

吡虫啉对意大利蜜蜂乙酰胆碱酯酶的 亚致死效应*

靳三省** 孟丽峰 刁青云***

(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 【目的】确定吡虫啉对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的致死中浓度, 探究吡虫啉对意大利蜜蜂乙酰胆碱酯酶的亚致死效应。【方法】本文采用药膜法、点滴法和饲喂法测定吡虫啉对意大利蜜蜂的毒力曲线, 及蜜蜂接触吡虫啉后头部乙酰胆碱酯酶活性的变化。应用 RT-qPCR 技术研究饲喂 LC_5 浓度吡虫啉后, 蜜蜂乙酰胆碱酯酶基因 *Ace1* 和 *Ace2* 的 mRNA 相对表达量。【结果】饲喂法、点滴法和药膜法 3 种方法测定的吡虫啉对意大利蜜蜂的致死中浓度分别是 7.15 mg/L、0.078 ng/蜂和 51 ng/cm²。3 种作用方式下, 吡虫啉均抑制了乙酰胆碱酯酶活性; 随着浓度增加, AChE 酶活性处于下降状态, 但降低较少。 LC_5 浓度的吡虫啉对蜜蜂 AChE 活性具有明显影响, 24 h 内 AChE 活性呈现增强-抑制-增强的趋势。饲喂蜜蜂 LC_5 亚致死浓度的吡虫啉后, *Ace1* 和 *Ace2* 被诱导表达, 但在 1、2 和 16 h 与对照无明显差异。【结论】亚致死浓度的吡虫啉对蜜蜂乙酰胆碱酯酶活性具有抑制作用, 并且存在明显的剂量效应和时间效应, 对 *Ace1* 和 *Ace2* 具有诱导效应, 酶活性水平和 mRNA 相对表达水平不一致。

关键词 吡虫啉, 蜜蜂, 乙酰胆碱酯酶, 亚致死效应

Effect of sublethal doses of imidacloprid on Acetylcholinesterase activity in *Apis mellifera*

JIN San-Xing** MENG Li-Feng DIAO Qing-Yun***

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

Abstract [Objectives] To determine the median lethal concentration of imidacloprid and explore the sublethal effect of imidacloprid on acetylcholinesterase (AChE) in *Apis mellifera*. [Methods] The toxicity of imidacloprid was determined by feeding trials, topical application and the residual film method. AChE activity and the relative expression of acetylcholinesterase mRNA genes (*Ace1* and *Ace2*) in the head of *A. mellifera* were measured after exposure to different concentrations of imidacloprid after different periods of time. [Results] LC_{50} values determined by the three methods were 7.15 mg/L, 0.078 ng/bee and 51 ng/cm², respectively. Imidacloprid inhibited AChE activity within 24 h. The enzymatic activity of AChE was volatile with increasing pesticide concentration, fluctuating with the dose and period of imidacloprid exposure. mRNA expression of the *Ace1* and *Ace2* genes was induced within 24 h, but not after 1 h, 2 h and 16 h exposure. [Conclusion] The results show that the effect of imidacloprid on AChE depends on both the period of exposure and dosage. The AChE activity in the heads of honeybees may be inhibited by sub lethal doses of imidacloprid, but the induced mRNA expression patterns of *Ace1* and *Ace2* was inconsistent with AChE activity.

Key words imidacloprid, honeybee, acetylcholinesterase, sub lethal effect

* 资助项目 Supported projects: 国家科技支撑项目 (2011BAD33B04); 国家自然科学基金项目 (31101772)

**第一作者 First author, E-mail: ssjinir@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dqyun1@126.com

收稿日期 Received: 2014-09-26, 接受日期 Accepted: 2014-11-14

吡虫啉是烟碱类农药,在生产中常被用来防治刺吸式口器害虫,使用范围广,不仅可以直接喷洒,而且作为拌种剂使用,由于防治效果较好,在全世界范围内得到大规模的推广使用。吡虫啉具有内吸作用,经拌种后,在种子发芽后3周内植物的分泌液中仍可检测到吡虫啉,其含量达49~83.8 $\mu\text{g/kg}$ (Girolami *et al.*, 2009);经拌种的玉米花粉中吡虫啉含量为1~10 $\mu\text{g/kg}$ (Charvet *et al.*, 2004)。随着吡虫啉的大面积和高剂量的使用,其在作物中的残留量也持续加大,对自然界包括蜜蜂在内的非靶标生物产生严重影响,而且危害程度持续加大 (Yang *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010)。

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 是昆虫神经传导中的一个关键酶,通过降解乙酰胆碱,终止递质对突触后膜的刺激,保证神经信号的正常传递 (Soreq and Seidman, 2001),对蜜蜂的学习能力和群居习性都有一定的影响。AChE 可以作为生物标记检测农药残留程度,监控环境污染 (Kim *et al.*, 2007; Badiou *et al.*, 2008)。AChE 在昆虫体内具有重要作用,不仅与抗药性有关,还参与机体的激素合成以及神经系统对生理行为的调控 (Claudianos *et al.*, 2006),因而在蜜蜂正常生命活动中具有重要影响。吡虫啉主要作用于昆虫神经系统的乙酰胆碱受体,与乙酰胆碱竞争受体的结合部位,阻断昆虫的正常神经传递,使昆虫死亡 (Matsuda *et al.*, 2001; Sheets, 2001)。

意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 是一种重要的世界性经济昆虫,不仅为人类提供蜂蜜、蜂花粉、蜂胶和蜂王浆等丰富的蜂产品,而且作为农作物授粉的重要媒介昆虫 (Potts *et al.*, 2010),在农业增产和农民增收、农业生态系统与科学实验研究中具有重要作用 (Free, 1970; Gallai *et al.*, 2009)。由于吡虫啉在农田中的大范围使用,蜜蜂在采集过程中无法识别吡虫啉,一旦接触之后,植物残留的吡虫啉势必对蜜蜂造成影响。科学家已经就吡虫啉对西方蜜蜂的亚致死效应进行了广泛的研究,主要集中于蜜蜂的学习记忆能

力、嗅觉能力、采集行为、回巢能力、运动协调能力等方面。亚致死剂量的吡虫啉对蜜蜂的学习行为 (代平礼等, 2013) 和防御行为 (Tan *et al.*, 2014) 存在明显的影响。研究表明,吡虫啉影响蜜蜂大脑中蘑菇体的分布状态,破坏其结构,损害蜜蜂的记忆系统,损伤中枢神经系统,使蜜蜂的学习记忆和采集归巢能力下降 (Decourtye *et al.*, 2004; Decourtye and Devillers, 2010)。100 ppm 的吡虫啉处理蜜蜂 30~60 min 后可以抑制蜜蜂的采集行为 (Kirchner, 1999; Yang *et al.*, 2008)。

为保护蜜蜂,本实验从酶活性和转录水平两个方面研究吡虫啉对蜜蜂的影响,实验结果可为进一步明确新烟碱类农药对蜜蜂的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

实验所用的意大利蜜蜂取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜂场。挑选将要出房的子脾放在人工气候箱里【温度 (33 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $60\%\pm 10\%$ 】,取1日龄成年工蜂用于实验。

1.2 主要试剂和仪器

吡虫啉,95%的可湿性粉剂,购自美国杜邦公司;曲拉通 (Trito X-100)、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、十二水磷酸氢二钾 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 95%乙醇 (分析纯)、丙酮 (分析纯),购自北京化学试剂公司;碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh)、5-5-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB),购自 Sigma 公司;RNA 提取试剂 Trizol、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 购自 TaKaRa 公司,Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX 荧光定量试剂盒购自 Invitrogen 公司;100 mL 血清瓶,购自国药集团化学试剂北京有限公司;人工气候箱 (RXZ 智能型,宁波江南仪器厂);5417R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司);UV2200 紫外可见分光光度计 (上海天普分析仪器有限公司);ABI 7500

荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)。

1.3 生物学测定

1.3.1 药膜法 用丙酮将吡虫啉配置成 20 000 mg/L 的母液, 使用时用丙酮稀释成不同浓度的药液。从稀释好的药液中吸取 1 mL 加入 100 mL 的血清瓶中, 然后将瓶子放倒, 在水平桌面上来回滚动, 使药液均匀涂在血清瓶内壁上, 等丙酮完全挥发后, 放在阴凉干燥处待用。对照组玻璃瓶用丙酮处理。挑取成虫期 1 日龄的工蜂。每个浓度 3 次重复, 每个重复 10 头。在血清瓶底部放入含有蜂蜜水的棉球, 然后用窗纱封口, 放入人工气候箱【温度 (33±1) °C, 相对湿度 60%±10%, 黑暗】, 记录 24 h 时蜜蜂的死亡率。

1.3.2 饲喂法 选用成虫期 1 日龄的工蜂进行试验。在放有 0.1 g 棉花的 5 mL 小烧杯中加入用蜂蜜水稀释的不同浓度的吡虫啉, 使棉花充分浸泡但不会自然滴下液体, 烧杯倒扣在含有蜜蜂的蜂笼上, 让蜜蜂隔笼取食, 放在人工气候箱中【温度 (33±1) °C, 相对湿度 60%±10%, 黑暗】, 随时添加蜜药混合液, 保证蜜蜂正常取食, 每个浓度 3 次重复, 每个重复 20 头蜜蜂。设蜂蜜水为对照, 记录 24 h 蜜蜂的死亡情况。

1.3.3 点滴法 选用成虫期 1 日龄的工蜂进行试验。轻按蜜蜂两翅, 在蜜蜂胸部背板点滴用丙酮稀释的不同浓度的吡虫啉药液 1.5 μL, 对照组点滴 1.5 μL 丙酮, 点滴后放回蜂笼中, 放在人工气候箱中, 饲喂蜂蜜水, 随时补充蜂蜜水, 条件同饲喂法。每个浓度 3 次重复, 每个重复 20 头蜜蜂, 记录 24 h 时蜜蜂的死亡情况。

1.4 吡虫啉处理蜜蜂

剂量效应: 根据上述生物测定的结果, 分别采用饲喂法、药膜法和点滴法, 选取 LC₁₀、LC₂₀、LC₃₀、LC₄₀、LC₅₀、LC₆₀、LC₇₀、LC₈₀、LC₉₀ 浓度的吡虫啉处理蜜蜂, 24 h 后将蜜蜂直接放在液氮中速冻, 取其头部在 -80°C 冰箱中保存。

时间效应: 根据上述生物测定的结果, 分别采用饲喂法、药膜法和点滴法, 选取 LC₅ 浓度吡虫啉处理蜜蜂, 在 1、2、4、8、10、12、16、20、24 h 将实验活蜜蜂放在液氮中速冻, 取其头

部放在 -80°C 冰箱中保存。

1.5 酶液制备和测定

取蜜蜂头部加入 pH7.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.1% Triton x-100) 1 mL, 冰浴匀浆, 匀浆液在 4°C, 10 800 r/min 离心 10 min, 取上清液过滤, 所得液体用作酶活性测定。

AChE 活性测定参照改进的 Ellmen 方法 (Gorun *et al.*, 1978; 高希武, 1987), 以 10 mmol/L 的碘化硫代乙酰胆碱为底物 100 μL, 加入适量粗酶液, 30°C 下水浴反应 15 min, 加入 3.6 mL DNTB 磷酸乙醇显色剂 (含 12.4 mg DNTB、125 mL 95%乙醇、75 mL 蒸馏水和 50 mL pH7.5 磷酸缓冲液) 终止反应, 在 412 nm 处测定吸光值, 重复测定 3 次。

AChE 活力单位 (mmol/min/mgProtein) = $(\Delta OD_{412} \times V \times T) \times (13.6 \times t \times p \times v)$

注: 公式中 ΔOD_{412} 为吸光值, V 为酶促反应体积, T 为稀释倍数, t 为反应时间, P 为蛋白含量, v 为加入酶液体积。

蛋白测定采用 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 法。

1.6 *Ace1* 和 *Ace2* mRNA 相对表达量测定

1.6.1 RNA 提取和 cDNA 模板的制备 根据 1.4 的处理方法, 取蜜蜂头部在液氮中充分研磨, 研磨过程中必须保证液氮浸过样品, 以防止 RNA 降解, 将研磨液倒入到加有 1 000 μL Trizol 的抽提管中, 充分混合, 具体提取方法参照 TaKaRa Trizol 提取试剂盒说明书。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。用核酸浓度测定仪测定提取 RNA 的纯度及浓度。然后按照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (TaKaRa) 说明书, 以提取的总 RNA 1 μg 为模板, 进行 cDNA 第一条链的合成, -20°C 下保存备用。

1.6.2 乙酰胆碱酯酶基因引物设计和内参基因的选择 根据 GenBank 上登记序列 *Ace1* (GB18414) 和 *Ace2* (GB14873) 利用 Prime Primer 5.0 设计引物, 内参基因 *Act* (actin) 和 *rp49* (ribosomal protein 49) 的引物参照 (Lourenço *et al.*, 2008), 引物序列如表 1。Actin 扩增效率 94%, *Ace1* 和

表 1 用于 RT-qPCR 分析的乙酰胆碱酯酶基因和内参基因引物序列

Table 1 The primer sequences of acetylcholinesterase genes and reference genes used for RT-qPCR assays

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增长度 (bp) Amplicon size (bp)
<i>ACE1</i> (acetylcholinesterase 1)	Forward	92
	CAAGTTCGAGGTGCTGATGG	
	Reverse	
	CGTGATGTCTGCTTCTGTGG	
<i>ACE2</i> (acetylcholinesterase 2)	Forward	235
	CTCGATCTGTTGAGGGAAGC	
	Reverse	
	TGTACACCTCCTCCCAGTCC	
<i>Act</i> (actin)	Forward	150
	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	
	Reverse	
	AGAATTGACCCACCAATCCA	
<i>rp49</i> (ribosomal protein 49)	Forward	154
	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	
	Reverse	
	TTGAGCACGTTCAACAATGG	

Ace2 的扩增效率分别为 91%和 98%,*rp49* 的扩增效率为 102%, 选择 *Actin* 作为内参基因。

1.6.3 基因 *Ace1* 和 *Ace2* mRNA 相对表达 荧光定量 PCR 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行, 参考 Invitrogen Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX 荧光定量试剂盒说明书, 反应体系为 25 μ L, 模板为 1 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min 变性; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 70 $^{\circ}$ C 45 s (40 个循环) 采用 ABI Prism 7500 SDS 1.1 (Sequence detector system, 美国应用生物系统公司) 软件进行数据记录分析, 阈值线由软件自动设定, 每个样本设 2 个技术重复 3 个生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *Ace1* 和 *Ace2* 的相对表达量。

1.7 数据处理

生物学测定数据采用 Polo Plus 2.0 (Leora software Menlo Park, USA) 分析, 计算 LD₅₀。酶活性和基因表达量所得数据采用 SPSS13.0 软

件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 0.01 作为差异显著性标准。

2 结果与分析

2.1 毒力测定

模拟蜜蜂田间接触吡虫啉的 3 种方式, 测定药膜、饲喂、点滴 3 种作用方式下吡虫啉对蜜蜂的急性毒性 (表 2)。药膜法的致死中剂量为 51 ng/cm², 饲喂法的致死中浓度为 7.15 mg/L, 点滴法的致死中剂量为 0.078 ng/蜂。

2.2 吡虫啉对蜜蜂乙酰胆碱酯酶的剂量效应

3 种处理方式的作用下, 用 LC₁₀、LC₂₀、LC₃₀、LC₄₀、LC₅₀、LC₆₀、LC₇₀、LC₈₀、LC₉₀ 浓度的吡虫啉处理, 24 h 后蜜蜂体内 AChE 活性均受到抑制, 与对照存在明显差异。如图 1 所示, 点滴法和药膜法最大抑制作用发生在 LC₇₀, 酶活性分别为对照的 0.58 倍和 0.49 倍。药膜法的最小抑

表 2 吡虫啉对意大利蜜蜂的毒力测定 (24 h)
Table 2 Dose-lethality relation of imidacloprid on *Apis mellifera* (24 h)

处理方法 Method	回归方程 $Y=aX+b$	95%置信限 95% CL	致死中浓度 (mg/L) LC_{50}	自由度 n	卡方值 Chi-square
药膜法 Residual film	$Y=5.525X-5.504$	9.950-12.615	11.175 (51 ng/cm ²)	5	1.495
饲喂法 Feeding	$Y=9.423X-7.975$	6.239-7.939	7.15	5	1.472
点滴法 Topical application	$Y=5.665X+7.108$	0.039-0.074	0.056 (0.078 ng/蜂)	5	1.919

Y =死亡率对数值, X =药剂浓度, a =截距, b =斜率。
 Y = Mortality (Lg), X =Dose, a = Intercept, b = Slope.

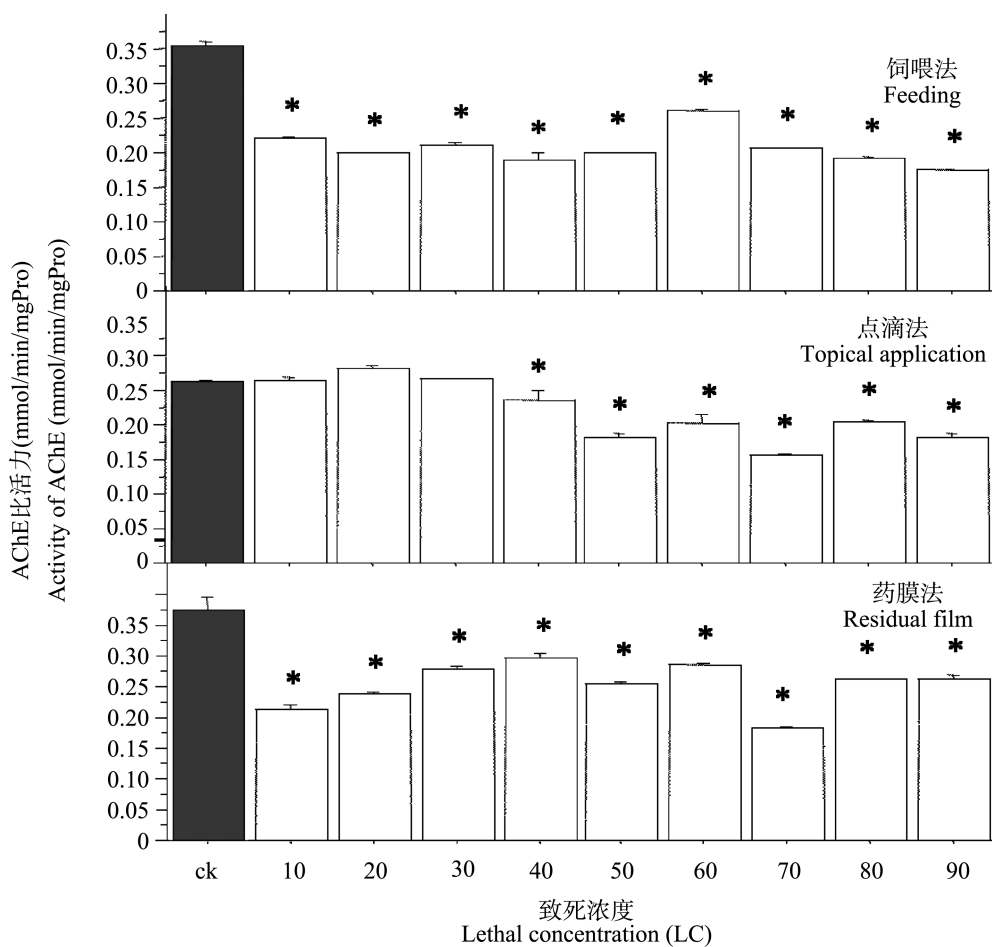


图 1 吡虫啉对意大利蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶的剂量效应
Fig. 1 Dosage effects of imidacloprid on the specific activity of AChE in honeybee head
柱上标有*表示差异显著 ($P<0.05$)。下图同。
Histograms with * indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

制作用发生在 LC_{40} , 此时酶活性最高, 为对照的 0.81 倍。饲喂法在 LC_{10} 的浓度下就开始对酶产生抑制作用, 随着浓度的增加, 抑制作用明显, LC_{90} 时出现最大的抑制作用, 酶活性为对照的

0.48。点滴法不同,在开始时酶活性变化不大,在 LC_{40} 以后开始具有明显的抑制作用。

2.3 LC_5 浓度吡虫啉对蜜蜂乙酰胆碱酯酶活性影响的时间效应

图 2 表明: LC_5 浓度的吡虫啉对 AChE 活性的影响随着时间的不同具有明显的差异,整体呈现升高-降低-升高的趋势,变化关键点在 6、8、

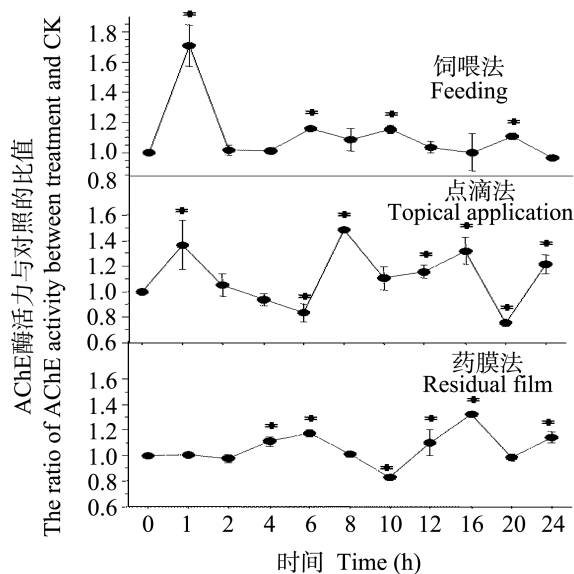
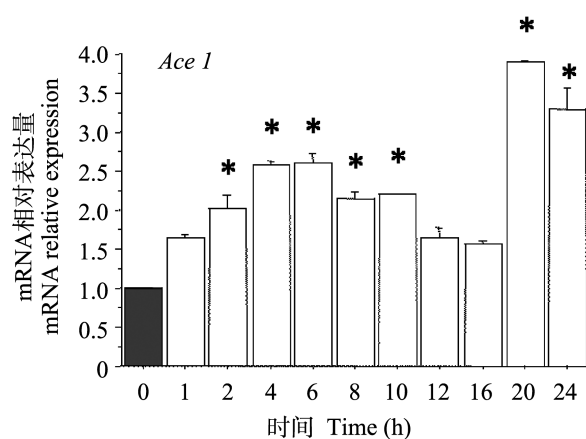


图 2 吡虫啉对蜜蜂头部 AChE 活性的时间效应 (处理与对照的比值)

Fig. 2 Time effects of imidacloprid on the activity of AChE in honeybee head (the ratio between treatment and CK)



10、16、20 h。饲喂 LC_5 浓度的吡虫啉后, AChE 活性首先被激活,接着在 1 h 后急剧下降,然后又逐步升高,在 6 h 后达到最大值,是对照的 1.16 倍。药膜法处理后也是在 6 h 酶活性最高,为对照的 1.18 倍。点滴法处理后,酶活性首先被激活,然后降低,6 h 后达到第一次最低值,接着 8 h 后 AChE 活性达到最大值,是对照的 1.48 倍。处理 10 h 后点滴法和药膜法作用下 AChE 活性都开始升高,在 16 h 时酶活性再次高于对照,均为对照的 1.32 倍,接着酶活性又开始下降。饲喂法的持续时间较长,波动较小,抑制点出现在 24 h。

2.4 饲喂亚致死浓度吡虫啉对乙酰胆碱酯酶两个基因 mRNA 相对表达量的影响

饲喂 LC_5 浓度的吡虫啉,利用 RT-qPCR 技术进行分析乙酰胆碱酯酶基因的 24 h 内不同时间点的表达情况 (图 3),24 h 内两个基因的表达量没有被抑制,呈现出两个峰值。Ace1 处理后没有发生变化,在 2 h 后达到极显著差异,为对照的 2 倍,之后逐步升高,在 6 h 达到第一个高峰值,为对照的 2.6,然后有所降低,20 h 又显著提高,达到最大值为对照的 3.89 倍。Ace2 在开始阶段变化不大,4~12 h 和对照相比显著提高,4 h 时表达量为对照的 2.6 倍,之后有所降低,在 16 h 与对照物无明显差异,但在 24 h 时 Ace2 表达量为对照的 2.42 倍。

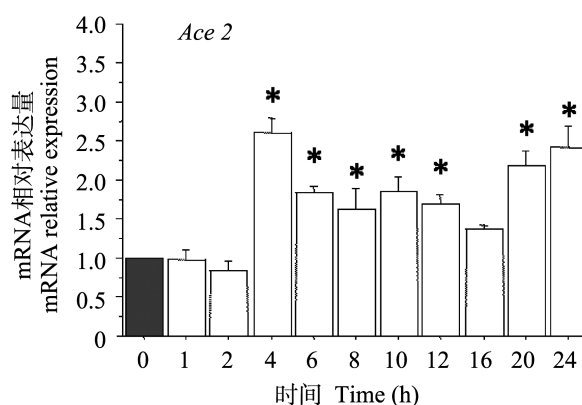


图 3 饲喂 LC_5 浓度的吡虫啉对意大利蜜蜂乙酰胆碱酯酶基因 mRNA 表达量的影响

Fig. 3 The effects of feeding LC_5 imidacloprid on mRNA expression of acetylcholinesterase genes in *Apis mellifera* head

3 讨论

AChE 在蜜蜂体内主要分布在头部, 意大利蜜蜂头部 AChE 活性占总体活性的 51% (刁青云等, 2005), 在体内可以分为两种形态亲水性和膜结合 AChE, 亲水性的 AChE 活性较小, 膜结合的 AChE 活性较大, 占总活性的 94%~97% (Melanson *et al.*, 1985)。也有研究 AChE 在昆虫体内具有两种 AChE1 和 AChE2, AChE1 分布较为均匀, AChE2 主要分布于蜜蜂的中枢神经内, 参与体内神经递质的传递。以硫代乙酰胆碱为底物反应, AChE2 的酶活性是 AChE1 的 2 500 倍, 作用远大于 AChE1 (Meyer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2012)。乙酰胆碱酯酶不同存在形式和形态, 可能是酶活性出现波动性的原因。在不同的时间, 不同形式的酶发挥的作用也不同, 当外源性化合物浓度不一样时, 酶的效应机制可能有区别。酶活性的变化也可能与酶基因的诱导表达量有关。

蜜蜂接触了亚致死剂量的新烟碱类农药后, AChE 可被诱导, 酶活性提高, 并以此作为生物指标鉴定农药残留 (Boily *et al.*, 2013)。但本研究发现, 饲喂 LC₅ 浓度吡虫啉后, AChE 活性立即升高, 然后下降, 24 h 时与对照无差别, 以此为指标会出现假阴性的情况。从剂量效应中可以看出点滴法作用下, 低剂量的吡虫啉对 AChE 活性抑制较为明显; 从时间效应上看, 在 LC₅ 浓度的吡虫啉作用下, 乙酰胆碱酯酶活性呈现上升-下降-微上升趋势, 这主要与 AChE 在虫体内存在的形态和吡虫啉代谢物对靶标酶的诱导作用有关 (Suchail *et al.*, 2001)。实验中酶活性的变化关键点恰好是吡虫啉在蜜蜂体内的半衰期 5 h 相一致, 5 h 后主要代谢物为 5-羟基吡虫啉 (Suchail *et al.*, 2004), 有关 5-羟基吡虫啉对蜜蜂乙酰胆碱酯酶的影响还需要进一步研究。本实验选用 1 日龄工蜂, 实际上, 蜜蜂日龄对其体内酶活性大小和耐药能力有直接关系, 而且 AChE 活性会随着农药作用时间的长短而变化 (Kumar

and Gupta, 2007), 与成虫相比, 幼虫对农药更加敏感, 因此受到吡虫啉的危害会更大。

亚致死剂量的吡虫啉降低蜜蜂的视觉感知能力和嗅觉灵敏性 (Han *et al.*, 2010)。虽然吡虫啉作用于乙酰胆碱受体进而影响其生理行为, 但蜜蜂的许多生命活动与乙酰胆碱酯酶活性相关, 乙酰胆碱酯酶被抑制, 蜜蜂的生理功能也会受到影响。同时蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶基因表达量与行为习惯和学习能力有关 (Shapira *et al.*, 2001)。因此本文从酶活性和酶基因表达两个角度证实了亚致死浓度吡虫啉对蜜蜂的影响, 亚致死浓度吡虫啉处理意大利蜂 24 h 内, 酶活性和酶基因表达量都呈现波动性变化, 有两个高峰值, 酶活性的提高与基因表达量的提高有关, 但诱导倍数差别较大, 且 *Ace1* 表达量高于 *Ace2*。

实验中两个酶基因都呈现被诱导的状态, 而酶活性和酶基因的表达不一致。酶从转录到翻译成蛋白质以及酶活性的表达过程中, 要经过蛋白质翻译, 以及翻译后的磷酸化、乙酰化等修饰作用。实验证明 *Ace* 转录过程中自然存在的反义链可以抑制 AChE 蛋白的表达 (Xi *et al.*, 2014)。为了清楚理解乙酰胆碱酯酶在转录后是如何进行修饰和调控的, 还需要进一步深入研究吡虫啉对乙酰胆碱酯酶的作用机理。

因此, 吡虫啉不仅竞争性结合乙酰胆碱受体, 而且影响蜜蜂乙酰胆碱酯酶活性改变, 同时对头部 *Ace1* 和 *Ace2* 具有诱导效应。我们从生化和分子水平两个方面证实吡虫啉对蜜蜂乙酰胆碱酯酶的亚致死效应, 为进一步深入研究化学农药对蜜蜂的影响奠定基础。

致谢: 感谢中国农业大学昆虫毒理学课题组高希武教授在实验过程中给予的指导和帮助。

参考文献 (References)

- Badiou A, Meled M, Belzunces L, 2008. Honeybee (*Apis mellifera*) acetylcholinesterase—a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(2): 246–253.

- Boily M, Sarrasin B, DeBlois C, Aras P, Chagnon M, 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8): 5603–5614.
- Bradford MM, 1976. a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248–254.
- Charvet R, Katouzian-Safadi M, Colin M, Marchand P, Bonmatin J, 2004. Systemic insecticides: new risk for pollinator insects. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 62(1): 29–35.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson R, Biswas S, Schuler M, Berenbaum M, Feyereisen R, Oakeshott J, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615–636.
- Dai PL, Zhou T, Wang Q, Wu YY, Geng WL and Song HL, 2013. Effects of imidacloprid on learning performance of *Apis mellifera ligustica*. 2013 Academic Conference Proceedings of China Apiculture Association Professional Committee, Urumchi: 1–6. [代平礼, 周婷, 王强, 吴艳艳, 耿文龙, 宋怀磊, 2013. 吡虫啉对意大利蜜蜂学习行为的影响. 2013 中国养蜂学会专业委员会学术会议论文集. 乌鲁木齐. 1–6.]
- Gao XW, 1987. Introduction of Gorun improved Ellman's cholinesterase activity determination method. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 24(4): 245–246. [高希武, 1987. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍. 昆虫知识, 24(4): 245–246.]
- 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*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78(2): 83–92.
- Decourtye A, Devillers J, 2010. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, 383: 85–95.
- Diao QY, Jing QL, Gao XW, 2005. Tissue and subcellular distribution of carboxylesterase and acely in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. The Fifth International Symposium on Biodiversity Conservation and Utilization of High Science and Technology and the International Conference of Insect Protection, Utilization and Industrialization. Beijing. 197–204. [刁青云, 姜秋玲, 高希武, 2005. 东方蜜蜂、西方蜜蜂羧酸酯酶与乙酰胆碱酯酶体躯与亚细胞分布研究. 第五届生物多样性保护与利用高新技术国际研讨会暨昆虫保护, 利用与产业化国际研讨会论文集. 北京. 197–204.]
- Free JB, 1970. Insect Pollination of Crops. London and New York, Academic Press. 544–555.
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3): 810–821.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Bernardo AD, Greatti M, Giorio C, Tapparo A, 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, 102(5): 1808–1815.
- Gorun V, Proinov I, Băltescu V, Balaban G, Bâzu O, 1978. Modified ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Analytical Biochemistry*, 86(1): 324–326.
- Han P, Niu CY, Lei CL, Cui JJ, Desneux N, 2010. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology*, 19(8): 1612–1619.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M, 2010. Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie*, 41(3): 312–331.
- Kim BM, El-Aty AA, Hwang TE, Jin LT, Kim YS, Shim JH, 2007. Development of an acetylcholinesterase-based detection kit for the determination of organophosphorus and carbamate pesticide residues in agricultural samples. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 28(6): 929–935.
- Kim YH, Cha DJ, Jung JW, Kwon HW, Lee SH, 2012. Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(11): e48838.
- Kirchne WHr, 1999. Mad-bee-disease sublethal effects of imidacloprid (Gaucho) on the behaviour of honeybees. *Apidologie*, 30: 422.
- Kumar S, Gupta A, 2007. Age dependent study of the impacts of certain insecticides on Acetyl cholinesterase (AChE) activity in worker bees of Italian honeybee *Apis mellifera* L. under laboratory conditions. *Journal of Entomological Research*, 31(2): 115–119.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino ADS, Simões ZLP, 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3): 372–385.

- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573–580.
- Melanson SW, Chang-hyon Y, Pezzementi ML, Pezzementi L, 1985. Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 81(1): 87–96.
- Meyer W, Schardin J, Schlesinger C, 1998. Distribution of acetylcholinesterase in the central nervous system of harvestmen (Arachnida: Opiliones). *Neuroscience Letters*, 256(2): 97–100.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6): 345–353.
- Shapira M, Thompson CK, Soreq H, Robinson GE, 2001. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Molecular Neuroscience*, 17(1): 1–12.
- Sheets L, 2001. Imidacloprid: A Neonicotinoid Insecticide. *Handbook of Pesticide Toxicology*. New York: Academic Press. 1123–1130.
- Soreq H, Seidman S, 2001. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4): 294–302.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP, 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag. Science*, 60(3): 291–296.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11): 2482–2486.
- Tan K, Chen W, Dong S, Liu X, Wang Y, Nieh YC, 2014. Imidacloprid alters foraging and decreases bee avoidance of predators. *PLoS ONE*, 9(7): e102725.
- Xi Q, Gao N, Zhang X, Zhang B, Ye W, Wu J, Zhang X, 2014. A natural antisense transcript regulates acetylcholinesterase gene expression via epigenetic modification in hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 55: 242–251.
- Yang E, Chuang Y, Chen Y, Chang L, 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(6): 1743–1748.