应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(3):611—615

亚致死剂量杀虫剂对意蜂工蜂嗅觉敏感性的影响*

宋怀磊** 周 婷*** 王 强 代平礼 罗其花 徐书法 吴艳艳

(中国农业科学院蜜蜂研究所 农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室 北京 100093)

摘 要 喙伸反应(PER)试验适用于评价杀虫剂对蜜蜂行为的影响。本实验利用喙伸反应研究了亚致死剂量($LD_{50}/100 \sim LD_{50}/10$)溴氰菊酯和吡虫啉对意蜂 *Apis mellifera ligustica* L. 工蜂嗅觉敏感性的影响。结果发现,经口饲喂溴氰菊酯 5 ng 和 10 ng 后,工蜂对 0.1% 的蔗糖溶液的敏感性显著下降($P < 0.05$),水应激指数降低,但对 0.3%,1%,3%,10% 和 30% 的蔗糖溶液的敏感性没有显著变化;而经口饲喂吡虫啉 0.3 ng 和 0.6 ng 后,工蜂对上述各浓度蔗糖溶液的敏感性变化不明显,但其水应激指数升高。

关键词 蜜蜂,溴氰菊酯,吡虫啉,喙伸反应,嗅觉,亚致死剂量

Effects of sublethal doses of insecticides on the olfactory sensitivity of the honeybee(*Apis mellifera ligustica*)

SONG Huai-Lei** ZHOU Ting*** WANG Qiang DAI Ping-Li
LUO Qi-Hua XU Shu-Fa WU Yan-Yan

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract Previous studies have shown that observations of the proboscis extension reflex (PER) are of interest for assessing the behavioral effects of insecticides on the honeybee. In the present study, the effects of sublethal doses ($LD_{50}/100$—$LD_{50}/10$) of deltamethrin and imidacloprid on the olfactory sensitivity of honeybees (*Apis mellifera ligustica* L.) were determined under controlled laboratory conditions using a conditioned PER assay. After oral consumption, deltamethrin reduced both sensitivity to antennal stimulation by sucrose solutions and the water-induced proboscis extension reflex at doses of 5 ng/bee and 10 ng/bee. Unlike deltamethrin, imidacloprid had no effect in olfactory sensitivity assays but increased the water-induced proboscis extension reflex.

Key words *Apis mellifera ligustica*, deltamethrin, imidacloprid, proboscis extension reflex (PER), olfactory sensation, sublethal dose

蜜蜂是一种重要的经济昆虫,除了为人类提供蜂产品外,其最大的贡献是为农作物授粉,蜜蜂授粉对于农作物、果园、濒危植物保护、城市园艺以及生态恢复都具有重要意义(罗其花等,2008)。由于其授粉贡献巨大,蜜蜂成为欧洲第三大最有价值的家养动物(苏松坤,2008)。然而,由于近年来杀虫剂的大量使用,蜜蜂也成为杀虫剂非靶标生物的代表物种之一(林小丽等,2008)。蜜蜂中毒事件逐年增加,致使一些农作物因得不到充分授粉而产量降低和品质下降,农业和养蜂业的发展受到严重制约(周婷等,2003,2008;代平礼等,2009)。

杀虫剂对蜜蜂的毒性影响包括急性中毒和慢性中毒。急性中毒会导致蜜蜂死亡,而亚致死剂量杀虫剂引起的慢性中毒则会导致蜜蜂在生理和行为等方面发生一系列异常的变化,其中有些变

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-041)、现代蜂产业体系建设(nycytx-43-kxj6)、国家重点基础研究计划项目(973 计划)(2006BAD06B04)。

** E-mail:shl2004@126.com

*** 通讯作者,E-mail:ztapis@263.net

收稿日期:2010-11-26,接受日期:2010-12-23

化是不易观察到的，比如蜜蜂的学习能力和嗅觉敏感性的改变等。在生产实践中，慢性中毒造成的影响由于其不易引起人们重视，所以带来的损失往往不亚于急性中毒（Davis ，1989；MacKenzie and Winston，1989）。因此，杀虫剂对蜜蜂的亚致死效应尤其是长期效应越来越受到重视（NRCC，1981；Haynes，1988；Pajot，2001）。在杀虫剂对蜜蜂的亚致死效应中，杀虫剂对蜜蜂行为的影响是最易观察的。

目前，在植保、园艺以及农作物病虫害防治中杀虫剂仍然发挥着重要作用。常用的杀虫剂大多是神经毒剂，主要包括有机磷酸酯类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、烟碱类、沙蚕毒素类、多杀菌素类、甲脒类和阿维菌素类等。其中，溴氰菊酯（deltamethrin）属于拟除虫菊酯类杀虫剂，主要作用于昆虫神经膜钠离子通道；吡虫啉（imidacloprid）则属于新烟碱类，其作用靶标是昆虫的烟碱型乙酰胆碱受体。这 2 种杀虫剂对蜜蜂的毒性机理不同，产生的中毒效应可能也不同。因此作者以溴氰菊酯和吡虫啉 2 种杀虫剂为代表，通过蜜蜂的喙伸反应研究亚致死剂量杀虫剂对蜜蜂嗅觉敏感性的影响，从而为研究杀虫剂对蜜蜂的影响以及合理使用杀虫剂和开展蜜蜂保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用意蜂 *Apis mellifera ligustica* L. 工蜂取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂保护和生物安全研究室实验蜂场；所用杀虫药剂为 0.6% 溴氰菊酯乳油制剂（江苏省宜兴市宜州化学制品有限公司）和 70% 吡虫啉水分散粒剂（美国百思特作物科学国际有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 试验主体方法 喙伸反应：用水或糖溶液等食物接触或不接触刺激蜜蜂的触角而使其产生取食动作的喙伸展行为，该反应可用于研究蜜蜂对糖类等食物的气味敏感性以及评价亚致死剂量杀虫剂对蜜蜂行为的影响（Decourtye *et al.*，2005）。

1.2.2 蜜蜂选择及处理 对新出房蜜蜂进行标记，然后随机选取 18 日龄的青壮年工蜂。参照 Decourtye 等（2004）和 El Hassani（2008）的方法分别配制含有亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉的蔗糖溶液，处理方法借鉴农业部农药检定所提供的蜜蜂毒性试验方法——摄入法，即分别对每只蜂定量饲喂所配制蔗糖溶液。

1.2.3 试验工蜂的筛选 将所取工蜂置于直径约 3 mm 的吸管中，露出头部和前足，用大头针从侧面插入吸管，从工蜂胸部和腹部的节结处穿过，卡住工蜂，使其不能爬出吸管且在试验过程中不会死亡。将固定好的工蜂放入 35℃ 恒温箱中，恒温箱内湿度保持在 65% ~70% 之间，并且保证充足的饲料和水源供应，过夜安静饲养，筛选正常、活泼的工蜂用于试验。

1.2.4 工蜂对不同浓度蔗糖溶液的反应 将工蜂饥饿 2 h 后，从恒温箱取出，在恒温箱外用玻璃棒蘸水靠近工蜂的触角，观察并记录喙伸展情况。若喙伸展，则记为发生喙伸反应；反之，则记为未发生喙伸反应。同样方法分别依次用浓度为 0.1%、0.3%、1%、3%、10% 和 30% 的蔗糖溶液刺激工蜂，水以及各浓度蔗糖溶液刺激的间隔时间为 3 min，记录喙伸反应情况。共设置 3 组重复，每个重复 20 只蜂。

1.2.5 杀虫剂对工蜂喙伸反应的影响 第 1 步：将工蜂饥饿 2 h 后，从恒温箱取出，在恒温箱外用玻璃棒蘸水靠近工蜂的触角，观察并记录喙伸展情况。同样方法分别依次用浓度为 0.1%、0.3%、1%、3%、10% 和 30% 的蔗糖溶液刺激工蜂，水以及各浓度蔗糖溶液刺激的间隔时间为 3 min，记录喙伸反应情况；第 2 步：0.5 h 后，对每只蜂分别饲喂含有亚致死剂量溴氰菊酯的 30% 蔗糖溶液 10 μL，然后放回恒温箱；第 3 步：2 h 之后，重复第 1 步，分别记录工蜂对水以及各浓度蔗糖溶液的喙伸反应情况。

依照上述步骤，试验并记录亚致死剂量吡虫啉处理前后工蜂对水以及各浓度蔗糖溶液的喙伸反应情况。

1.3 数据处理

将所得数据用 EXCEL 和 SAS 8.0 处理。喙伸反应率（%）=（发生喙伸反应的蜜蜂数 - 水刺激发生喙伸反应的蜜蜂数）/（受试蜜蜂数 - 水刺激发生喙伸反应的蜜蜂数）× 100。水应激指数（water responsiveness index，WRI）= 喂药后水刺激

发生喙伸反应的蜜蜂数 - 喂药前水刺激发生喙伸反应的蜜蜂数(El Hassani *et al.*,2008)。

2　结果与分析

2.1　工蜂对不同浓度蔗糖溶液的反应

工蜂对浓度分别为 0.1%、0.3%、1%、3%、10% 和 30% 蔗糖溶液的喙伸反应率见表 1。可以看出,当蔗糖浓度从 0.1% 增加到 0.3% 以及从 3% 增加到 10% 时,蜜蜂的喙伸反应率均显著升高(表 1)。随着蔗糖溶液浓度的增加,蜜蜂的喙伸反应率也随之升高,这与蜜蜂偏好于较高浓度的蔗糖溶液有关。

表 1　工蜂对不同浓度蔗糖溶液刺激的喙伸反应率

Table 1　PER rate of *Apis mellifera ligustica* stimulated with different concentrations of sucrose solution

蔗糖(%) Sucrose	0.1	0.3	1	3	10	30
喙伸反应率(%) PER rate	31.298 ± 4.405[a]	46.438 ± 12.174[b]	56.813 ± 22.978[b]	70.500 ± 10.119[b]	74.343 ± 11.784[c]	86.423 ± 5.904[c]

注:表中数据为平均值 ± 标准差,数据后标有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

The datas in the table are mean ± SD, and those followed by different letters indicate significantly different at 0.05 level.

2.2　溴氰菊酯和吡虫啉对工蜂水应激指数的影响

分别测定了溴氰菊酯和吡虫啉处理后工蜂的水应激指数,结果见图 1。从图 1 可以看出,溴氰菊酯处理的工蜂水应激指数呈现负值,而吡虫啉处理的工蜂水应激指数呈现正值,2 种处理导致工蜂对水敏感性的变化相反,溴氰菊酯导致工蜂对水的敏感性降低,吡虫啉导致工蜂对水的敏感性升高。

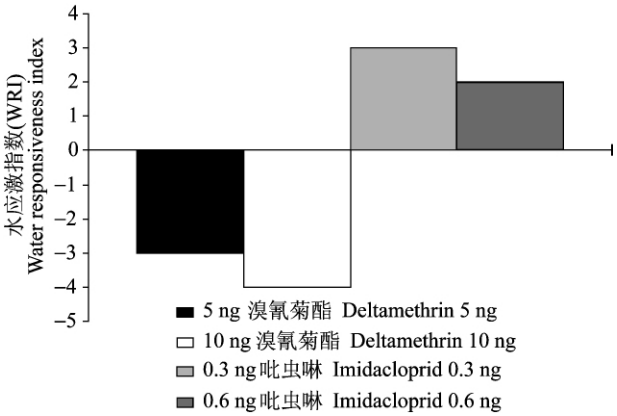

图 1　溴氰菊酯和吡虫啉对工蜂水应激指数的影响

Fig. 1　Effects of deltamethrin and imidacloprid on the WRIs of *Apis mellifera ligustica*

2.3　溴氰菊酯对工蜂喙伸反应的影响

溴氰菊酯处理前后工蜂的喙伸反应率变化如图 2,3 所示。χ^2 检验发现,经口饲喂 5 ng 溴氰菊酯后,工蜂对浓度为 0.1% 的蔗糖溶液刺激的喙伸反应率显著下降($P < 0.05$),而对其它浓度蔗糖刺激的喙伸反应率没有明显变化(图 2);经口饲喂 10 ng 溴氰菊酯后,蜜蜂对 0.1% 蔗糖溶液刺激的喙伸反应率下降显著($P < 0.05$),而对 1% 蔗糖溶液刺激的喙伸反应率下降则达到极显著($P < 0.01$)(图 3)。亚致死剂量的溴氰菊酯导致蜜蜂对蔗糖溶液的敏感性下降,并且随着药剂浓度的增加,其作用更加明显。

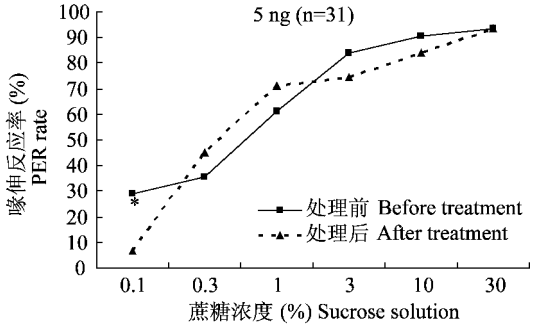

图 2　5ng 溴氰菊酯对工蜂喙伸反应的影响

Fig. 2　Effects of 5ng deltamethrin on the PER of *Apis mellifera ligustica*

*　表示经 χ^2 检验差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。下图同。

*　Significant difference at the 0.05 level by χ^2 test; **Significant difference at the 0.01 level by χ^2 test. The same below.

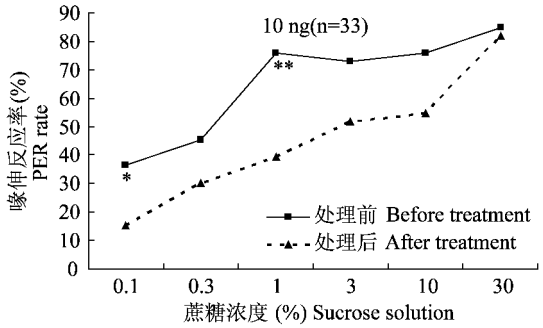

图 3　10 ng 溴氰菊酯对工蜂喙伸反应的影响

Fig. 3　Effects of 10 ng deltamethrin on the PER of *Apis mellifera ligustica*

2.4　吡虫啉对工蜂喙伸反应的影响

吡虫啉处理前后工蜂的喙伸反应率变化如图 4,5 所示。可以看出,经口饲喂 0.3 ng 和 0.6 ng 的吡虫啉后,工蜂对蔗糖溶液刺激的喙伸反应率均有下降趋势,但经 χ^2 检验发现,处理前后工蜂的喙伸反应率并没有显著性差异。

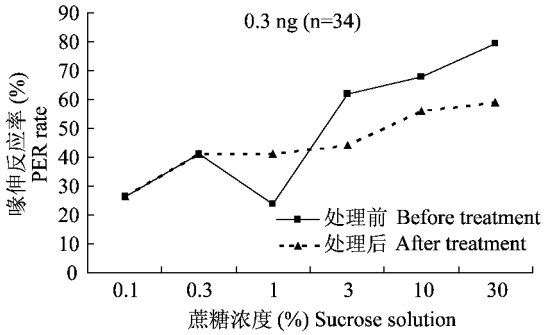

图 4　0.3 ng 吡虫啉对工蜂喙伸反应的影响

Fig. 4　Effects of 0.3 ng imidacloprid on the PER of *Apis mellifera ligustica*

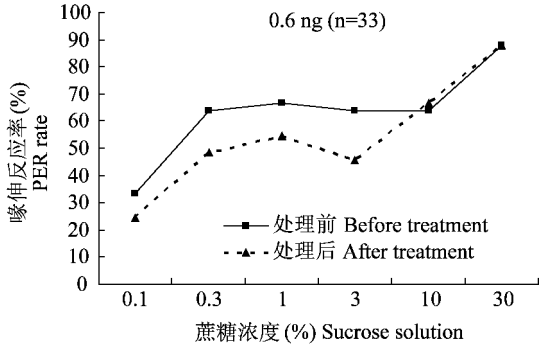

图 5　0.6 ng 吡虫啉对工蜂喙伸反应的影响

Fig. 5　Effects of 0.6 ng imidacloprid on the PER of *Apis mellifera ligustica*

3　讨论

蜜蜂对蜜源丰富程度的判断主要取决于蜜蜂对不同浓度糖的敏感程度,因此蜜蜂嗅觉的敏感性对蜜蜂来说十分重要。从对蜜蜂对蔗糖溶液的嗅觉敏感性的试验结果来看,蜜蜂倾向于喜欢较高浓度的糖溶液,这与颜伟玉等(2008)的研究结果相符合。

目前,在国内外尤其是国外的许多科学试验中,喙伸反应常常被用于研究蜜蜂在正常或者胁迫环境下对不同气味以及不同浓度糖溶液的敏感性。通过设置一系列浓度梯度的糖溶液对蜜蜂进行刺激,能够获得使蜜蜂产生喙伸反应的蔗糖浓度,从而可以确定蜜蜂对蔗糖溶液的反应阈值(Scheiner *et al.*, 2004)。通过这种方法,Page 等(1998)发现采蜜和采花粉的蜜蜂对蔗糖的反应浓度并不相同,采花粉的蜜蜂对蔗糖溶液的反应阈值较采蜜的蜜蜂低。所以,根据作者的试验结果可以推测,在亚致死剂量范围内低浓度的溴氰菊酯主要影响采花粉的蜜蜂,而高浓度的溴氰菊酯对采蜜蜜蜂的影响较大。

试验表明,亚致死剂量的溴氰菊酯导致蜜蜂对蔗糖的敏感性大大降低,尤其对低浓度的蔗糖溶液更是如此,由此可以推断,接触到亚致死剂量溴氰菊酯而中毒的蜜蜂对蜜粉源植物的发现以及鉴别能力将受到限制。2 种杀虫剂处理之后蜜蜂的水应激指数也有不同,其中溴氰菊酯为负值,吡虫啉为正值,说明溴氰菊酯处理降低了蜜蜂对水的敏感性,而吡虫啉处理增加了蜜蜂对水的敏感性,推测吡虫啉可能导致蜜蜂产生了“渴感”。另外,有研究表明,亚致死剂量的溴氰菊酯对蜜蜂的学习记忆行为产生了影响(Decourtye *et al.*, 2004),这也表现在蜜蜂蔗糖溶液的嗅觉敏感性方面,推测亚致死剂量的溴氰菊酯可能损坏了蜜蜂大脑负责学习记忆和感觉气味的神经区域的功能。

亚致死剂量杀虫剂引起的蜜蜂生理和行为的变化可能会影响到整个蜂群,因此了解杀虫剂的亚致死效应对蜜蜂的影响,对解析和评估杀虫剂对蜜蜂生长、生存以及生产性能的影响,从而促进更加合理地使用杀虫剂具有重要意义。国内外对于杀虫剂对蜜蜂的影响也做过很多研究。周婷等(2003,2008)研究了杀虫剂对蜜蜂钠离子通道的

影响并从电生理方面做了研究;代平礼等(2007)进行了几种常用杀虫剂对蜜蜂的毒力测定,确定了几种杀虫剂对蜜蜂的毒力回归公式;Decourtye 等(2003)利用古典制约原理将蜜蜂的喙伸反应与气味结合研究蜜蜂的学习能力,发现经过吡虫啉处理的蜜蜂其嗅觉学习能力明显降低。在亚致死剂量杀虫剂对蜜蜂嗅觉敏感性的影响方面,El Hassani 等(2005)也做了类似的试验,发现饲喂亚致死剂量的氟虫腈并没有影响蜜蜂对蔗糖的嗅觉敏感性,而通过背板滴药却降低了蜜蜂对低浓度蔗糖的嗅觉敏感性。本试验仅从蜜蜂的喙伸反应这一生物学行为探讨了杀虫剂对蜜蜂的影响,还需要深入研究并对产生这种现象的生理生化机制做出合理的解释。另外,不同类型的杀虫剂对昆虫的作用机理并不相同,它们对蜜蜂产生的亚致死效应亦不同,若要得到有关杀虫剂对蜜蜂影响的更全更充分的材料,还应对尽可能多的更具代表性的杀虫剂进行研究。

参考文献(References)

代平礼,王强,孙继虎,周婷,刘锋,王星,2007. 4 种农药对意大利蜜蜂的毒力测定. 农药,46(8):546—547.

代平礼,王强,孙继虎,周婷,刘锋,吴艳艳,罗其花,徐书法,2009. 农药对蜜蜂行为的影响. 昆虫知识,46(6):857.

Davis AR, 1989. The study of insecticide poisoning of honeybeebrood. *Bee World*, 70(4): 163—174.

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue MH, 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(3): 410—419.

Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delegue MH, 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48(2): 242—250.

Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue MH, 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.*, 59(3): 269—278.

El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C, 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(4):653—661.

El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C, 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 82(1): 30—39.

Haynes KF, 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu. Rev. Entomol.*, 33: 149—168.

林小丽,叶纪明,单正军,周军英,程燕,2008. 农药对蜜蜂的风险评价技术进展. 农药学学报,10(4): 404—409.

罗其花,彭文君,安建东,2008. 蜂群衰竭失调病(CCD)致病因子分析及我国的应对措施. 昆虫知识,45(6): 991—995.

Mackenzie KE, Winston ML, 1989. Effects of sublethal exposure to diazinon on longevity and temporal division of labor in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 82: 75—82.

NRCC. 1981. Pseticide-Pollinator Interactions, NRCC/CNRC Ottawa, Publication No. 18471. 190.

Page RE Jr, Erber J, Fondrk MK, 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A*, 182(4): 489—500.

Pajot S, 2001. Dossier Gaucho. *Abielles et Fleurs*, 616: 160—165.

Scheiner R, Page RE, Erber J, 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologyie*, 35: 133—142.

苏松坤译,2008. 蜜蜂的神奇世界. 北京:科学出版社. 26.

周婷,王强,姚军,2003. 钠离子通道与蜜蜂狄斯瓦螨对氟胺氰菊酯的抗性机理. 昆虫知识,40(6): 493—494.

周婷,王强,代平礼,张毅力,孙继虎,2008. 成年蜜蜂脑神经细胞的培养和电生理特征. 昆虫学报,51(7): 700—706.

颜伟玉,杨裕平,王茂安,曾志将,2008. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂对糖浓度的反应. 蜜蜂杂志,28(5): 3—4.