

意大利蜜蜂职能相关的两个细胞色素 P450 基因在附肢中的表达分析*

朱雅楠^{1**} 张 猛^{1,2} 李秋方¹ 梁立强¹ 李正汉卿¹ 苏松坤^{1***} 聂红毅^{1***}

(1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350000; 2. 江西省养蜂研究所, 南昌 330052)

摘 要 【目的】本研究分析意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 中细胞色素 P450 基因 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 在不同日龄工蜂及相同日龄不同职能工蜂的附肢中的表达模式, 旨在更好了解细胞色素 P450 基因在不同职能工蜂处理外源物质过程中的作用。【方法】通过组建蜂群收取 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂样本, 利用荧光定量 PCR 技术分别检测细胞色素 P450 基因 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 在附肢(触角、前足、中足、后足)中表达情况。【结果】基因 *CYP6BD1* 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂各附肢中的表达量均依次显著增加, 且该基因在 21 日龄采集蜂各附肢中的表达量显著高于 21 日龄哺育蜂; 与 *CYP6BD1* 基因相比, 基因 *CYP49A1* 在不同职能工蜂附肢中的表达量均较低, 但在 3 日龄工蜂各附肢中表达相对较高。【结论】基因 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 分别在采集蜂和 3 日龄工蜂各附肢中高量表达, 2 个基因在降解蜂群外和蜂群内部外源性物质中发挥重要作用, 为进一步研究膜翅目昆虫的职能分工提供新的视角。

关键词 意大利蜜蜂; 细胞色素 P450; 职能; 采集蜂; 哺育蜂

Expression of two cytochrome P450 genes in appendages of *Apis mellifera ligustica*

ZHU Ya-Nan^{1**} ZHANG Meng^{1,2} LI Qiu-Fang¹ LIANG Li-Qiang¹
LI Zheng-Han-Qing¹ SU Song-Kun^{1***} NIE Hong-Yi^{1***}

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China;

2. Jiangxi Apiculture Research Institute, Nanchang 330052, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the expression patterns of *CYP6BD1* and *CYP49A1* in workers (*Apis mellifera ligustica*) of different ages, and of the same age but with different tasks, in order to better understand the role of the cytochrome P450 gene in processing exogenous substances. 【Methods】Experimental colonies were constructed and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) used to measure the expression of cytochrome P450 genes *CYP6BD1* and *CYP49A1* was measured in appendages (antennae, front legs, middle legs and hind legs) of 3-day-old workers, 10-day-old nurses, 21-day-old foragers and 21-day-old nurses. 【Results】*CYP6BD1* was expressed in all appendages regardless of age or task. Moreover, the expression profile of *CYP6BD1* in each appendage was significantly higher in foragers than in nurses of the same age. Expression of *CYP49A1* was generally lower than that of *CYP6BD1*, although it was relatively high in 3-day-old workers. 【Conclusion】*CYP6BD1* and *CYP49A1* were most highly expressed in the appendages of foragers and 3-day-old workers, respectively, suggesting that these genes may play an important role in the degradation of exogenous substances. These results provide new information on the role of these genes in hymenopteran insects.

Key words *Apis mellifera ligustica*; cytochrome P450; tasks; foragers; nurses

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目(31772684); 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4); 福建省自然科学基金项目(2018J05043); 福建省省属高校科研项目(JK2017014)

**第一作者 First author, E-mail: YNZhuFafu@Outlook.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: susongkun@zju.edu.cn; hnhynie@126.com

收稿日期 Received: 2020-07-13; 接受日期 Accepted: 2020-12-20

蜜蜂是重要的授粉昆虫, 授粉植物减少、病原感染和杀虫剂滥用等不利因素导致蜜蜂的生存受到严重的威胁 (Neumann and Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010)。为了保护自身和蜂群, 蜜蜂启动多种策略来减少病原体、寄生物以及外源性物质接触造成的影响 (Evans *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2011)。研究发现当蜜蜂接触到蜂群崩溃失调症相关的病原或者外源性物质后, 会改变它们的行为和基因的表达 (Johnson *et al.*, 2009; Dainat *et al.*, 2012)。因此, 分析不同职能工蜂的不同组织中解毒基因的变化, 有助于更好地探究蜜蜂对外源物质的代谢与职能的关系。

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 是数量多且功能复杂的一类血红蛋白酶基因, 存在于大多数生物体的组织、器官中, 参与多种内源激素的合成与降解、内源或外源化合物的代谢, 包括信息素、表皮的烃类和激素、外源性物质 (植物化合物和杀虫剂), 它们在昆虫生长发育以及和宿主植物防御和反防御方面有重要的作用 (杨帆和王进军, 2008; 艾均文等, 2010; Feyereisen, 2012)。不同种昆虫中细胞色素 P450 基因数量有较大区别, 如果蝇 *Drosophila melanogaster* 中有 88 个, 家蚕 *Bombyx mori* 中 84 个, 小菜夜蛾 *Plutella xylostella* 中 156 个, 而西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组中只鉴定了 46 个 (Tijet *et al.*, 2001; Claudianos *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013)。根据细胞色素 P450 超家族中各成员存在的差异, 昆虫细胞色素酶分为 CYP2、CYP3、CYP4 以及线粒体 CYP 4 个进化分支 (Feyereisen, 2006)。CYP2 和线粒体 CYP 具有高保守性, 多参与昆虫的基本生理过程 (Feyereisen, 2011)。CYP3 是一个大的分支, 包含 CYP6 和 CYP9 家族, 与外源性物质代谢相关, 其中 CYP6 家族拥有最多的亚家族参与代谢植物源有毒物质的生化途径 (Wang *et al.*, 2015)。CYP4 分支的一些亚家族则保守性较低, 在昆虫基因组中表现出多样性的特点 (Bradfield *et al.*, 1991)。在膜翅目昆虫中, 拟寄生的黄蜂-蝇蛹金小蜂的基因组中有 34 个 CYP4 分支的基因 (Oakeshott *et al.*, 2010), 然而西方蜜蜂的基因

组中只包含了 4 个 CYP4 分支的基因 (Claudianos *et al.*, 2006)。CYP4 与 CYP6 部分成员存在于昆虫的触角、喙部、足部, 参与杀虫剂的代谢和抵御 (Berenbaum, 2002; Feyereisen, 2005)。

研究发现蜜蜂中细胞色素 P450 主要参与植物化合物的合成, 并与杀螨剂、真菌性杀虫剂、细菌性杀虫剂、新烟碱类杀虫剂的解毒过程相关 (Evans, 2004; Mao *et al.*, 2011; Berenbaum and Johnson, 2015; du Rand *et al.*, 2017; Christen *et al.*, 2019)。同时, 也发现 P450 基因可以参与蜜蜂上颚腺信息素的合成, 例如 *CYP18A1*、*CYP4AA1*、*CYP6AS8*、*CYP6AS11* (Malka *et al.*, 2009, 2014; Wu *et al.*, 2017)。在工蜂咽下腺、上颚腺、中肠、马氏管等组织中对其解毒基因的差异表达进行了分析, 发现采集蜂和哺育蜂的咽下腺和上颚腺中 P450 基因 *CYP6AR*、*CYP6AS*、*CYP6BD*、*CYP9Q* 亚家族具有显著差异, 可能与采集蜂对微生物和外源性化合物的防御有关 (Vannette *et al.*, 2015)。Mao 等 (2015) 分析了 *CYP4G11*、*CYP9Q1*、*CYP9Q2* 和 *CYP9Q3* 在不同职能工蜂触角和足的表达模式, 表明这 4 个基因与工蜂的职能相关。

蜜蜂的社会结构及行为表现较为复杂, 其基因表达模式会随着级型、日龄、环境以及社会分工而改变 (Evans and Wheeler, 2000; Ingram *et al.*, 2009; Malka *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2011; Zayed and Robinson, 2012)。作者所在的研究团队前期对刚出房工蜂、10 日龄哺育蜂和 21 日龄采集蜂触角转录组进行全面的分析, 发现 *CYP4G11*、*CYP9Q1*、*CYP6BD1*、*CYP49A1* 在各个样本之间存在显著差异, 其中 *CYP4G11*、*CYP9Q1*、*CYP6BD1* 在刚出房工蜂、哺育蜂和采集蜂触角的表达量依次显著增加, 而 *CYP49A1* 则呈现相反的表达模式 (Nie *et al.*, 2018)。

基于以上研究结果及 Mao 等 (2015) 的研究, 本研究重点关注尚未报道的 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 基因在不同职能工蜂的不同附肢中的表达模式。基于工蜂职能的可塑性, 本研究采集日龄依赖的不同职能工蜂 (3 日龄、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂), 并通过组建蜂群的方法获

得老年的哺育蜂(21 日龄哺育蜂)以排除日龄对职能分工的影响;分别解剖 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和哺育蜂的触角、前足、中足和后足,并利用 qPCR 检测 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 基因的表达模式。本研究为深入研究 P450 基因功能与工蜂职能分工的关系提供新的视角,为膜翅目昆虫中 P450 基因家族的生物学功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 来自于福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜂场,选择 5 个群势强且产卵力强的个体。

1.2 主要实验仪器及试剂

体视显微镜、冷光源仪器、实时荧光定量 PCR 仪(CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System)、高速台式离心机(Eppendorf)、DEPC 水(上海生工生物公司)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.3 标记蜜蜂

从 5 群意大利蜜蜂中,每群取出 2-3 张封盖子脾(刷掉子脾上的蜜蜂),放入温度为 34.5 °C,相对湿度为 60%的恒温恒湿箱中培养。每隔 24 h,用蜂刷扫取已出房蜜蜂,并用油漆笔在其胸背板及其腹部进行标记,每天标记 2 500 只放置于组建蜂群,组建蜂群中包括 1 只产卵蜂王、1 张幼虫脾、1 张蜜脾、1 张粉脾和 1 张空脾。为了保证有足够的实验样本,同时能维持人工组建蜂群的群势,实验连续标记 5 d,每天用不同颜色的油漆笔,便于准确区分标记工蜂的日龄。

1.4 样品采集与制备

在人工组建蜂群中,采集标记后第 2 天的工蜂作为 3 日龄工蜂样本;标记后第 9 天,采集 10 日龄哺育蜂。从蜂箱中取出幼虫巢脾,并认

真检查巢脾,将头部伸到有幼虫的巢房且持续时间超过 10 s 的 10 日龄标记工蜂作为 10 日龄哺育蜂样品;标记后第 20 天,按照上述相同的方法收集 21 日龄哺育蜂样品;在巢门口收集后足花粉筐内携带花粉团的标记工蜂作为 21 日龄采集蜂样品。每个采样点收集 200 只工蜂,用镊子快速抓取置于液氮中,并保存在 -80 °C 冰箱中。取出样品后,置于干冰上解剖,用解剖刀剪下触角、前足、中足、后足,每组解剖 50 只蜜蜂,并设置 3 个生物学重复。

1.5 RNA 提取及 cDNA 的合成

用液氮研磨试管中各采样点的触角、前足、中足、后足,采用 TRIZOL 法对不同组织进行总 RNA 的提取,并利用 NanoDrop 2000 对 RNA 浓度进行检测,将浓度稀释至 500 ng·μL⁻¹ 置于 -80 °C 冰箱备用。

反转录反应体系的配置(20 μL):根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)配置反应体系,去除基因组 DNA 反应:42 °C 反应 2 min 后 4 °C 保存;反转录反应:37 °C 下反应 15 min;85 °C 下反应 5 s;之后 4 °C 保存。

1.6 荧光定量 PCR

以蜜蜂 *actin* 基因(GenBank 登录号:NM_001185146.1)为内参基因,使用 Primer 6 设计 *CYP49A1*、*CYP9Q1*、*CYP6BD1* 基因的引物,引物序列见表 1。根据 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒配制反应体系:SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 5.0 μL; PCR 上游引物、下游引物(2 μmol·L⁻¹)共 2.0 μL; cDNA 模板(500 ng·μL⁻¹) 2.0 μL;灭菌水 1.0 μL 配置反应体系。PCR 程序如下:95 °C 下反应 5 min,95 °C 下反应 5 s,60 °C 下反应 30 s,40 个循环;溶解曲线分析:从 65 °C 到 95 °C,每 5 s 上升 0.5 °C。

1.7 数据分析

利用 2^{-ΔCT} 法计算基因相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001),同时使用 SPSS 20 软件

表 1 qPCR 引物信息
Table 1 Information of primer for qPCR

基因名称 Gene_name	基因编号 Gene_ID		引物序列 Primer sequences	产物长度 (bp) Product size
CYP9Q1	410492	F	GACCGTGACTGACATAGCCAAT	133
		R	CTCCTCCTGAAGCCTCTGTTGA	
CYP6BD1	551560	F	GCGGATTACAAGATACCAGGAA	112
		R	AACGGAGAGGATCTGGATGATA	
CYP49A1	724860	F	GGTTGTTATCGGTAATGGGC	148
		R	CTCTGGAAGGAACCTGTCTGC	
actin	406122	F	CCTAGCACCATCCACCATGAA	87
		R	GAAGCAAGAATTGACCCACCAA	

进行单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 对基因在各附肢中的表达量进行统计分析, 方差齐性使用 Tukey 法分析, 反之则用 Dunnett's T3 法进行分析, $P < 0.05$ 则代表差异显著。在 GraphPad 中利用分析均值及标准差绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 不同职能工蜂触角中 CYP9Q1、CYP6BD1、CYP49A1 基因的表达量

CYP9Q1、CYP6BD1 两个基因在不同职能工

蜂的触角中呈相似的表达模式 (图 1: A, B): 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂和 21 日龄采集蜂的触角依次显著增加, 采集蜂触角中表达量最高。为了排除日龄因素对工蜂职能的影响, 我们通过人工组建蜂群的方法收集 21 日龄哺育蜂, 比较相同日龄的哺育蜂和采集蜂触角中基因的表达量。结果显示 CYP9Q1、CYP6BD1 在 21 日龄采集蜂触角中的表达量显著高于同日龄的哺育蜂触角中的表达量 (CYP9Q1: $P = 0.001$; CYP6BD1: $P < 0.001$)。CYP49A1 基因在 3 日龄工蜂触角中表达量最高, 且与 10 日龄哺育蜂、

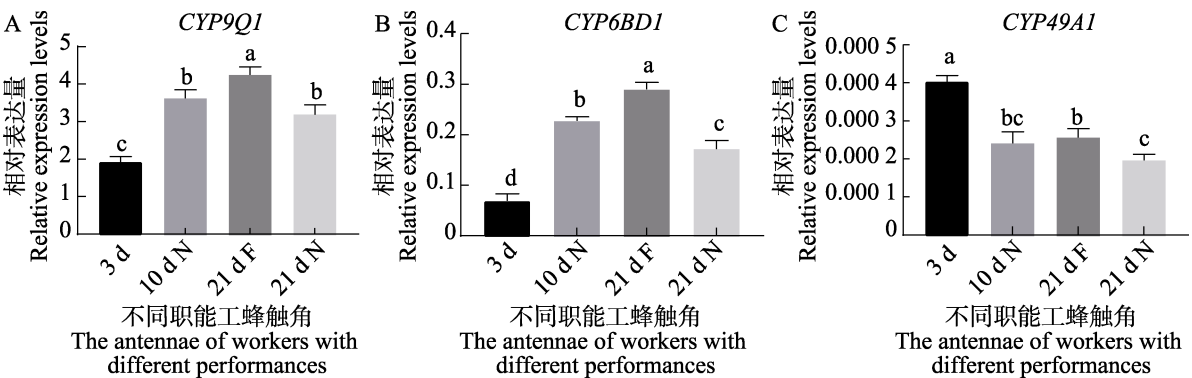


图 1 CYP9Q1、CYP6BD1、CYP49A1 在不同职能工蜂触角中的表达量

Fig. 1 Expression of CYP9Q1, CYP6BD1, CYP49A1 in the antennae of workers with different performances

A. qPCR 方法检测 CYP9Q1 在 4 组不同职能工蜂触角中的相对表达量; B. qPCR 方法检测 CYP6BD1 在 4 组不同职能工蜂触角中的相对表达量; C. qPCR 方法检测 CYP49A1 在 4 组不同职能工蜂触角中的相对表达量; 3 d: 3 日龄工蜂; 10 d N: 10 日龄哺育蜂; 21 d F: 21 日龄采集蜂; 21 d N: 21 日龄哺育蜂。图中数据为平均值±标准差, 柱上标有不同小写字母表示经单因素方差分析后显著差异 ($P < 0.05$)。下图同。

A. Relative expression level of CYP9Q1 in the antennae of workers with four different tasks using qPCR; B. Relative expression level of CYP6BD1 in the antennae of workers with four different tasks using qPCR; C. Relative expression level of CYP49A1 in the antennae of workers with four different tasks using qPCR, respectively; 3 d: 3-day-old workers, 10 d N: 10-day-old nurses, 21 d F: 21-day-old foragers, 21 d N: 21-day-old nurses; Data in the figure are mean $\pm$ SD, and histograms with different letters indicate significant difference at the 0.05 level by One-way ANOVA. The same below.

21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂触角中表达量均有显著差异 ($F = 49.136$; $df = 3, 8$; $P < 0.001$); 该基因 21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂触角中也存在显著差异 ($P = 0.042$) (图 1: C)。

2.2 不同职能工蜂前足中 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 基因的表达量

基因 *CYP6BD1* 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂和 21 日龄采集蜂前足中的表达量依次增加, 且均存在显著性差异 ($F = 215.399$; $df = 3, 8$;

$P < 0.001$); 同时, 该基因在 21 日龄采集蜂前足中的表达量也显著高于 21 日龄哺育蜂前足中表达量 ($P < 0.001$) (图 2: A)。*CYP49A1* 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂前足中基因表达量呈依次降低的模式; 3 日龄工蜂前足中的表达量显著高于 10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂前足中的表达量 ($F = 31.006$; $df = 3, 8$; $P = 0.000$), 但该基因的表达量在 21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂前足中无显著差异 ($P = 0.792$) (图 2: B)。

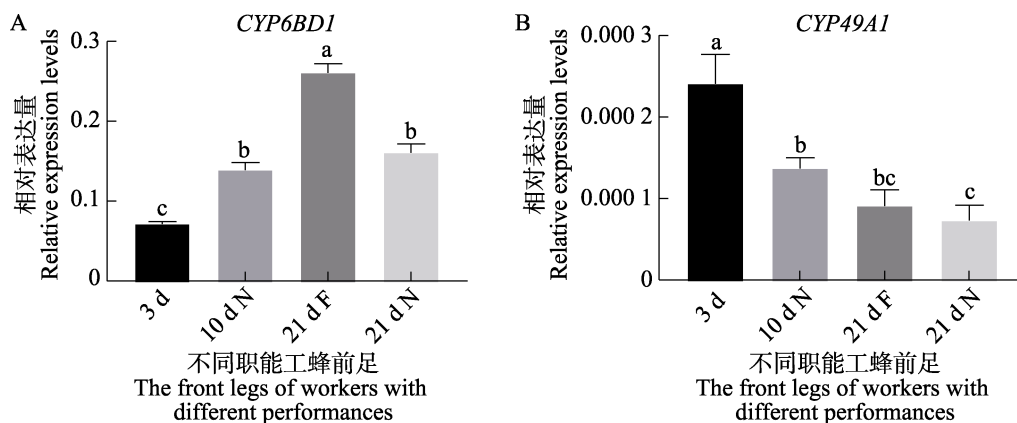


图 2 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 在不同职能工蜂前足中的表达量

Fig. 2 Expression of *CYP6BD1*, *CYP49A1* in the front legs of workers with different performances

A. qPCR 方法检测 *CYP6BD1* 在 4 组不同职能工蜂前足中的相对表达量;

B. qPCR 方法检测 *CYP49A1* 在 4 组不同职能工蜂前足中的相对表达量。

A. Relative expression level of *CYP6BD1* in front leg of workers with four different tasks using qPCR;

B. Relative expression level of *CYP49A1* in front leg of workers with four different tasks using qPCR.

2.3 不同职能工蜂中足中 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 基因的表达量

基因 *CYP6BD1* 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂和 21 日龄采集蜂中足的表达量依次增加, 且均存在显著性差异 ($F = 133.469$; $df = 3, 8$; $P < 0.001$); 同时, 该基因在 21 日龄采集蜂中足的表达量也显著高于 21 日龄哺育蜂中足的表达量 ($P = 0.028$) (图 3: A)。*CYP49A1* 基因在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂中足表达量整体呈依次降低的趋势; 该基因在 3 日龄工蜂中足的表达量显著高于 10 日龄哺育蜂、21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂中足的表达量 ($F = 104.381$; $df = 3, 8$; $P < 0.001$), 但该基因的表达量在 21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂

中足的表达量无显著差异 ($P = 0.841$) (图 3: B)。

2.4 不同职能工蜂后足中 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 基因的表达量

基因 *CYP6BD1* 在 3 日龄工蜂、10 日龄哺育蜂和 21 日龄采集蜂后足中的表达量依次增加, 且均存在显著性差异 ($F = 56.013$; $df = 3, 8$; $P < 0.001$); 同时, 该基因在 21 日龄采集蜂后足中的表达量也显著高于 21 日龄哺育蜂后足中表达量 ($P = 0.016$) (图 4: A)。*CYP49A1* 在不同职能的工蜂后足的基因表达量呈现不同的表达模式, *CYP49A1* 在 3 日龄工蜂和 21 日龄采集蜂后足中有较高的表达量, 且显著高于 21 日龄哺育蜂后足中的表达量 ($P = 0.011$; $P = 0.03$) (图 4: B)。

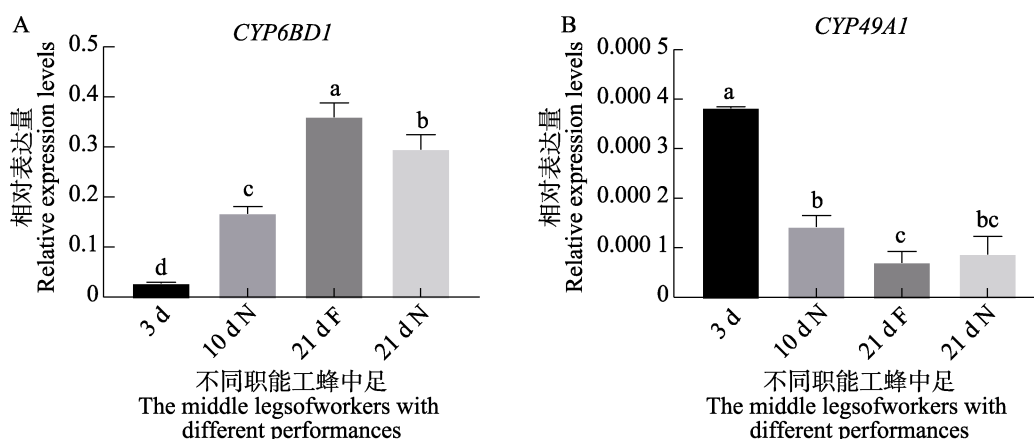


图 3 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 在不同职能工蜂中足中的表达量

Fig. 3 Expression *CYP6BD1* and *CYP49A1* in the middle legs of workers with different performances

A. qPCR 方法检测 *CYP6BD1* 在 4 组不同职能工蜂中足中的相对表达量;

B. qPCR 方法检测 *CYP49A1* 在 4 组不同职能工蜂中足中的相对表达量。

A. Relative expression level of *CYP6BD1* in the middle leg of workers with four different tasks using qPCR;

B. Relative expression level of *CYP49A1* in the middle leg of workers with four different tasks using qPCR.

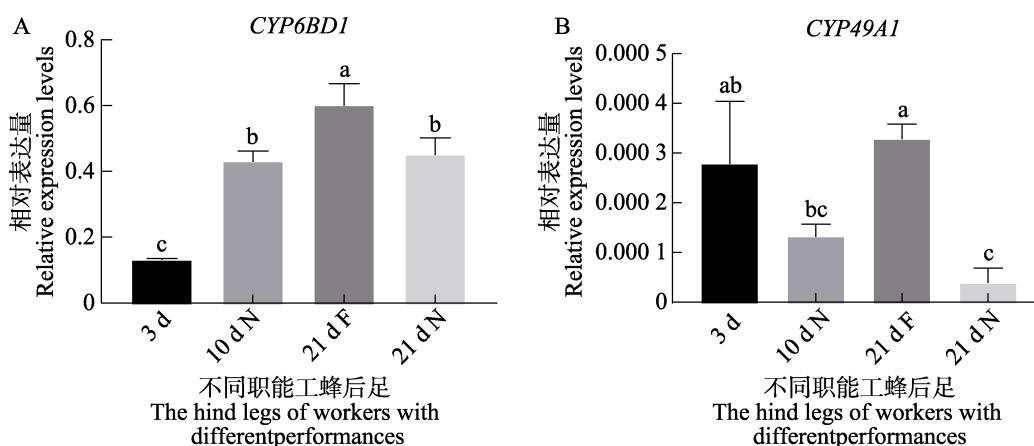


图 4 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 在不同职能工蜂后足中的表达分布

Fig. 4 Expression of *CYP6BD1*, *CYP49A1* in the hind legs of workers with different performances

A. qPCR 方法检测 *CYP6BD1* 在 4 组不同职能工蜂后足中的相对表达量;

B. qPCR 方法检测 *CYP49A1* 在 4 组不同职能工蜂后足中的相对表达量。

A. Relative expression level of *CYP6BD1* in the hind leg of workers with four different tasks using qPCR;

B. Relative expression level of *CYP49A1* in the hind leg of workers with four different tasks using qPCR.

3 讨论

CYP6 和 CYP9 家族都属于 CYP3 簇, 具有快速进化、高度多样性、组织或时间特异性表达的特点, 其功能与外源性物质代谢相关 (Feyereisen, 2011)。线粒体 CYP 家族基因大多具有高度特异化功能, 参与昆虫最基本的生理功能, 例如参与蜕皮激素的合成等 (Zhu *et al.*,

2013)。

CYP6 家族多数成员参与代谢植物源有毒物质的生化途径 (Wang *et al.*, 2015)。研究发现植物花粉中, 组成花粉粒外壁的主要物质孢粉素的结构成分 *p*-香豆酸 (*p*-coumaric acid) 可以促进工蜂中肠中的 *CYP6AS2*、*CYP6AS3*、*CYP6AS4*、*CYP6AS5*、*CYP9Q3*、*CYP6BD1* 解毒基因的表达, 可能用于调节蜜蜂免疫解毒过程 (Mao *et al.*,

2013)。CYP9Q 亚家族可以编码代谢天然或合成来源的外来毒素的酶 (Mao *et al.*, 2009, 2011)。在本研究中, 基因 *CYP9Q1* 的表达趋势与 Mao 等 (2015) 的研究结果相一致, 即 *CYP9Q1* 在刚出房蜜蜂、哺育蜂、采集蜂触角中的表达量依次增加; *CYP6BD1* 在不同职能工蜂 4 个附肢中表达模式与 *CYP9Q1* 相似, 这也与前期我们的转录组数据一致 (Nie *et al.*, 2018)。为了排除日龄的影响, 本研究通过人工组建蜂群, 采集了 21 日龄采集蜂和 21 日龄哺育蜂, 发现 *CYP6BD1* 基因在 21 日龄采集蜂各附肢中的表达量显著高于 21 日龄哺育蜂中的表达量, 说明该基因可能在蜜蜂采集行为中发挥重要的作用。与 *CYP6BD1* 不同, *CYP49A1* 属于线粒体 CYP 基因, 多存在于脂肪酸中, 当家蚕在接触农药辛硫磷后 24 h 后, *CYP49A1* 表达开始改变, 随着接触时间加长表达量不断增加 (Li *et al.*, 2014); 利用蛋白质组学在 10-HDA 高产蜜蜂上筛选出高表达蛋白 *CYP49A1* 及 *CYP9e2*, 并预测这两种蛋白的表达可能与 10-HDA 合成有关 (武雪龙, 2017)。本研究结果显示 *CYP49A1* 基因在 3 日龄工蜂各附肢中表达量较高, 且在不同职能工蜂附肢中均存在显著差异, 可能与 3 日龄工蜂在巢内的活动相关。

触角是主要的嗅觉器官, 包含不同类型的感受器, 远端部分存在味觉感受器, 且远端 8 节部分的嗅觉感受器含有细胞色素 P450, 参与对气味的清理 (Maibeche-Coisne *et al.*, 2005)。蜜蜂的足是用于检测、收集食物的组织, 前足的跗节是重要的化学感受器 (Goodman, 2003), 实验证实促使蜜蜂对蔗糖溶液有伸吻反应的组织不仅有触角还有前足的跗节 (Marshall, 1935), 因此, 工蜂前足的跗节也具有味觉感受器, 可能用于鉴别植物的类型和潜在的植物资源, 同时跗节有花粉刷用于收集头和触角上的花粉 (de Brito Sanchez, 2011)。中足的远端跗节部分具有花粉刷, 用于收集胸部花粉并清理前足的花粉刷, 后足的花粉刷在第一跗节部分则主要用于清理中足的花粉刷, 为了携带花粉后足胫节外侧高度特化形成花粉筐 (Goodman, 2003)。触角和前

足是工蜂重要的感受器, 参与工蜂与蜂群内、外部的接触和交流, 从幼年工蜂、哺育蜂、采集蜂这一职能转变过程中对外源性物质的识别、感知逐渐增多, 可能是促使参与调控的解毒基因 *CYP6BD1* 在采集蜂触角、前足中高表达原因。在工蜂中足和后足中 *CYP6BD1* 的表达趋势则与触角、前足一致, 说明虽然伸吻反应实验中未发现中足和后足存在明显的味觉感受器 (Marshall, 1935), 但是也参与了采集蜂收集食物的过程。该过程中中足和后足与外源物质的接触, 可能也导致 *CYP6BD1* 基因高表达。而 *CYP49A1* 在 3 日龄工蜂触角、前足、中足、后足中有较高的表达量, 其首要原因可能是 3 日龄工蜂在蜂群中职能是负责清理巢房, 在此过程中需要识别和处理一些巢内信息素; 其次由于发育并不成熟需哺育工蜂进行饲喂, 工蜂饲喂的食物中可能存在某些成分刺激 *CYP49A1* 的表达用于增强幼蜂对蜂群内部外源性物质代谢。

探究一个物种中不同的特异性组织的 P450 的基因差异表达有助于阐明 P450 基因的功能 (Pottier *et al.*, 2012)。本研究发现 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 分别在采集蜂和 3 日龄工蜂各附肢中高量表达, 说明它们可能在降解蜂群外和蜂群内部外源性物质中发挥重要作用, 但其作用的分子机制尚不清楚。Değirmenci 等 (2020) 利用基因组编辑的方法发现蜜蜂味觉受体 *AmGr3* 基因可以特异响应果糖。该方法为本团队后续获得 *CYP6BD1* 和 *CYP49A1* 的突变体工蜂提供了有效的基因编辑方法, 有利于深入研究它们在蜜蜂职能分工中作用的分子机理。

参考文献 (References)

- Ai JW, Zhu Y, Duan J, Yu QY, Zhang GJ, Wan F, Xiang ZH, 2011. Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 480(1): 42–50.
- Ai JW, Meng FL, Jia MZ, Li ZB, He XJ, Zhu Y, Xiang ZH, 2010. Research advances in cytochrome P450 in insects. The Sixth Youth Academic Seminar of Chinese Society of Sericultural Science. Yangling. 544–553. [艾均文, 孟繁利, 贾孟周, 李章宝, 何行健, 朱勇, 向仲怀, 2010. 昆虫细胞色素 P450 的研究进展. 中国蚕学会第六届青年学术研讨会. 杨凌. 544–

- 553.]
- Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, Degrandi-Hoffman G, 2011. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(4): 431–444.
- Berenbaum MR, 2002. Postgenomic chemical ecology: From genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 28(5): 873–896.
- Berenbaum MR, Johnson RM, 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. *Current Opinion in Insect Science*, 10(4): 51–58.
- Bradfield JY, Lee YH, Keeley LL, 1991. Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: Molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10): 4558–4562.
- Christen V, Krebs J, Bunter I, Fent K, 2019. Biopesticide spinosad induces transcriptional alterations in genes associated with energy production in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, 378(19): 120736.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 615–636.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7(2): e32151.
- de Brito Sanchez MG, 2011. Taste perception in honey bees. *Chemical Senses*, 36(8): 675–692.
- Değirmenci L, Geiger D, Rogé Ferreira FL, Keller A, Krischke B, Beye M, Steffan-Dewenter I, Scheiner R, 2020. CRISPR/Cas 9-mediated mutations as a new tool for studying taste in honeybees. *Chemical Senses*, 45(8): 655–666.
- du Rand EE, Human H, Smit S, Beukes M, Apostolides Z, Nicolson SW, Pirk CWW, 2017. Proteomic and metabolomic analysis reveals rapid and extensive nicotine detoxification ability in honey bee larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 82(3): 41–51.
- Evans JD, 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2): 105–111.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5): 645–656.
- Evans JD, Wheeler DE, 2000. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*, 2(1): research0001.1–0001.6.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450//Gilbert LI (ed.). *Comprehensive Molecular Insect Science Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 4. Oxford: Elsevier. 1–77.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.*, 34(Pt 6): 1252–1255.
- Feyereisen R, 2011. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(1): 19–28.
- Feyereisen R, 2012. 8-Insect CYP genes and P450 enzymes//Gilbert LI (ed.). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Oxford: Elsevier. 236–316.
- Goodman L, 2003. *Form and Function in the Honey Bee*. Cardiff (UK): International Bee Research Association. 1–220.
- Ingram KK, Krummey S, LeRoux M, 2009. Expression patterns of a circadian clock gene are associated with age-related polyethism in harvester ants, *Pogonomyrmex occidentalis*. *BMC Ecology*, 9(1): 7.
- Johnson RM, Evans JD, Robinson GE, Berenbaum MR, 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35): 14790–14795.
- Li FC, Ni M, Zhang H, Wang BB, Xu KZ, Tian JH, Hu JS, Shen WD, Li B, 2014. Expression profile analysis of silkworm P450 family genes after phoxim induction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122: 103–109.
- Lin QS, Jin FL, Hu ZD, Chen HY, Yin F, Li ZY, Dong XL, Zhang DY, Ren SX, Feng X, 2013. Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. *PLoS ONE*, 8(8): e72314.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Maibeche-Coisne M, Merlin C, Francois MC, Porcheron P, Jacquini-Joly E, 2005. P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: Cloning and expression patterns in male antennae. *Gene*, 346: 195–203.
- Malka O, Karunker I, Yeheskel A, Morin S, Hefetz A, 2009. The gene road to royalty-differential expression of hydroxylating genes in the mandibular glands of the honeybee. *Febs Journal*, 276(19): 5481–5490.

- Malka O, Nino EL, Grozinger CM, Hefetz A, 2014. Genomic analysis of the interactions between social environment and social communication systems in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1): 36–45.
- Mao WF, Rupasinghe SG, Johnson RM, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR, 2009. Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 154(4): 427–434.
- Mao WF, Schuler MA, Berenbaum MR, 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31): 12657–12662.
- Mao WF, Schuler MA, Berenbaum MR, 2013. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22): 8842–8846.
- Mao WF, Schuler MA, Berenbaum MR, 2015. Task-related differential expression of four cytochrome P450 genes in honeybee appendages. *Insect Molecular Biology*, 24(5): 582–588.
- Marshall J, 1935. On the sensitivity of the chemoreceptors on the antenna and fore-tarsus of the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Biology*, 12(1): 17–26.
- Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 1–6.
- Nie HY, Xu SP, X CQ, Geng HY, Zhao YZ, Li JH, Huang WF, Lin Y, Li ZG, Su SK, 2018. Comparative transcriptome analysis of *Apis mellifera* antennae of workers performing different tasks. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(1): 237–248.
- Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C, 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19(s1): 147–163.
- Pottier MA, Bozzolan F, Chertemps T, Jacquín-Joly E, Lalouette L, Siauxat D, Maïbèche-Coisne M, 2012. Cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in the olfactory organ of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, 21(6): 568–580.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 333–345.
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262(1): 189–198.
- Tobback J, Mommaerts V, Vandersmissen HP, Smaghe G, Huybrechts R, 2011. Age- and task-dependent foraging gene expression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(1): 30–42.
- Vannette RL, Mohamed A, Johnson BR, 2015. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports*, 5: 16224.
- Wang RL, Xia QQ, Baerson SR, Ren Y, Wang J, Su YJ, Zheng SC, Zeng RS, 2015. A novel cytochrome P450 CYP6AB14 gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential role in plant allelochemical detoxification. *Journal of Insect Physiology*, 75: 54–62.
- Wu XL, 2017. The study of expression and function of the *A. mellifera*'s P450 gene. Master dissertation. Jinan: Qilu University of Technology. [武雪龙, 2017. 蜜蜂细胞色素 P450 基因的表达与功能研究. 硕士学位论文. 济南: 齐鲁工业大学.]
- Wu YQ, Zheng HQ, Corona M, Pirk C, Meng F, Zheng YF, Hu FL, 2017. Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions. *Scientific Reports*, 7(1): 4530.
- Yang F, Wang JJ, 2008. Advances in relations between cytochrome P450 and insecticide resistance. *Sichuan Journal of Zoology*, 27(3): 460–463. [杨帆, 王进军, 2008. 昆虫细胞色素 P450 与抗药性关系研究进展. 四川动物, 27(3): 460–463.]
- Zayed A, Robinson GE, 2012. Understanding the relationship between brain gene expression and social behavior: Lessons from the honey bee. *Annual Review of Genetics*, 46(1): 591–615.
- Zhu F, Moural TW, Shah K, Palli SR, 2013. Integrated analysis of cytochrome P450 gene superfamily in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 14(1): 174.