

化学感受蛋白 Amel-CSP3 和 Amel-CSP4 在意大利蜜蜂成年工蜂中的时空表达水平研究*

齐磊^{1**} 施腾飞^{1,2} 刘芳¹ 王宇飞² 余林生^{1***}

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

摘要 【目的】化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 广泛存在于昆虫的触角等化学感受器中, 在昆虫的化学感受系统中发挥着重要的作用, 为探究 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 成年工蜂中的时空表达水平及功能。【方法】首先通过荧光定量 PCR 技术检测了 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在哺育蜂和采集蜂的触角、头部、胸部、腹部和腿的表达水平; 然后对不同日龄工蜂 (1, 6, 12, 18, 28 日龄) 触角中 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 的表达情况进行检测。【结果】*Amel-CSP3* 在哺育蜂和采集蜂触角均具有较高的表达水平, 其在 28 日龄触角中的表达水平最高, 显著的高于其他日龄 ($P < 0.05$); *Amel-CSP4* 仅在工蜂触角表达, 其在触角中表达水平随着工蜂日龄的增加而逐渐降低。【结论】*Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在意大利蜜蜂工蜂中的表达水平具有显著地时空特异性, 这对探究 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 以及整个 CSPs 家族的功能具有一定的生物学意义。

关键词 意大利蜜蜂, 工蜂, 化学感受蛋白, 时空表达, 荧光定量 PCR

Spatiotemporal expression levels of the chemosensory proteins *Amel-CSP3* and *Amel-CSP4* in adult *Apis mellifera ligustica* workers

QI Lei^{1**} SHI Teng-Fei^{1,2} LIU Fang¹ WANG Yu-Fei² YU Lin-Sheng^{1***}

(1. College of Animal Science & Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China;

2. College of Plant Protection; Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] Chemosensory proteins are abundantly distributed in the antennae and other chemosensory organs of insects, and are believed to play important roles in the chemosensory system. This work aims to study the temporal and spatial expression levels, and explore the functions of, two chemosensory proteins, *Amel-CSP3* and *Amel-CSP4*, in adult *Apis mellifera ligustica* workers. [Methods] Expression levels of *Amel-CSP3* and *Amel-CSP4* in different organs of nurses and foragers, and in the antennae of 1, 6, 12, 18 and 28 day-old workers, were quantified with RT-qPCR. [Results] *Amel-CSP3* was more highly expressed in the antennae of both nurses and foragers, and its expression level in the 28 day-old workers was significantly higher than that in younger workers ($P < 0.05$). *Amel-CSP4* was only expressed in workers' antennae, where its expression decreased with age. [Conclusion] The expression of *Amel-CSP3* and *Amel-CSP4* had a high degree of spatiotemporal specificity in adult *Apis mellifera ligustica* workers. This finding provides important information for exploring the function of *Amel-CSP3*, *Amel-CSP4*, and other chemosensory proteins, in *A. m. ligustica*.

Key words *Apis mellifera ligustica*, worker, chemosensory proteins, temporal-spatial expression level, RT-qPCR

昆虫在进化过程中, 发展演变了复杂的化学信息感受机制, 能够通过敏锐的嗅觉、味觉等感

受环境中的化学刺激因子, 完成觅食、交配、产卵等行为 (Pilpel and Lancet, 1999; Pelosi *et al.* ,

*资助项目 Supported projects: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-45-KXJ9)

**第一作者 First author, E-mail: 1273657548@qq.com

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

收稿日期 Received: 2016-09-09, 接受日期 Accepted: 2016-10-13

2014)。昆虫的化学感受器官中主要存在气味结合蛋白 (Odorant-binding proteins, OBPs) 和化学感受蛋白 (Chemosensory protein, CSPs) 两种蛋白家族。

CSPs 是一种小的保守的可溶性蛋白, CSPs 家族的第一个成员首先在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被发现, 由于其在果蝇触角中特异性表达而被称为可溶性嗅觉特异蛋白 (Olfactory specific-D, OS-D) (McKenna *et al.*, 1994)。随着昆虫基因组研究的全面发展, 越来越多的昆虫化学感受蛋白基因被发现 (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2014)。CSPs 最初在果蝇的成熟嗅觉器官和美洲蟑螂 *Periplaneta americana* 再生腿中被发现, 这显示其在不同种类昆虫中具有嗅觉或者调节昆虫生长发育的功能 (Nomura *et al.*, 1992; McKenna *et al.*, 1994; Pikielny *et al.*, 1994; Picimbon *et al.*, 2003)。沙漠蝗虫 *Schistocerca gregaria* 和日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 的 CSPs 作为气味结合蛋白在将疏水性感觉分子传递给感觉器官的过程中发挥着作用 (Angeli *et al.*, 1999; Ozaki *et al.*, 2005)。Maleszka 等 (2007) 研究发现沉默表达意大利蜜蜂 (简称意蜂) 卵中的 *Amel-CSP5* 将导致蜜蜂头部的畸形发育。近年来的研究数据显示 CSPs 不仅在昆虫触角、腿、翅膀等化学感受器中具有较高的水平, 而且广泛存在于昆虫的各种组织中 (Picimbon *et al.*, 2001; Pelosi *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Dani *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2016)。CSPs 不仅具有嗅觉功能, 在昆虫体内还发挥着其他多样的生理功能 (Pelosi *et al.*, 2006; Sánchez-Gracia *et al.*, 2009)。在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中, CSP3 对其群居型和散居型生理状态的转变发挥着重要的作用 (Guo *et al.*, 2011)。烟粉虱 *Bemisia tabaci* 和家蚕 *Bombyx mori* 体内的 CSPs 能够作为杀虫剂的清除剂, 在昆虫的抗药性中发挥作用 (Liu *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2014)。CSPs 因其复杂多样的功能, 越来越成为昆虫学中研究的热点。

意蜂共有 6 种化学感应蛋白 Amel-CSP1~Amel-CSP6 (Foret *et al.*, 2006), 已经有研究表明 Amel-CSP5 特异性的存在于卵中并参与胚胎的发育 (Maleszka *et al.*, 2007), Amel-CSP3 在幼虫信息素运输中发挥着重要的作用 (Briand *et al.*, 2002), Amel-CSP3 不仅仅只存在于触角等化学感受器官中, 在意蜂的其他部位也有较高的水平 (Foret *et al.*, 2006), 说明 Amel-CSP3 可能还具有其他生理功能, 意蜂 Amel-CSP1~Amel-CSP6 的具体精确功能仍需进一步探究。意蜂是真社会性昆虫, 一直是人类研究动物复杂社会行为的最佳模式昆虫之一 (Robinson *et al.*, 2005)。正常蜂群中的工蜂有着明确的社会分工, 其中最为经典的就是哺育和采集行为。工蜂一般在出房后的 2~3 周内主要从事巢内哺育工作, 称为哺育蜂 (Seeley, 1982; Crailsheim, 1991, 1992); 18 日龄左右会进行试飞, 此后则主要参与巢外采集工作, 即为采集蜂, 主要采集花蜜、花粉、蜂胶等 (Winston, 1987; Robinson, 1992), 采集蜂可能对植物花挥发物更加敏感。在本研究中, 我们运用荧光定量 PCR 技术分别检测 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在哺育蜂和采集蜂不同部位的表达水平, 同时对不同日龄工蜂触角中 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 的表达水平进行了定量分析。这不仅能够更好的了解和预测 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 的功能, 为进一步探索 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 的功能提供了一定的方向和理论基础, 而且对于探究整个 CSPs 家族的功能具有一定的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂

实验所用的意大利蜜蜂是由安徽农业大学蜂业研究所实验蜂场提供。选取 3 个群势较强的蜂群, 采集蜂的取样: 在蜂箱的巢门口采集腿部携带花粉准备回巢的蜜蜂; 哺育蜂的取样: 将对应蜂群的小幼虫移虫至产浆框, 并将产浆匡放入对应的蜂群中, 2 日后采集正在吐王浆的蜜蜂。再从这 3 个蜂群中选取即将出房的封盖子脾, 放

入已设定好的恒温恒湿培养箱,翌日标记已出房蜜蜂,作为 1 日龄,并将标记好的幼蜂放入对应的蜂群中,此后再分别采集 6 日龄和 12 日龄哺育蜂、18 日龄试飞蜂、28 日龄采集蜂。所采集的蜜蜂样品都立即放入液氮中保存。

1.2 试剂

RNAiso Plus、PrimeScript®RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR® Premix ExTaq™ (TilRNaseH plus) 均购于 TaKaRa 宝生物公司。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

分别将 50 只蜜蜂触角、10 只蜜蜂头部、10 只蜜蜂腿部、5 只蜜蜂胸部和 5 只蜜蜂腹部放入液氮进行研磨至粉末,再按照 RNAiso Plus 的说明分别提取各部位及个日龄触角 RNA。最后得到的总 RNA 用 NanoDrop2000 分光光度计测定, A260/A280: 1.8~2.2, 符合标准,并记录其总 RNA 的浓度。

对总 RNA 进行稀释,使最终的浓度为 300 ng/μL。反转录体系为 10 μL 体系: 5×Prime Script® Buffer (for Real Time) 2 μL; Prime Script® RT Enzyme Mix 1 0.5 μL; Oligo dT Primer(50 μmol/L) 0.5 μL; Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL; Total RNA 1 μL; RNase FreedH₂O 5.5 μL。反转录反应条件: 37°C 15 min (反转录反应), 85°C 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.4 引物设计

本实验所用基因的正向和反向引物序列均引用自 Foret 等(2006),引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 本研究所用基因正向和反向引物序列
Table 1 Forward and reverse sequenses of genes used in this study

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>Amel-CSP3</i>	F: TGGCTGCTCGTCCAGACGA
	R: TCGTATTTGTTGGCAAGGGA
<i>Amel-CSP4</i>	F: AAGTACGACAACGTGCGACA
	R: ATAAGCTCCCGTTGGATCA
<i>β-actin</i>	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG
	R: AGAATTGACCCACCAATCCA

1.5 PCR

50 μL PCR 反应体系: Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 25 μL, cDNA 1 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, DEPC 水 22 μL。反应条件: 98°C 10 s, 68°C 40 s, 30 个循环。对得到的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,并拍照记录。

1.6 实时荧光定量 PCR

以 *β-actin* 为管家基因检测目的基因相对表达量, 20 μL 反应体系: SYBR® Primix Ex Taq™ 10 μL; PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL; ROX Referece Dye 0.4 μL; DNA 模板 2.0 μL; dH₂O (灭菌蒸馏水) 6.8 μL; Total 20.0 μL。以上步骤均在冰上操作。每个样品设置 3 个重复,相应的基因设置阴性参照。反应条件为: 预变性反应: 95°C 30 s; PCR 反应: 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线: 95°C 15 s, 60°C 1 min。

1.7 荧光定量 PCR 中基因的扩增效率

将哺育蜂触角的 cDNA 连续进行 4 次 10 倍稀释,将会得到 5 个 cDNA 样本,并把原始 cDNA 量定义为 10⁴。以这 5 个 cDNA 样本为模板,并运用目的基因和管家基因的正向和反向引物进行荧光定量 PCR。并根据公式: $E=10^{(-1/slope)} - 1$ (Bustin *et al.*, 2009) 分别计算 *β-actin* 与目的基因的扩增效率。

1.8 数据分析

运用 SPSS Statistics 单因素方差分析(ANOVA) 对各组数据的表达差异进行分析,并运用 Duncan's 多重检验法进行显著性差异检验。基因表达线形图由 GraphPad Prism 5 制作, *β-actin* 与目的基因标准曲线图由 WPS 表格制作。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 PCR 扩增特异性

以意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂不同部位及不同日龄蜜蜂触角的 cDNA 为模板,利用 *Amel-*

CSP3 和 Amel-CSP4 正向和反向引物, 进行 PCR 反应, 所得产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示每个泳道只有一条条带, 无非特异性条带 (图 1, 图 2), 说明总 RNA 提取和 PCR 扩增体系反应良好。目的基因与管家基因 β -actin 的溶解曲线均只有一个特异性单峰且溶解温度单一, 扩增曲线良好。这说明引物特异性强, 结果真实可靠。

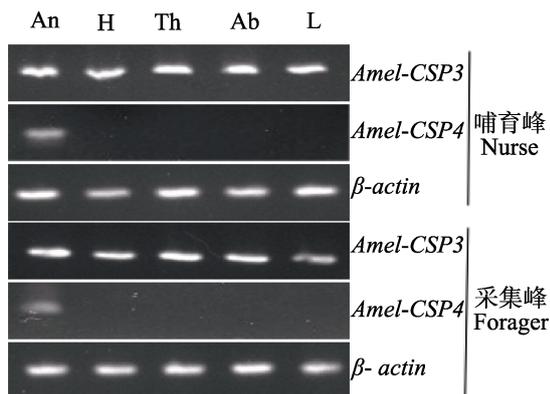


图 1 哺育蜂和采集蜂不同部位 Amel-CSP3, Amel-CSP4 和 β -actin 的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR of Amel-CSP3, Amel-CSP4 and β -actin in different parts of nurse and forager

An: 触角; H: 头部; Th: 胸部; Ab: 腹部; L: 腿部。
An: Antenna; H: Head; Th: Thorax; Ab: Abdomen; L: Leg.

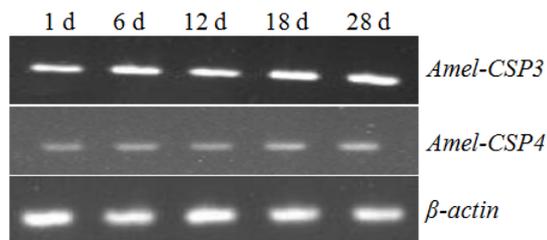


图 2 不同日龄工蜂触角中 Amel-CSP3, Amel-CSP4 和 β -actin 的 RT-PCR 结果

Fig. 2 RT-PCR of Amel-CSP3, Amel-CSP4 and β -actin in workers at different day old

1 d: 1 日龄; 6 d: 6 日龄; 12 d: 12 日龄; 18 d: 18 日龄; 28 d: 28 日龄。

1 d: 1 day-old; 6 d: 6 day-old; 12 d: 12 day-old; 18 d: 18 day-old; 28 d: 28 day-old.

2.2 荧光定量 PCR 中基因扩增效率

将采集蜂触角的 cDNA 进行 4 次 10 倍稀释, 得到 5 个 cDNA 样本, 以此为模板, 用 Amel-CSP3,

Amel-CSP4 和 β -actin 的引物进行实时荧光定量 PCR, 绘制 Ct 值与不同模板浓度对数 (lg) 之间的标准曲线。结果显示目的基因 Amel-CSP3 和 Amel-CSP4 以及管家基因 β -actin 的标准曲线斜率分别是 -3.424, -3.3744 和 -3.428, 线性相关系数分别为 0.989, 0.99 和 0.9902 (图 3)。通过公式可知目的基因和 β -actin 的扩增效率分别为 0.9591, 0.9786 和 0.9576, 符合比较 Ct 法标准。

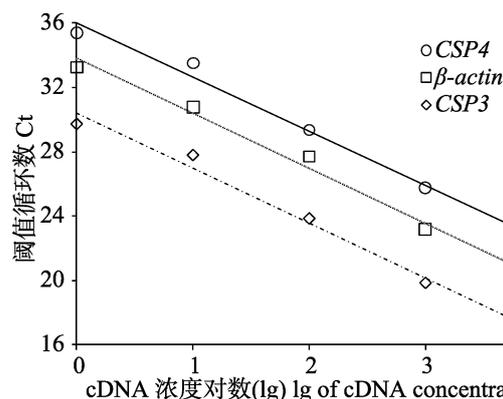


图 3 Amel-CSP3, Amel-CSP4 和 β -actin 的标准曲线

Fig. 3 Standard curves of Amel-CSP3, Amel-CSP4 and β -actin

2.3 CSP3 在意大利蜜蜂工蜂中的时空表达水平

本研究选取 β -actin 为管家基因, 分别以工蜂 (哺育蜂和采集蜂) 触角和 1 日龄工蜂触角为对照样本, 采用实时荧光定量 PCR 法分别检测了 Amel-CSP3 在工蜂不同部位和不同日龄工蜂触角的表达水平。Amel-CSP4 的检测方法亦是如此。

Amel-CSP3 在工蜂的不同部位 (触角、头、胸、腹和腿) 都有较高的表达水平 (图 1)。Amel-CSP3 在哺育蜂触角和腿部均高表达, 且在这两个部位的表达水平均显著高于其他部位 ($P < 0.05$), 其在头、胸和腹部中的表达水平差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。Amel-CSP3 在采集蜂触角中的表达水平最高, 显著的高于其他部位的表达水平 ($P < 0.05$), 而其在腹部的最低, 均显著地低于在其他部位的表达水平 ($P < 0.05$), Amel-CSP3 在采集蜂头、胸和腿中的表达水平没有明显差异 ($P > 0.05$) (图 5)。Amel-CSP3 在 28

日龄工蜂触角中的表达水平最高,显著的高于其他日龄 ($P<0.05$), 而其在其他日龄工蜂触角中均稳定表达 ($P>0.05$) (图 6)。

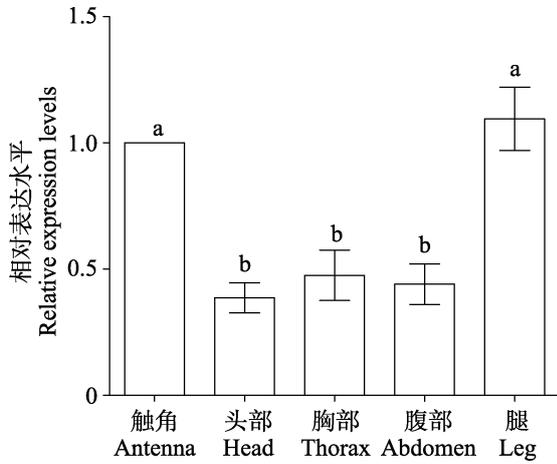


图 4 Amel-CSP3 在哺育蜂中的空间表达水平
Fig. 4 Spatial expression levels of Amel-CSP3 in nurse

图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$) (Duncan's 新复极差检验)。下同。
Data are mean ± SE. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

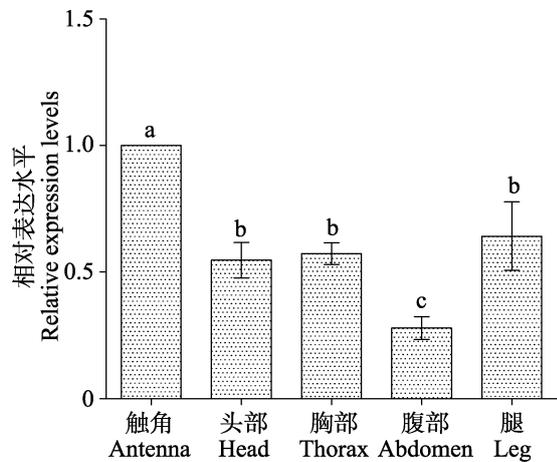


图 5 Amel-CSP3 在采集蜂中的空间表达水平
Fig. 5 Spatial expression levels of Amel-CSP3 in forager

2.4 CSP4 在意大利蜜蜂工蜂中的时空表达水平

Amel-CSP4 均仅在工蜂 (哺育蜂和采集蜂) 的主要嗅觉器官触角中表达, 在其他部位的表达水平均超级低, 可以忽略不计 (图 1, 图 7, 图 8)。Amel-CSP4 在刚出房 (1 日龄) 工蜂触角中表达水平最高, 显著地高于其在其他日龄工蜂触

角中的表达水平 ($P<0.05$), 此后随着工蜂日龄的增长, Amel-CSP4 的表达水平则逐渐降低, 其在 28 日龄采集蜂触角中的表达水平也显著的低于 6 日龄和 12 日龄的哺育蜂 ($P<0.05$) (图 9)。

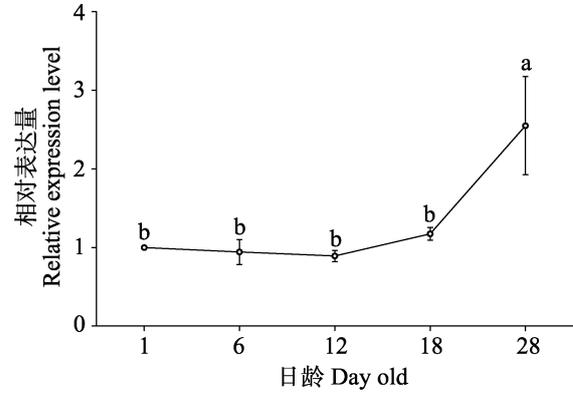


图 6 Amel-CSP3 在不同日龄工蜂触角中的表达水平
Fig. 6 Expression levels of Amel-CSP3 in antenna of worker at different day old

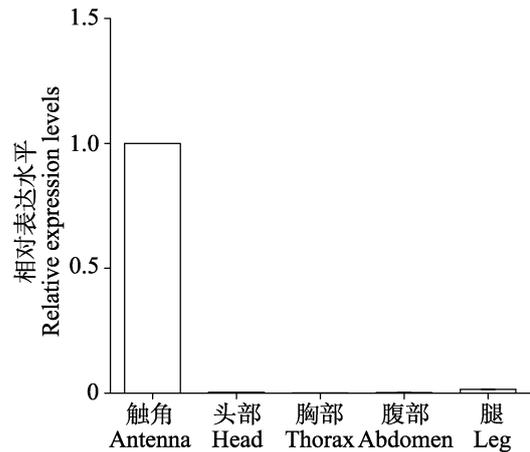


图 7 Amel-CSP4 在哺育蜂中的空间表达水平
Fig. 7 Spatial expression levels of Amel-CSP4 in nurse

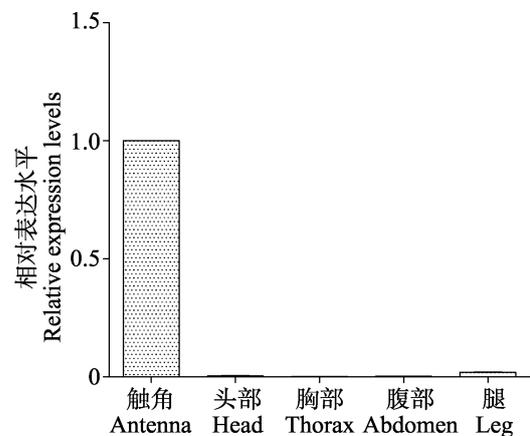


图 8 Amel-CSP4 在采集蜂中的空间表达水平
Fig. 8 Spatial expression levels of Amel-CSP4 in forager

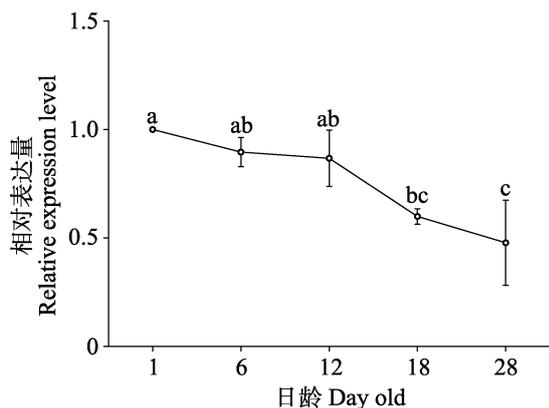


图 9 *Amel-CSP4* 在不同日龄工蜂触角中的表达水平
Fig. 9 Expression levels of *Amel-CSP4* in antenna of worker at different day old

3 讨论

化学感受蛋白是昆虫化学感受器官中的重要的小的保守的可溶性蛋白,它广泛存在于包括触角、跗节等化学感受器在内的多种昆虫组织中 (Picimbon *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2016), 它在昆虫中具有复杂多样的功能,如嗅觉功能、免疫作用以及调节昆虫生理节律和发育等功能 (Pelosi *et al.*, 2006)。本研究运用荧光定量 PCR 技术首先检测了 2 种化学感受蛋白基因 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂中的表达水平,结果表明 *CSP3* 在工蜂 (哺育蜂和采集蜂) 各个部位均表达,其中在触角具有较高的表达水平。*Amel-CSP4* 只在工蜂触角中表达,在腿部则只有非常低的表达量,而在其他部位则几乎不表达。这一结果与之前 Foret 等 (2006) 的研究是一致的。触角是意大利蜜蜂重要的感觉器官,蜜蜂能够通过触角鞭毛上的感觉结构行使嗅觉、味觉功能并能感受机械刺激 (Esslen and Kaissling, 1976)。这提示 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 有可能参与意蜂工蜂的嗅觉、味觉及其他一些化学感受功能,而 *Amel-CSP3* 可能还具有其他多样的生理功能。

然后我们又检测了 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在不同日龄工蜂触角中的表达水平,结果显示 *Amel-CSP3* 在 28 日龄工蜂触角中的表达水平最高,极显著的高于其他日龄的工蜂 ($P < 0.01$);

Amel-CSP4 在 1 日龄工蜂触角中表达水平最高,且在 12 日龄前的工蜂中表达较为稳定,其在 28 日龄采集蜂中表达水平最低, *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在工蜂触角中的表达均具有显著地时间特异性。关于意蜂 *Amel-CSP3* 研究较早,早在 10 多年前, Briand 等 (2002) 就报道了其能与 16~18 个碳的幼虫信息素特异性结合,在幼虫信息素运输中发挥着一定的功能。最新的研究显示意蜂采集蜂能够通过感受幼虫信息素调节花蜜与花粉采集的平衡 (Traynor *et al.*, 2015), 这预示着 *Amel-CSP3* 可能对工蜂的采集行为具有一定的影响作用。中华蜜蜂 (中蜂) 是原产我国本土的一个重要蜂种,其与意蜂 *Amel-CSP3* 同源的 *Acer-CSP3* 在中蜂工蜂触角、腿等化学感受器中均有较高表达水平 (Li *et al.*, 2016), *Acer-CSP3* 与植物花和叶次生代谢产物配基有较强的结合能力,其可能在中蜂搜索花粉蜜源时发挥一定的作用 (李红亮等, 2011)。虽然意蜂 *Amel-CSP3* 与中蜂 *Acer-CSP3* 的配基结合存在差异, *Amel-CSP3* 与正十三醇有较强的结合能力 (Dani *et al.*, 2010), 但是根据化学感受蛋白的保守性,且本研究中 *Amel-CSP3* 在采集蜂触角中高表达,提示 *Amel-CSP3* 在意蜂采集蜂搜索花粉蜜源时可能作为气味运输载体发挥了一些功能。*Amel-CSP4* 在意蜂中研究较少,配基结合实验表明 *Amel-CSP4* 与萜类化合物如 β -紫罗酮和视黄醇具有较强的结合能力 (Dani *et al.*, 2010)。本研究显示 *Amel-CSP4* 在新羽化蜂以及哺育蜂中均高表达,而这些工蜂均主要活动于蜂巢内,大量的感受和曝露于幼虫信息素和蜂王信息素 (Arnold *et al.*, 1994; Amdam *et al.*, 2009), *Amel-CSP4* 可能在运输幼虫信息素和蜂王信息素过程中发挥一定的作用。另外本研究检测 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在不同日龄工蜂触角表达水平时,受到了工蜂日龄和行为 (哺育和采集行为) 的双重影响,在以后的研究中会通过组织同日龄的蜂群,并检测 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 在同日龄哺育蜂与采集蜂以及年幼和年老哺育蜂或采集蜂中的表达差异,这更能精确探究和预测 *Amel-CSP3* 和 *Amel-CSP4* 的功能。

参考文献 (References)

- Amdam GV, Rueppell O, Fondrk MK, Page RE, Nelson CM, 2009. The nurse's load: early-life exposure to brood-rearing affects behavior and life span in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Gerontol*, 44(0): 467–471.
- Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem.*, 262(3): 745–754.
- Arnold G, Le Conte Y, Trouiller J, Hervert H, Chappe B, Masson C, 1994. Inhibition of worker honeybee ovaries development by a mixture of fatty acid esters from larvae. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 317(6): 511–515.
- Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bézirard V, Blon F, Huet JC, Ebert P, Penollet JC, 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur. J. Biochem.*, 269(18): 4586–4596.
- Crailsheim K, 1991. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J. Comp. Physiol. B*, 161(1): 55–60.
- Crailsheim K, 1992. The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B*, 162(8): 681–689.
- Dani FR, Iovinella I, Felicioli A, Niccolini A, Calvello MA, Carucci MG, Qiao HL, Pieraccini G, Turillazzi S, Moneti G, Pelosi P, 2010. Mapping the expression of soluble olfactory proteins in the honeybee. *J. Proteome Res.*, 9(4): 1822–1833.
- Esslen J, Kaissling KE, 1976. Number and distribution of sensilla on antennal flagellum of honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 83(3): 227–251.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(1): 19–28.
- Guo W, Wang X, Ma Z, Xue L, Han J, Yu D, Kang L, 2011. CSP and takeout genes modulate the switch between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. *PLoS Genetics*, 7(2): e1001291.
- Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM, Ma Y, 2013. Functional characterizations of one odorant-binding protein and three chemosensory proteins from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) (Hemiptera: Miridae) legs. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 690–696.
- Jin X, Zhang SG, Zhang L, 2006. Expression of odorant-binding and chemosensory proteins and spatial map of chemosensilla on labial palps of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Arthropod Structure and Development*, 35(1): 47–56.
- Li HL, Zhang LY, Ni CX, Shang HW, 2011. Molecular binding characterization with chemical ligands of a chemosensory protein AcerCSP3 in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* Fabricius(Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 259–264. [李红亮, 张林雅, 倪翠侠, 商晗武, 2011. 中华蜜蜂化学感受蛋白 Acer-CSP3 的配基结合功能分析. *昆虫学报*, 54(3): 259–264.]
- Li HL, Ni CX, Zhang LY, Hu FL, 2016. Chemosensory proteins of the eastern honeybee, *Apis cerana*: identification, tissue distribution and olfactory related functional characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 194/195: 11–19.
- Liu GX, Xuan N, Chu D, Xie HY, Fan ZX, Bi YP, Picimbon JF, Qin YC, Zhong ST, Li YF, Gao ZL, Pan WL, Wang GY, Rajashekar B, 2014. Biotype expression and insecticide response of Bemisia tabaci chemosensory protein-1. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 85(3): 137–151.
- Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.*, 217(3): 189–196.
- McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding-proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16340–16347.
- Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S, 1992. Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.*, 36(3): 391–398.
- Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front Physiol.*, 5: 320.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658–1676.
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12): 1173–1181.
- Picimbon JF, 2003. Biochemistry and evolution of CSP and OBP proteins // Blomquist GJ, Vogt RG (eds.). *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology, the Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles*. London, San Diego: Elsevier Academic Press. 539–566.
- Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbach M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are

- expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1): 35–49.
- Pipfel Y, Lancet D, 1999. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Sci.*, 8(5): 969–977.
- Robinson GE, 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37: 637–665.
- Robinson GE, Grozinger CM, Whitfield CW, 2005. Sociogenomics: social life in molecular terms. *Nature Reviews Genetics*, 6(4): 257–270.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, 2005. Ant nestmate and nonnestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309(5732): 311–314.
- Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208–216.
- Seeley TD, 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 11(4): 287–293.
- Sun HZ, Song YQ, Du J, Wang XD, Cheng ZJ, 2016. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Athetis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 51(3): 409–420.
- Traynor KS, Le Conte Y, Page RE, 2015. Age matters: pheromone profiles of larvae differentially influence foraging behaviour in the honeybee, *Apis mellifera*. *Animal Behavior*, 99: 1–8.
- Winston ML, 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge: Harvard University Press. 89–110.
- Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics*, 10: 632.
- Xuan N, Guo X, Xie HY, Lou QN, Lu XB, Picimbon JF, 2015. Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins. *Insect Science*, 22(2): 203–219.
- Xue W, Fan J, Zhang Y, Xu Q, Han Z, Sun J, Chen J, 2016. Identification and expression analysis of candidate odorant-binding protein and chemosensory protein genes by antennal transcriptome of *Sitobion avenae*. *PLoS ONE*, 11(8): e0161839.
- Yi X, Wang P, Wang Z, Cai J, Hu M, Zhong G, 2014. Involvement of a specific chemosensory protein from *Bactrocera dorsalis* in perceiving host plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 40(3): 267–275.
- Yuan X, Jiang YD, Wang GY, Yu H, Zhou WW, Liu S, Yang MF, Cheng J, Gurr GM, Way MO, Zhu ZR, 2016. Odorant-binding proteins and chemosensory proteins from an invasive pest *Lissorhoptus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.*, 45(5): 1276–1286.
- Zhou JJ, Kan YC, Antoniw J, Pickett JA, Field LM, 2006. Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. *Chemical Senses*, 31(5): 453–465.
- Zhou JJ, Vieira FG, He XL, Smadja C, Liu R, Rozas J, 2010. Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 2): 113–122.
- Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Identification and expression pattern of putative odorant-binding proteins and chemosensory proteins in antennae of the *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Chemical Senses*, 34(6): 504–512.
- Zhou SH, Zhang J, Zhang SG, Zhang L, 2008. Expression of chemosensory proteins in hairs on wings of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *J. Appl. Entomol.*, 132(6): 439–450.