara M, Buckingham SD, Matsuda K, Sattelle DB, 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.,* 99(2): 608–615.

Buttstedt A, Moritz RF, Erler S, 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.,* 89(2): 255–269.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P, 1993. Functional and chemical of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.,* 268(10): 7044–7054.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P, 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *Embo J.,* 8(8): 2387–2391.

Casteels P, Ampe C, Riviere L, Van Damme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.,* 187(2): 381–386.

Casteels P, Tempst P, 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 199(1): 339–345.

Catae AF, Roat TC, De Oliveira RA, Nocelli RC, Malaspina O, 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.,* 77(4): 274–281.

Chan QWT, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ, 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC Genomics*, 10: 387.

Codling G, Al Naggar Y, Giesy JP, Robertson AJ, 2016. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honeybees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*, 144: 2321–2328.

Cresswell JE, 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1): 149–157.

Genersch E, Von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3): 332–352.

Goulson D, 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.,* 50(4): 977–987.

Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348–350.

Kamakura M, 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348): 478–483.

Kandel ER, 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544): 1030–1038.

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K, 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural felds. *PLoS ONE*, 7(1): e29268.

Mengoni Goñalons C, Farina WM, 2015. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS ONE*, 10(10): e0140814.

Müssig L, Richlitzki A, Rössler R, Eisenhardt D, Menzel R, Leboulle G, 2010. Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *J. Neurosci.,* 30(23): 7817–7825.

Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina O, 2014. Side effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenopptera: Apidae). *Environ. Toxicol.,* 29(10): 1122–1133.

Peng YC, Yang EC, 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci.*

Rep., 6: 19298.

Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immune stimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13: 558.

Sánchez-Hernández L, Hernández-Domínguez D, Martín MT, Nozal MJ, Higes M, Bernal Yagüe JL, 2016. Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *J. Chromatogr. A.*, 1428: 220–227.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat. Protoc*., 3(6): 1101–1108.

Shi TF, Wang YF, Burton S, Qi L, Yu LS, 2017. Sublethal effects of thiamethoxam on immune related gene expression in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(4): 576–582. [施腾飞, 王宇飞, Sawyer Burton, 齐磊, 余林生, 2017. 亚致死浓度噻虫嗪对西方蜜蜂免疫相关基因表达的影响. 应用昆虫学报, 54(4): 576–582.]

Shi TF, Wang YF, Liu F, Qi L, Yu LS, 2017. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 110(6): 2283–2289.

Si A, Helliwell P, Maleszka R, 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 77(2): 191–197.

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EA, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers M, 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(1): 5–34.

Stoner KA, Eitzer BD, 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE*, 7(6): e39114.

Tison L, Hahn ML, Holtz S, Rößner A, Greggers U, Bischoff G, Menzel R, 2016. Honeybees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the feld. *Environ. Sci. Technol.*, 50(13): 7218–7227.

Tong Z, Wu YC, Liu QQ, Shi YH, Zhou LJ, Liu ZY, Yu LS, Cao HQ, 2016. Multi-residue analysis of pesticide residues in crude pollens by UPLC-MS/MS. *Molecules*, 21(12): 1652.

Zannat MT, Locatelli F, Rybak J, Menzel R, Leboulle G, 2006. Identification and localisation of the NR1 sub-unit homologue of the NMDA glutamate receptor in the honeybee brain. *Neurosci. Lett.*, 398(3): 274–279.