# 氯化锂对意大利蜜蜂基于伸吻反应行为的影响*

蔚添添** 侯梦赏 张 猛 胡钐钐 李志国*** 苏松坤

（福建农林大学蜂学学院，福州 350002）

**摘 要** **【目的】** 本研究旨在明确 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对蜜蜂蔗糖敏感性、学习和记忆行为的影响，为氯化锂作为杀螨剂应用于蜂业提供参考依据。**【方法】** 利用 50%（w/v）糖水溶液在巢门口引蜂，抓取采集糖水的蜜蜂视为采集蜂，随机分为 6 组对照和处理。鉴于蜜蜂对笼养环境的适应期，室内恒温恒湿箱【(30±1) ℃，相对湿度为 40%±10%，黑暗】中饲喂 30%糖水笼养 24 h（每盒 50 头）后，处理组和对照组分别自由采集含 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂的 30%（w/v）糖水和 30%（w/v）糖水 24 h，6 组中的 3 组用来测试对 6 种不同浓度糖水的敏感性（0.1%、0.3%、1%、3%、10%、30%），余下 3 组蜜蜂用来进行气味联想性学习实验；将收集的采集蜂不进行实验室笼养，随机分为对照和处理（35 头/组），接受气味联想性学习训练，然后对蜜蜂个体饲喂 10 μL 30%（w/v）糖水和含 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂的 30%（w/v）糖水，2 h 后测试蜜蜂记忆。**【结果】** 对照组和处理组在氯化锂处理 24 h 内死亡率无显著差异（$P > 0.05$）；糖水敏感性测试实验中，处理组对低浓度糖水（0.1%-3%）的喙伸反应率高于对照组（0.3%：$P < 0.05$；1%：$P < 0.01$；3%：$P < 0.001$），处理组的蔗糖响应分数（SRS）极显著高于对照组（$P < 0.01$）；气味联想性学习实验中，两组的喙伸反应率随训练次数的增加而呈上升趋势，虽然在第二次学习中，对照组的喙伸反应率显著性高于处理组（$P < 0.05$），但两组的学习能力随训练次数增加差异减小，最终趋于一致；2 h 记忆行为实验中，处理组的喙伸反应率显著高于对照组($P < 0.05$)。**【结论】** 结果表明，25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对蜜蜂无急性致死作用；蜜蜂接触此剂量氯化锂 24 h 后，蜜蜂对低浓度糖水的敏感性增强，蜜蜂最终学习行为不受影响，但蜜蜂的 2 h 短期记忆受到积极影响，进而可能利于提高蜜蜂采集行为。

**关键词** 意大利蜜蜂；氯化锂；蔗糖响应分数；学习行为；记忆行为；伸吻反应

# Effects of lithium chloride on *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) based on proboscis extension response behavior

YU Tian-Tian** HOU Meng-Shang ZHANG Meng HU Shan-Shan LI Zhi-Guo*** SU Song-Kun

(College of Bee Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** **[Objectives]** Ziegelmann *et al*. found that 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride had an effective mite removal rate as high as 96% and suggested that lithium chloride was a highly efficient substance for mite removal. This study aims to investigate the effects of 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride on the sucrose sensitivity, learning and memory of honeybees, and provide a reference for the application of lithium chloride as an acaricide for honeybees. **[Methods]** We used 50%(w/v) sugar water to draw honeybees to the hive entrance . Honeybees foraging for sugar water were caught and considered to be foragers. We randomly divided these honeybees into five treatment groups and one control. In view of the acclimation period of honeybees to a cage environment, control and treatment groups were both fed 30% (w/v) sugar water *ad libitum* in an incubator at constant temperature and humidity [(30±1)℃, relative humidity 40%±10%, dark] for 24 h (50 bees per box), then fed 30% (w/v) sugar water *ad* libitum and 30% (w/v) sugar water containing 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride *ad libitum* for 24 h, respectively. Three of the six groups were used to test sensitivity to six different sugar water concentrations (0.1%, 0.3%, 1%, 3%, 10% and 30%), the remaining three groups were used for olfactory-associative learning experiments. Captured foragers

*资助项目 Supported projects：国家现代农业产业技术体系（蜜蜂）项目（CARS-44-KXJ4）；国家自然科学基金青年项目（31702192）

**第一作者 First author，E-mail：1529459536@qq.com

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

收稿日期 Received：2019-02-26；接受日期 Accepted：2019-04-13

were not kept in cages in the laboratory. We randomly divided these bees into control and treatment groups (35 bees per group), both of which received odor-associative learning training. After this bees in both groups were fed 10 μL 30% (w/v) sugar water and 10 μL 30% (w/v) sugar water containing 25 mM lithium chloride. We tested bees' memory after 2 h, with three replicates. **[Results]** There was no significant difference in mortality between control and treatment groups within 24 h of lithium chloride treatment ($P > 0.05$). In the sugar water sensitivity test, the proboscis extension response rate for low concentration sugar water (0.1%-3%) was higher in the treatment group than in the control group (0.3%: $P < 0.05$; 1%: $P < 0.01$; 3%: $P < 0.001$). The sucrose response scores (SRS) of the treatment group were also significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$). In the olfactory associative learning experiment, the proboscis extension response rate of the two groups increased with training time. The proboscis extension response rate of the control group was significantly higher than that of treatment group ($P < 0.05$) in the second learning test, but the difference in learning ability between the two groups decreased with training frequency, eventually becoming similar. In the 2 h memory experiment, the proboscis extension response rate of the treatment group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). [**Conclusion**] 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride has no acute lethal effect on honeybees. Exposing honeybees to this concentration of lithium chloride for 24 h enhanced their sensitivity to low concentrations of sugar water. Exposure to 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride did not affect the learning behavior of honeybees, but did affect their 2 h short-term memory, which may improve their foraging behavior.

**Key words** *Apis mellifera ligustica*; lithium chloride; sucrose response scores; learning behavior; memory behavior; proboscis extension response

蜜蜂是果树和作物传粉者中的主力军，世界上约三分之一的粮食作物和野生植物依赖蜜蜂授粉，提高了果树和农作物品质与产量，为人类社会营造巨大经济效益（Gallai *et al.*，2009）。然而，近十几年来，就蜜蜂在全球范围内大量减少的报道层出不穷（Neumann and Carreck，2010；Requier *et al.*，2018），蜂螨（*Varroa destructor*）、病毒、真菌病、细菌病和农药等其他外源性物质被认为是削弱蜂群的重要原因（Genersch，2010）。*V. destructor* 最初仅在东方蜜蜂 *Apis cerana cerana* 中发现，随着蜜蜂杂交，引种传播至欧洲及美国等地后，*V. destructor* 寄生范围加以拓展，严重威胁世界养蜂业发展（Rosenkranz *et al.*，2010）。*V. destructor* 不仅以发育中蜜蜂的血淋巴为食，还是众多蜜蜂病毒的传播载体（Boecking and Genersch，2008；Rosenkranz *et al.*，2010），*V. destructor* 与病毒的交叉感染比任何一种单一病毒感染更具危害性。目前已证实残翅病毒（Deformed wing virus, DWV）的感染水平与瓦螨 *Varroa destructor* 的侵染水平密切相关（Mordecai *et al.*，2016）。*V. destructor* 对蜂群健康的危害引起全球广泛关注。

传统的除螨方法多以化学防治为主，然而，氟胺氰菊酯、蝇毒磷、双甲脒、唑螨酯、草酸和百里酚等杀螨剂的重复使用增强蜂螨耐药性（Maggi *et al.*，2010），研发新型除螨方法迫在眉睫。随着分子技术的快速发展，特异性引发基因沉默的 RNA 干扰技术在果蝇、蜜蜂等模式生物上成功应用，为蜂螨防治打开科学大门。Garbian 等（2012）利用 RNAi 技术将 *Varroa* 基因沉默，蜂螨数量在两个月的时间内减少了 60% 以上。随后，Ziegelmann 等（2018）选择新的 *Varroa destructor* 基因进行 RNAi 发现饲喂沉默 *Varroa destructor* 基因的 dsRNA 实验组与 dsGFP 对照组达到相同的除螨效果，在 dsRNA 合成过程中作为 RNA 沉淀剂的氯化锂随 dsRNA 一起被蜜蜂自由取食，由此提出氯化锂具有杀螨活性的假设并研究证明蜜蜂持续 24 h 取食 10 mmol·L$^{-1}$ 和 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂糖水溶液的有效除螨率高达 96%，而对蜜蜂死亡率无影响。将氯化锂从 dsGFP 中通过清洗方式移除后饲喂蜜蜂，杀螨活性显著降低。作者得出假设，氯化锂在快速、高效除螨方面存有潜在价值，有望成为新型除螨剂。然而，氯化锂是引发脊椎动物不适的典型毒素。目前，颇多研究表明氯化锂的生物危害作用，氯化锂使啮齿类动物表现不适或恶心等症状（Bernstein *et al.*，1992），淡水鳌虾出现四肢颤抖，运动失控，最后静止（Arzuffi *et al.*，2000）。

当雌性仓鼠阴道分泌物的气味与氯化锂中毒诱发雄性发生胃肠道疾病气味相似时，雄性仓鼠会对雌性仓鼠分泌物产生厌恶感（Zahorik and Johnston，1976；Johnston *et al.*，1978）。而蜜蜂体内有限的味觉受体基因降低蜜蜂对含有毒素的花粉、花蜜和蔗糖溶液的警觉性（Robertson and Wanner，2006；Wright *et al.*，2010）。蜜蜂作为世界上的主要授粉昆虫，良好的采集行为促进其为农业和社会经济发展及生态系统稳定性作出重要贡献。蜜蜂采集能力下降与蜂群健康受损都会影响蜜蜂提供的授粉服务。基于 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂不影响蜜蜂死亡率基础上，我们就氯化锂对蜜蜂的糖水反应、学习行为和记忆行为影响展开研究。

伸吻反应（Probosics extension response，PER）是一种广泛应用于蜜蜂中的经典条件反射（Bitterman *et al.*，1983），基于 PER 反应，利用糖水奖励与气味联想训练是测试固定蜜蜂糖水反应、学习行为与记忆行为的典型方法（Bitterman *et al.*，1983；Menzel and Giurfa, 2006）。在本研究中，作者开展了慢性氯化锂处理对蜜蜂蔗糖反应性、联想学习和联想记忆影响的实验。在实验室笼养蜜蜂期间，蜜蜂自由采集 30%（w/v）糖水 24 h 以适应笼养环境，随后 24 h 对蜜蜂进行给药饲喂。通过对蜜蜂糖水反应、联想学习和联想记忆的测定，以求探明氯化锂对蜜蜂健康的影响，为氯化锂是否能作为新型杀螨剂提供参考。

# 1　材料与方法

## 1.1　实验蜜蜂

供试蜜蜂取自福建农林大学蜂学学院实验蜂场的 3 群意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*，实验全程在福建农林大学校园内完成。在巢门口利用 50%（w/v）糖水引蜂，将采集糖水的蜜蜂视为采集蜂，用软镊子抓取蜜蜂并将其放入塑料饲养盒中。饲养盒（9 cm×7 cm×10.2 cm）四周有若干直径为 3 mm 的透气洞，内壁有磨砂，盒顶有两个直径为 1.7 cm，用于插入 10 mL 注射器（饲喂器）的圆口。

## 1.2　化学药品

Ziegelmann 等（2018）报道合成的 dsRNA 溶液中约含 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂，实验证明 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂的除螨效果极佳。故本实验蜜蜂取食氯化锂的浓度为 25 mmol·L$^{-1}$（购自上海生工）。氯化锂极易溶于水，利用 30%（w/v）糖水配制 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂溶液，并倒入棕色瓶中置于 4 ℃冰箱中保存，作为处理组溶液。将 30%（w/v）糖水溶液作为对照组溶液。

## 1.3　蜜蜂饲养

将收集的采集蜂放入饲养盒中，每盒 50 头。每天在恒温恒湿培养箱中【(30±1) ℃，相对湿度为 40%±10%，黑暗】饲养 4 盒，对照、处理各两盒，连续重复 3 d，即对照、处理各收集 6 盒。对照组和处理组在笼养第一天均仅饲喂 30%（w/v）糖水溶液，以使蜜蜂适应实验室笼养环境。笼养第 2 天开始进行给药饲养，饲喂器中分别抽入配制好的含 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂的糖水溶液（处理组）和糖水溶液（对照组），每盒蜜蜂均自由采集糖水。此外，每天记录对照组与处理组死蜂数量，并用镊子挑出死蜂。氯化锂处理 24 h 后对蜜蜂进行梯度浓度糖水敏感性测试实验和联想性气味学习实验，每项实验各重复 3 次。

## 1.4　糖水敏感性测试

**1.4.1**　固定蜜蜂　从饲养盒中收集蜜蜂，转移至小玻璃瓶中于冰上冷冻麻醉蜜蜂，然后将其放进直径为 5 mm 的铜管中，用布基胶带固定蜜蜂头部，并保证蜜蜂触角和吻部可以自由活动。为减少冷冻麻醉处理对蜜蜂行为反应可能的影响，固定好的蜜蜂放入恒温恒湿培养箱【(30±1) ℃，相对湿度为 40%±10%，黑暗】中恢复 2 h。

**1.4.2**　糖水敏感性测试　利用梯度浓度增加的糖水触发 PER 反应检测实验蜜蜂的糖水反应(Page *et al.*，1998)。称取不同质量的分析级蔗糖（购自上海生工）溶于蒸馏水中制备梯度浓度为 0.1%、0.3%、1%、3%、10%和 30%（w/v）的

蔗糖溶液。在进行实验之前，用牙签蘸取蒸馏水触碰蜜蜂触角，对表现伸吻反应的蜜蜂进行多次水饲喂至蜜蜂不再伸吻。之后用牙签蘸取糖水（浓度由低到高）触碰蜜蜂触角，记录蜜蜂对糖水的反应，对糖水表现出伸吻反应的即为积极反应，记为“ + ”，反之为消极反应，记为“ － ”。为了消除糖水对蜜蜂伸吻的致敏性影响，在连续糖水刺激之间间隔蒸馏水刺激，刺激间隔时间为 2 min。最后，用 50%（w/v）糖水刺激对 6 种糖水均无伸吻反应的蜜蜂个体，若仍无伸吻反应，将此蜜蜂个体不计入后续统计分析（对照组：0.93%，处理组：0）（Scheiner *et al.*，1999；Goode *et al.*，2006；Baracchi *et al.*，2017），对剩下的蜜蜂个体，通过每头蜜蜂对 6 种蔗糖浓度呈现的伸吻反应次数总和计算其糖水响应分数（Sucrose response score，SRS），视为个体对蔗糖反应的可靠指标（Baracchi *et al.*，2017）。SRS 介于 0-6，SRS=0 代表蜜蜂对除 50%（w/v）糖水外的所有实验蔗糖浓度均无伸吻反应，SRS=6 代表蜜蜂对 6 种蔗糖浓度均呈现伸吻反应。

### 1.5 联想性学习和记忆行为实验

**1.5.1** 固定蜜蜂 方法同 1.4.1。

**1.5.2** 气味联想性学习 参考 Bitterman 等（1983）和 Sandoz 等（1995）描述的方法对蜜蜂进行气味联想性学习实验。选择对 50%（w/v）蔗糖溶液有伸吻反应的蜜蜂作为实验对象。实验过程中呈现 A（1-壬醇）和 B（己醇）两种不同的气味，A 气味（条件刺激，CS）与糖水奖励（非条件刺激，US）配对训练（CS+），B 气味作为对照气味，不与糖水奖励相配对（CS-），按照 ABABBABAAB 顺序对每头蜜蜂分别进行 5 次联想性学习和非联想性学习。首先，将蜜蜂置于空气流中适应 15 s，单独通入 A 气味 3 s，用 50%（w/v）糖水触碰蜜蜂触角引发 PER 行为与 A 气味联想训练 1 s 后，撤掉 A 气味，奖励蜜蜂 50%（w/v）糖水 2 s，最后蜜蜂处于空气流中 20 s，视为一次气味联想性学习。而非联想性学习则只提供 B 气味，蜜蜂不进行气味与糖水奖励配对训练。每头蜜蜂进行两种学习试验间隔为 10 min。在单独通入 A 气味或 B 气味的 2 s 时间内观察蜜蜂是否有伸吻反应，有 PER 行为的记为“ + ”，无 PER 行为的记为“ － ”。

**1.5.3** 记忆测定 将直接收回的采集蜂随机分为对照和处理（35 头/组），如上所述进行 5 次气味与糖水奖励配对与非奖励配对交叉训练后，对照组和处理组蜜蜂个体分别饲喂 50%（w/w）糖水溶液和含 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂糖水溶液各 10 μL，待 2 h 后测定蜜蜂记忆，即单独用 A、B 气味刺激每头蜜蜂，记录蜜蜂的伸吻反应，有 PER 行为的记为“ + ”，表明蜜蜂对此气味表现出记忆行为，无 PER 反应的记为“ － ”，表明蜜蜂对此气味未表现出记忆行为，对照、处理各重复 3 次。

### 1.6 统计分析

室内笼养期间，对照组与处理组之间死蜂数差异利用生存函数 Kaplan-Meier（SPSS 19.0）中对数秩进行统计分析。记录对照组和处理组蜜蜂对系列浓度糖水呈现 PER 反应蜜蜂数，及两组蜜蜂在配对训练（CS+）与非配对训练（CS-）中伸吻蜜蜂数，两组蜜蜂在 2 h 记忆实验中伸吻蜜蜂数，用卡方检验（SPSS 19.0）分析氯化锂处理组与对照组对糖水反应差异和联想性学习行为、记忆行为差异。为进一步分析两组蜜蜂对糖水反应的差异，计算每组的蔗糖响应分数（SRS），SRS=0-6，用双尾 Kruskal-Walls 检验分析对照组与处理组 SRS 的整体波动。

## 2 结果与分析

### 2.1 氯化锂对蜜蜂的毒性

室内笼养期间，对照组与处理组蜜蜂在自由取食 30%（w/v）糖水和 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂糖水溶液期间均出现蜜蜂个体死亡现象，记录每天死蜂数，利用生存函数 Kaplan-Meier 对处理组与对照组蜜蜂累积生存率进行统计分析发现，24 h 氯化锂处理过程中两组蜜蜂生存率无显著差异（$\chi^2$=2.481，$P$=0.115>0.05），结果如图 1 所示。即蜜蜂自由采集 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂 24 h 未引发蜜蜂致死毒性，不影响蜜蜂死亡率。

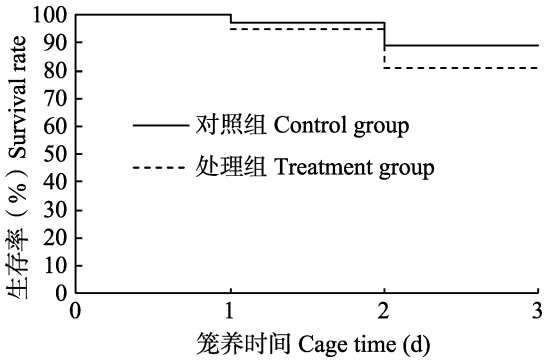


图 1　饲喂含 **25 mmol·L$^{-1}$** 氯化锂的 **30%**糖水后意大利蜜蜂采集蜂生存曲线

**Fig. 1　Survival curves of *Apis mellifera ligustica* forager fed 30% (w/v) syrup containing 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride (LiCl)**

## 2.2　氯化锂影响蜜蜂的糖水反应

用 6 种不同浓度糖水触碰蜜蜂触角，记录蜜蜂 PER 反应，结果如图 2 所示。对照组与处理组蜜蜂的喙伸反应率随糖水浓度的递增呈上升趋势，当用 0.1%-3%糖水溶液刺激蜜蜂时，氯化锂处理组蜜蜂的喙伸反应率高于对照组蜜蜂；当糖水浓度增加为 10%和 30%时，两组蜜蜂的喙伸反应率趋于一致，说明蜜蜂自由采集 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂 24 h 后，对低浓度糖水的反应性增强。统计分析结果表明，处理组蜜蜂对 0.3%糖水的反应显著性高于对照组蜜蜂（$\chi^2$=4.33，$P$=0.037< 0.05），对 1%和 3%糖水的反应极显著性高于对照组蜜蜂（1%：$\chi^2$=6.979，$P$=0.008<0.01；3%：$\chi^2$=24.504，$P$<0.001）。为进一步研究蜜蜂自由采集 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂 24 h 后对糖水敏感性的影响，在用 0.1%-30%糖水刺激蜜蜂触角后，用 50%糖水刺激对 6 种糖水浓度无伸吻反应的蜜蜂个体，建立蜜蜂个体的蔗糖响应分数（SRS），更利于评估蜜蜂个体对糖水的反应。结果如图 3 所示，对照组与处理组蜜蜂蔗糖响应分数均值为 3，处理组蜜蜂的 SRS 极显著高于对照组蜜蜂（双尾 Kruskal-Walls 检验，$M$=8.132，$P$=0.004<0.01）。

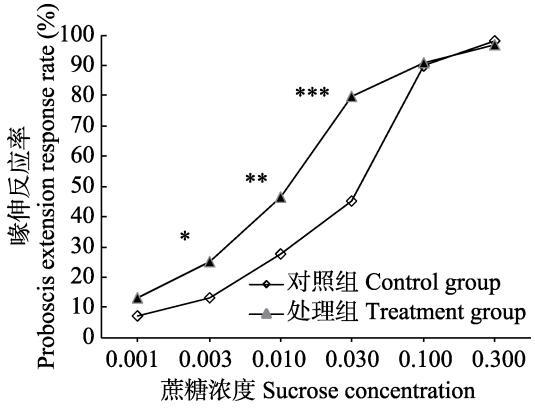


图 2　**25 mmol·L$^{-1}$** 氯化锂对意大利蜜蜂采集蜂蔗糖浓度反应的影响

**Fig. 2　Effects of 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride (LiCl) on the sucrose-concentration response of *Apis mellifera ligustica* forager**

*$P$ < 0.05 表示处理组与对照组蜜蜂喙伸反应率经 $\chi^2$ 检验差异显著，**$P$ < 0.01，***$P$ < 0.001 表示处理组与对照组蜜蜂喙伸反应率经 $\chi^2$ 检验差异极显著。图 4 同。

*$P$ < 0.05 indicates that there is significantly different in proportion of bees showing PER in sucrose concentrations by $\chi^2$ test between the treatment and control groups, **$P$ < 0.01, ***$P$ < 0.001 indicate that there are extremely significantly different in proportion of bees showing PER in sucrose concentrations by $\chi^2$ test between the treatment and control groups. The same as Fig. 4.

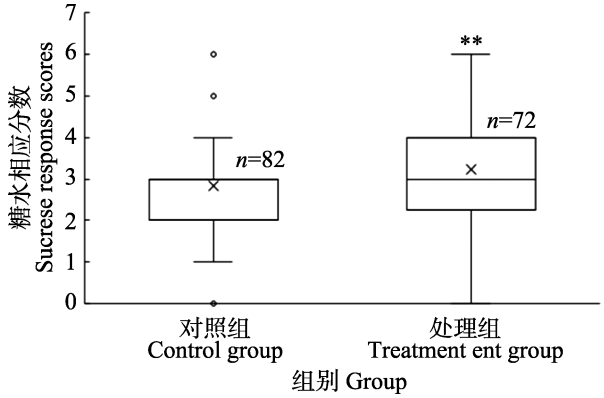


图 3　**25 mmol·L$^{-1}$** 氯化锂对意大利蜜蜂采集蜂蔗糖响应分数的影响

**Fig. 3　Effects of 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride (LiCl) on the sucrose response scores (SRS) of *Apis mellifera ligustica* forager**

**$P$ < 0.01 表示处理组与对照组蔗糖响应分数经双尾 Kruskal-Walls 检验差异极显著，误差线为平均值±标准误。

**$P$ < 0.01 indicates that there is extremely significantly different in sucrose response scores (SRS) by Two-tailed Kruskal-Walls test between the treatment and control groups, the error line is mean±SE.

## 2.3　氯化锂影响蜜蜂的学习行为

在 5 次联想性学习与非联想性学习交叉呈现后，结果如图 4 所示，A 气味与糖水奖励配对训练后，两组蜜蜂的喙伸反应率呈上升趋势。对

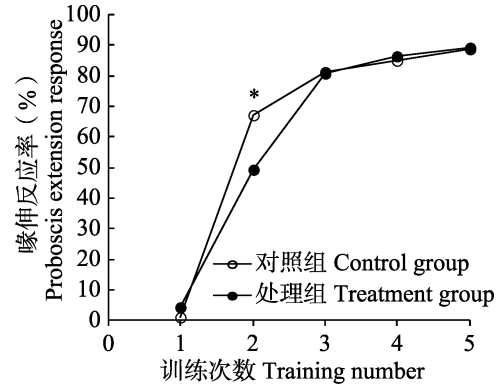


图 4 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对意大利蜜蜂采集蜂学习行为的影响

**Fig. 4 Effects of 25 mmol·L$^{-1}$ lithium chloride (LiCl) on the learning behavior of *Apis mellifera ligustica* forager**

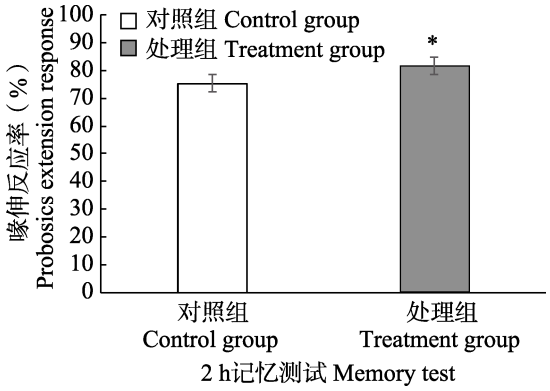


图 5 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对意大利蜜蜂采集蜂记忆行为的影响

**Fig. 5 Effects of 25 mmol·L$^{-1}$lithium chloride (LiCl) on the memorybehavior of *Apis mellifera ligustica* forager**

*$P$ < 0.05 表示处理组与对照组在 2 h 记忆实验中喙伸反应率经 $\chi^2$ 检验差异显著，误差线为平均值±标准误。

*$P$ < 0.05 indicates that there is significantly different in proboscis extension response rates by $\chi^2$ test between the treatment and control groups in the 2 h memory test, the error line is mean±SE.

照组与氯化锂处理组蜜蜂在 5 次配对训练（CS+）后，在第 2 次训练时，对照组蜜蜂的喙伸反应率显著性高于处理组蜜蜂（$\chi^2$=5.72，$P$=0.017< 0.05），随配对训练次数增加，两组蜜蜂之间的学习能力差异减小，在训练结束后，处理组蜜蜂喙伸反应率高于对照组蜜蜂，经统计分析两者无差异（$\chi^2$=2.573，$P$=0.109>0.05）。

### 2.4 氯化锂影响蜜蜂的记忆行为

25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对蜜蜂的 2 h 记忆结果如图 5 所示，处理组蜜蜂喙伸反应率在喂药 2 h 后高于对照组，经统计分析表明，25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对蜜蜂 2 h 记忆有显著影响（$\chi^2$=3.881，$P$=0.049<0.05）。

## 3 讨论

鉴于 Ziegelmann（2018）等提出氯化锂有望成为蜂群的新型除螨剂基础上，本研究主要探讨了氯化锂对蜜蜂蔗糖响应、学习和记忆行为的影响。蔗糖响应、学习和记忆行为与外出采集对蜜粉源的定位和归巢能力密切相关，直接影响采集效率，蜂粮储备和蜂群生活。锂是存在于自然界中的微量元素，研究表明锂离子在生物界中具多重作用。锂剂有效治疗双相障碍情感患者（Woodgett，2013），影响网炳菌属、斑马鱼、非洲爪蟾等多种生物的生长发育（Kao and Elinson，1988；Van Lookeren Campagne *et al.*，1988；Stachel，1993），延长秀丽线虫寿命（Mccoll *et al.*，2008）。此外，锂离子对神经保护作用同样不容忽视，大鼠长期接触氯化锂使促进凋亡的 p53 和 Bax 的表达下降，而细胞保护型 bcl-2 的表达则显著升高（Chen and Chuang，1999），有效预防凋亡依赖性神经元细胞死亡（Chuang，2004）。目前，锂剂治疗的分子机制研究尚不完善，常见的锂离子作用通路为肌醇单磷酸酶，G 蛋白信号通路和糖原合成激酶 3β 等（Woodgett，2013）。与 G 蛋白偶联的腺苷环化酶（Caryclic adenosine monphosphate，cAMP）依赖的信号转导与蜜蜂学习、记忆等行为密切相关（Wachten *et al.*，2006）。锂可以调节环腺苷酸（Adenyl cyclase，AC）和 cAMP 的第二信使通路信号，增强 AC/cAMP 通路基础水平（Quiroz *et al.*，2010），对蜜蜂学习和记忆行为产生影响。

考虑到实际养蜂过程中更偏好于对蜂群进行短时间药物处理，故本实验中蜜蜂自由取食 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂糖水溶液 24 h，经统计分析其死亡率无显著影响，表明 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对蜜蜂无致死毒性。25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂影响蜜蜂的糖水敏感性和 SRS，提高蜜蜂对 0.1%，

0.3%，1%和 3%糖水的 PER 反应，即提高蜜蜂对低浓度糖水的反应能力，处理组蜜蜂 SRS 极显著高于对照组蜜蜂。氯化锂糖水溶液被蜜蜂自由取食进入血淋巴后发生稀释作用，降低药物吸收浓度。研究表明，蜜蜂个体摄入毒素物质后，由于肠道吸收的严格调节作用，最终溶于血淋巴中的毒素浓度为最初吸收浓度的 1/10（Hurst *et al.*，2014）。蜜蜂单独摄取 140 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂出现较高死亡率，将其与糖水混合将会降低毒性影响（Ayestaran *et al.*，2010）。因此，蜜蜂最终吸收的氯化锂浓度远低于 25 mmol·L$^{-1}$，且低浓度的氯化锂增强蜜蜂糖水敏感性。将氯化锂应用于大鼠中的研究结果同样也表明，0.15-0.2 mmol/kg 氯化锂增加大鼠在新环境下的勘察探索活动，1.5 mmol/kg 以上氯化锂降低大鼠一般活动性（Cappeliez and White，1981）。可见锂对生物个体的治疗域和中毒域相差不大，25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂可能处于锂对蜜蜂的治疗域范畴。

氯化锂处理组蜜蜂在第二次学习中的喙伸反应率明显低于对照组蜜蜂，可能是由学习次数太少引起蜜蜂学习能力不稳定，随学习次数的增加，对照组蜜蜂与处理组蜜蜂的喙伸反应率相近，故 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂不影响蜜蜂学习行为。将正常采集蜂进行 5 次学习训练后进行给药处理，25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂增强蜜蜂 2 h 记忆。与在大鼠中的研究结果一致，慢性锂给药改善基因敲除鼠高活动性（Liu *et al.*，2011）和高架十字迷宫表型（陈盛强等，2012）。杨芳等（2005）研究也表明低浓度氯化锂组大鼠相较于对照组大鼠，海马一氧化氮合酶（NOS）阳性细胞数明显增多，而高浓度氯化锂组大鼠的 NOS 阳性细胞数明显减少。NO 作为中枢神经系统第一信使，NOS 是 NO 唯一酶类，两者都能促进 Ach、DA、GABA、5-HT 等神经递质的释放，参与学习记忆行为（Holscher，1997；Yamada *et al.*，2012）。25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂可能促进蜜蜂的 NOS 酶活性，增加 NO 合成，促进 DA、5-HT 等神经递质的释放，从而影响蜜蜂的学习记忆能力。

本实验仅从蔗糖敏感性、学习和记忆行为方面探讨了 25 mmol·L$^{-1}$ 氯化锂对采集工蜂的影响，为氯化锂作为杀螨剂应用于蜂业提供参考依据。然而，蜂群组成复杂，正常蜂群包括蜂王、幼虫、蛹、哺育蜂、守卫蜂、采集蜂等多个组成成员，进一步从蜂群水平和个体水平研究氯化锂对不同级型、不同发育状态蜜蜂健康的影响显得尤为重要。除此之外，蜜蜂不仅是重要的授粉昆虫，还为人类提供蜂王浆、蜂胶、蜂花粉、蜂蜜等多种蜂产品，与人类健康息息相关。所以，氯化锂是否可以作为潜在的杀螨剂以应用于蜂业生产中仍需谨慎考虑，后续应尽可能多地从不同方面进一步研究低浓度氯化锂对蜜蜂及蜂产品的潜在影响。

## 参考文献 (References)


Arzuffi R, Salinas-loera C, Racotta IS, 2000. Food aversion learning induced by lithium chloride in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiology & Behavior*, 68(5): 651–654.

Ayestaran A, Giurfa M, De MBS, 2010. Toxic but drank: Gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed Honeybees. *PLoS ONE*, 5(10): e15000.

Baracchi D, Devaud JM, Ettorre PD, Giurfa M, 2017. Pheromones modulate reward responsiveness and non-associative learning in honey bees. *Scientific Reports*, 7(1): 9875.

Bernstein IL, Chavez M, Allen D, Taylor EM, 1992. Area postrema mediation of physiological and behavioral effects of lithium chloride in the rat. *Brain Research*, 575(1): 132–137.

Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schafer S, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2): 107–119.

Boecking O, Genersch E, 2008. Varroosis-the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 3(2): 221– 228.

Cappeliez P, White N, 1981. Lithium increases selective attention in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 15(1): 81–88.

Chen RW, Chuang DM, 1999. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10): 6039–6042.

Chen SQ, Luo XG, Yang Q, Cao KY, Sun WW, Huang YL, Shen YS, Dai LJ, 2012. Intervention of lithium chloride on elevated cross maze behavior in FMR1 knockout mice. *Acat Anatomica Sinica*, 43(3): 328−334. [陈盛强, 罗学港, 杨泉, 曹开谊, 孙卫文, 黄越玲, 沈岩松, 戴丽军, 2012. 氯化锂对 FMR1 基因敲除小鼠的高架十字迷宫行为的干预作用. 解剖学报, 43(3): 328−334.]

Chuang DM, 2004. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: Can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev. Neurobiol.*, 16(1/2): 83−90.

Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissiere BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3): 810−821.

Garbian Y, Maori E, Kalev H, Shafir S, Sela I, 2012. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: Varroa gene silencing reduces *Varroa* population. *PLoS Pathogens*, 8(12): e1003035.

Genersch E, 2010. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 87(1): 87−97.

Goode K, Huber Z, Mesce KA, Spivak M, 2006. Hygienic behavior of the honey bee (*Apis mellifera*) is independent of sucrose responsiveness and foraging ontogeny. *Hormones and Behavior*, 49(3): 391−397.

Holscher C, 1997. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 20(7): 298−303.

Hurst V, Stevenson PC, Wright GA, 2014. Toxins induce 'malaise' behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology a Neuroethology Sensory Neural & Behavioral Physiology*, 200(10): 881−890.

Johnston RE, Zahorik DM, Immler K, Zakon H, 1978. Alterations of male sexual behavior by learned aversions to hamster vaginal secretion. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(1): 85−93.

Page Jr RE, Erber J, Fondrk MK, 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 182(4): 489−500.

Kao KR, Elinson RP, 1988. The entire mesodermal mantle behaves as spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus* laevis embryos. *Developmental Biology*, 127(1): 64−77.

Liu ZH, Chuang DM, Smith CB, 2011. Lithium ameliorates phenotypie deficits in a mouoe model of fragile x syndrome *The International Journal of Neuropsyehopharmaco*, 14(5): 618−630.

Maggi MD, Ruffinengo SR, Negri P, Eguaras MJ, 2010. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research*, 107(5): 1189−1192.

Mccoll G, Killilea DW, Hubbard AE, Vantipalli MC, Melov S, Lithgow GJ, 2008. Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis* elegans. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1): 350−357.

Menzel R, Giurfa M, 2006. Dimensions of cognition in an insect, the honeybee. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 5(1): 24−40.

Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, Jones IM, Schroeder DC, 2016. Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies. *Isme Journal*, 10(5): 1264−1273.

Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 1−6.

Quiroz JA, Machadovieira R, Jr ZC, Manji HK, 2010. Novel insights into lithium's mechanism of action: Neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology*, 62(1): 50−60.

Requier F, Andersson GKS, Oddi FJ, Garcia N, Garibaldi LA, 2018. Perspectives from the survey of honey bee colony losses during 2015–2016 in Argentina. *Bee World,* 2018, 95(1): 9−12.

Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16(11): 1395−1403.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelman B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1): S96−S119.

Sandoz JC, Roger B, Pham-Delegue MH, 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee: Comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *Comptes Rendus de l Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 318(7): 749−755.

Scheiner R, Erber J, Jr REP, 1999. Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 185(1): 1–10.

Stachel SE, 1993. Lithium perturbation and goosecoid expression identigy dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development*, 117(4): 1261–1274.

Van Lookeren Campagne MM, Wang M, Spek W, Peters D, Schaap P, 1988. Lithium respecifies cyclic AMP-induced cell-type specific gene expression in Dictyostelium. *Developmental Genetics*, 9(4/5): 589–596.

Wachten S, Schlenstedt J, Gauss R, Baumann A, 2006. Molecular identification and functional characterization of an adenylyl cyclase from the honeybee. *Journal of Neurochemistry*, 96(6): 1580–1590.

Woodgett J, 2013. There's more to lithium than nirvana. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8): 466–466.

Wright GA, Mustard JA, Simcock NK, Ross-Taylor AAR, Mcnicholas LD, Popescu A, Marion-Poll F, 2010. Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Current Biology*, 20(24): 2234–2240.

Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Suqihara H, Haseqawa T, Nabeshima T, 2012. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *British Journal of Pharmacology*, 115 (5): 852–858.

Yang F, Li JS, Wang Y, 2005. Effects of lithium chloride on body weight, learning and memory of lead-exposed rats. *Chinese Mental Health Jouranl*, 19(1): 269–271. [杨芳, 李积胜, 王毅, 2005. 氯化锂对染铅大鼠体重及学习记忆的影响. 中国心理卫生杂志, 19(1): 269–271.]

Zahorik DM, Johnston RE, 1976. Taste aversions to food flavors and vaginal secretion in golden hamsters. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 90(1): 57–66.

Ziegelmann B, Abele E, Hannus S, Beitzinger M, Berg S, Rosenkranz P, 2018. Lithium chloride effectively kills the honey bee parasite *Varroa destructor* by a systemic mode of action. *Scientific Reports*, 8(1): 683.