

基于 Illumina HiSeq 测序技术研究吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂的影响*

李剑飞** 庄明亮 李志勇*** 牛庆生 王志 葛蓬 张发

(吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132108)

摘要 【目的】雄蜂对蜂群繁衍有着非常重要的作用。本研究旨在探究吡虫啉对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Ligustica 雄蜂生长发育和基因表达产生的影响。【方法】以意大利蜜蜂雄蜂为研究对象, 分别以 0.000 01、0.000 1 和 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度的吡虫啉对雄蜂幼虫进行连续饲喂处理。每天观察并记录幼虫的发育形态及死亡率, 在雄蜂幼虫后期 (移虫后 6 d) 测量幼虫体重。利用 Illumina HiSeq 测序技术对经吡虫啉处理的雄蜂进行转录组测序, 进而对差异表达基因进行深入分析。【结果】取食吡虫啉后的雄蜂幼虫, 体重低于正常雄蜂, 当浓度高于 0.000 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时差异显著; 雄蜂幼虫取食吡虫啉后出现死亡现象, 且死亡率随吡虫啉浓度的升高而增大; 差异表达基因分析结果上调与下调基因数量分别为 390 个和 130 个。GO 富集分析结果上调基因共分布于 55 个 GO 条目, 富集基因数量最多的是细胞进程、细胞、细胞组件、细胞膜、细胞膜组件、结合, 下调基因共分布于 48 个 GO 条目, 富集基因数量最多的是细胞进程、细胞、细胞组件。富集在有关生殖功能的差异表达基因中, 上调基因数量为 21 个, 下调基因数量为 5 个。KEGG 代谢通路富集分析结果上调基因富集在 159 个通路上, 其中富集基因数最多的是蛋白质消化吸收和神经活性配体-受体相互作用通路。下调基因富集在 71 个通路上, 其中富集基因数最多的是溶酶体、胰液分泌、神经活性配体-受体相互作用通路。【结论】吡虫啉能抑制意大利蜜蜂雄蜂的生长发育, 甚至造成幼虫死亡, 同时, 可以影响雄蜂的神经系统、代谢系统和生殖系统等。本研究结果为蜜蜂资源保护提供理论依据。**关键词** 意大利蜜蜂; 雄蜂; 吡虫啉; 转录组

Using Illumina HiSeq sequencing technology to reveal the effects of imidacloprid on *Apis mellifera* Ligustica drones

LI Jian-Fei** ZHUANG Ming-Liang LI Zhi-Yong*** NIU Qing-Sheng
WANG Zhi GE Peng ZHANG Fa

(Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the effect of imidacloprid on the growth, development and gene expression of *Apis mellifera* Ligustica drones. 【Methods】*A. mellifera* drone larvae were fed solutions containing 0.000 01, 0.000 1 or 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ imidacloprid and their development and mortality were recorded daily. Larval weight was measured in the late larval stage (6 d) and differential expression of genes was analyzed in depth. 【Results】Imidacloprid treated drone larvae were lighter in weight than control larvae, significantly so at concentrations higher than 0.000 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Mortality was also higher in the imidacloprid treatment group and increased with dosage. Analysis of differential gene expression indicated that 390 genes were up-regulated and 130 down-regulated. GO enrichment analysis revealed that the up-regulated genes were distributed in 55 GO teams, most of which are involved in cellular process, cells, cell parts, membranes, membrane parts and binding. Down-regulated genes were distributed in 48 GO teams, most of which are involved in cellular processes, cells and cell parts. There were also differentially expressed genes involved in reproduction, 21 of which were upregulated and 5 of which were

*资助项目 Supported projects: 吉林省科技发展计划项目-自然科学基金 (20190201284JC)

**第一作者 First author, E-mail: fly59445772@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: apis-li@163.com

收稿日期 Received: 2020-11-05; 接受日期 Accepted: 2021-01-26

down-regulated. KEGG pathway enrichment analysis showed that up-regulated genes were enriched in 159 pathways, among which the most enriched were involved in protein digestion and absorption and neuroactive ligand-receptor interaction. Down-regulated genes were enriched in 71 pathways, among which the most enriched were involved in lysosome, pancreatic secretion and neuroactive ligand-receptor interaction. **[Conclusion]** Imidacloprid can inhibit the growth and development of *A. mellifera* drones, and can cause larval mortality. Analysis of gene expression indicates that imidacloprid affects the nervous, metabolic and reproductive, systems of drone larvae. These results highlight the importance of protecting bees from the toxic effects of pesticides.

Key words *Apis mellifera* Ligustica; drone; imidacloprid; transcriptome

蜜蜂是一种重要的生态昆虫,其不仅能够制造多种蜂产品,而且具有重要的授粉功能,在农业生产和维持生态中发挥着不可替代作用 (Ratnieks and Carreck, 2010)。地球上大部分的花开花植物需要昆虫授粉,并且粮食作物居多 (Ollerton *et al.*, 2011)。我国作物种植面积大、种类多,蜜蜂授粉可以为农业提质增效,提高粮食产量 (Potts *et al.*, 2014)。据统计,蜜蜂授粉为我国农业生产创造的价值高达三千多亿 (刘朋飞等, 2011)。雄蜂是蜂群中的雄性蜜蜂,是非受精卵发育而来,仅有与处女蜂王交尾的作用 (薛运波, 2016)。它们和蜂王共同决定蜂群的群体性能。因此,雄蜂的好坏,关系到蜂群的整体性能,它们的遗传和经济性状对后代将产生直接影响 (陈盛禄, 2001)。

近些年,蜂群崩溃失调综合征 (Colony collapse disorder, CCD) 的出现引起了人类广泛关注,而滥用农药是其发生的重要原因之一,其中新烟碱类杀虫剂对蜜蜂有较大危害 (Adler *et al.*, 2012; Farooqui, 2013)。吡虫啉是一种新型杀虫剂,已经被大量应用在农业害虫防治之中,目前已经用于 60 多种农作物上 (张咏梅和李今越, 2004),我国每年都生产和使用大量含有吡虫啉的农药 (Yu *et al.*, 2014)。吡虫啉的大量使用在植物体上必将形成残留,并且转移到植物的花粉和花蜜中,因此残留的吡虫啉会对采集和授粉的蜜蜂以及蜂群产生影响 (Charvet *et al.*, 2005; Tapparo *et al.*, 2011; Stoner and Eitzer, 2012)。蜜蜂对农药的敏感度很高 (龚瑞忠等, 1999),根据我国农药毒性与风险等级划分标准,吡虫啉对于蜜蜂是高毒型农药 (苍涛等, 2012)。吡虫啉对蜜蜂的危害不仅表现为急性致死,还能

改变意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Ligustica 神经受体 (周婷等, 2013),改变蜜蜂的代谢、取食 (代平礼等, 2013; 庄明亮等, 2019),明显增加蜜蜂中肠内微生物的生长等 (Pettis *et al.*, 2012)。

目前,关于吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂的具体影响尚不明确。因此,本文研究吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂的生长发育的影响,并利用 Illumina HiSeq 测序技术对经吡虫啉处理的雄蜂进行转录组分析。研究结果可为揭示吡虫啉对雄蜂的不利影响,也能为蜜蜂资源保护等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

雄蜂幼虫取自吉林省养蜂科学研究所饲养的意大利蜜蜂雄蜂巢脾。

1.2 主要试剂与仪器

新鲜蜂王浆为蜂场自取,D-葡萄糖、D-果糖、酵母提取物购于生工生物工程股份有限公司,97%吡虫啉原药购于武汉远城科技发展有限公司。

纯水设备为积聚仪器有限公司产品,电子天平为龙腾电子有限公司产品,恒温培养箱为旋都凯仪器制造有限公司产品,24孔培养板为生工生物工程股份有限公司产品,吸取器为其林贝尔仪器制造有限公司产品。

1.3 幼虫饲料的配制

幼虫饲料配置方法:新鲜蜂王浆、D-葡萄糖、D-果糖、酵母提取物和蒸馏水的比例为 50 : 6 : 6 : 1 : 37。首先将蒸馏水加热至沸腾,冷却后加酵母提取物,搅拌溶解,再加新鲜蜂王浆、D-

葡萄糖、D-果糖摇匀。配制成的幼虫饲料冷冻备用, 饲喂前于 35 °C 解冻。

根据作者前期预试验和谭丽超等 (2016) 的试验结果确定吡虫啉亚致死剂量浓度。本文设置 3 个试验组, 分别 Ia 组为 0.000 01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Ib 组为 0.000 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Ic 组为 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.4 雄蜂人工培养

雄蜂室内培养方法参考庄明亮等 (2019) 室内培养工蜂的方法。每天观察并统计雄蜂幼虫的发育形态及死亡率, 及时取出死亡雄蜂幼虫个体, 直到全部羽化。在雄蜂幼虫后期 (移虫后 6 d) 测量幼虫体重。

1.5 样品采集

待雄蜂羽化出房后立即放入液氮冷冻, 2 h 后移入 -80 °C 冰箱保存。每组 3 个试验重复。

1.6 cDNA 文库构建及测序

样品利用 Total RNA Extractor (Trizol) 试剂盒提取方法提取 RNA。RNA 样本浓度测定采用 Qubit, 质量检测采用 Agilent 2100 Bioanalyzer。用 Qubit2.0 RNA 试剂盒对 Total RNA 精确定量, 然后分离片段化、双链 cDNA 合成、cDNA 片段化学修饰、文库扩增等。经过检测和质控后, 得到可用于 Illumina 平台的测序文库。委托生工生物工程股份有限公司对上述样品测序。

1.7 数据分析

对于原始数据, 去掉含接头和低质量序列后, 得到有效数据。将西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Apis+mellifera>) 作为参考序列, 使用 HISAT2 将质控后的测序序列与参考基因组比对, 并通过 RSeQC 统计比对结果。

利用软件 StringTie 计算 TPM (Transcripts Per Million) 值, 得到基因表达水平。采用 DESeq 进行分析, 将筛选条件设为: P 值 (P Value) < 0.05 且差异倍数 $|\text{Fold Change}| > 1$, Mean TPM ≥ 5 , 得到显著差异的基因。

将差异表达基因向 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org>) 和 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>) 的各条目比对, 得到 GO 功能和 KEGG 通路基因列表及基因数量。使用 clusterProfiler 进行功能富集分析, 当矫正后的 $P < 0.05$ 时, 认为该功能存在显著富集情况。

和 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>) 的各条目比对, 得到 GO 功能和 KEGG 通路基因列表及基因数量。使用 clusterProfiler 进行功能富集分析, 当矫正后的 $P < 0.05$ 时, 认为该功能存在显著富集情况。

2 结果与分析

2.1 吡虫啉对雄蜂幼虫生长发育的影响

2.1.1 吡虫啉对雄蜂幼虫体重的影响 试验开始第 6 天对照组与试验组的雄蜂幼虫体重变化见图 1。3 组试验组和对照组中, 对照组雄蜂体重最高, 为 (37.33 ± 1.38) mg, Ic 组雄蜂体重最低, 为 (21.02 ± 0.76) mg。与对照组相比, 饲喂含有不同浓度吡虫啉的饲料后的 3 组试验组雄蜂幼虫体重均低于对照组, 且雄蜂体重随吡虫啉浓度的升高而降低, 其中 Ic 组和 Ib 组雄蜂幼虫体重显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

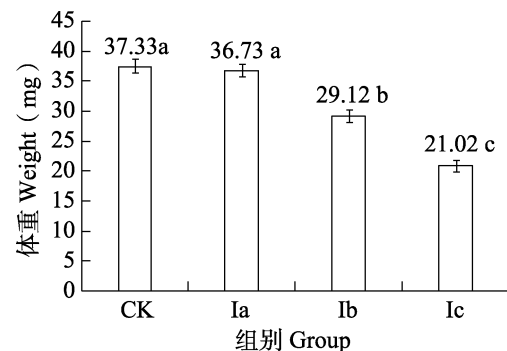


图 1 饲喂不同组别吡虫啉的雄蜂幼虫体重
Fig. 1 Weight of drone larvae fed imidacloprid at different group

柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level.

2.1.2 吡虫啉对雄蜂幼虫死亡率的影响 本试验中, 对照组正常饲养的雄蜂死亡率均在 20% 以下, 见图 2, 表明雄蜂室内培养技术和方法符合试验要求。3 组试验组在试验开始饲喂 3 d 时出现幼虫死亡, 与对照组相比, 饲喂含有不同浓度吡虫啉的饲料后的雄蜂死亡率均高于对照组, 且吡虫啉浓度越大, 死亡率越高。在试验开始 9 d 时, 高浓度 Ic 组的死亡率最大, 达到了 $(54.17 \pm 5.89)\%$ 。

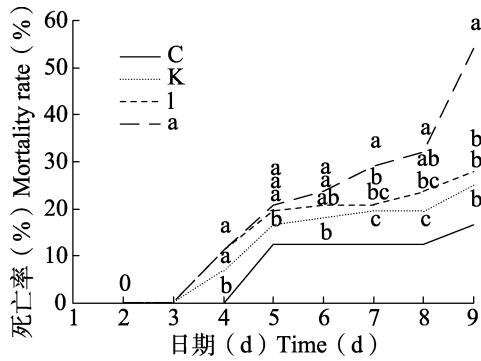


图 2 饲喂不同浓度吡虫啉的雄蜂幼虫死亡率

Fig. 2 Mortality rate of drone larvae fed imidacloprid at different concentrations

图中标有不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Line chart with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level.

2.2 吡虫啉对雄蜂基因表达的影响

2.2.1 测序数据质控与评估 将 3 种不同浓度

吡虫啉处理的意大利蜜蜂样品与对照意大利蜜蜂样品进行转录组测序, 结果选取对照组 CK、Ic 组进行分析。意大利蜜蜂雄蜂样品的转录组测序共测得 280 727 984 条序列, 经过过滤共得到 271 990 430 条序列, 平均有效读段比例为 96.89%, 平均 Q20 为 98.51%, 平均 Q30 为 94.47% (表 1)。上述结果表明转录组测序数据质量好, 可以用于进一步分析。

2.2.2 差异表达基因分析

对 Ic 组与 CK 组转录组数据进行比较, 得到 2 组间差异表达基因数量为 28 385 个, 设置筛选显著差异表达基因条件为, P 值 < 0.05 , Fold Change > 2 , 相比较 2 组样本的表大量均值至少一个大于 5, 得到显著差异表达的基因共有 520 个, 显著上调表达和显著下调表达的基因分别为 390 个和 130 个, 上调基因数量多于下调基因数量 (图 3)。

表 1 测序数据统计

Table 1 Statistical of transcriptome sequencing data

样品 Samples	原始数据 Raw reads	有效读段 Clean reads	Q20 碱基数 (bp) Q20 bases count (bp)	Q20 比率 (%) Q20 bases ratio (%)	Q30 碱基数 (bp) Q30 bases count (bp)	Q30 比率 (%) Q30 bases ratio (%)
CK1	46 376 174	44 963 936 (96.95%)	6 354 812 585	98.46	6 085 917 305	94.29
CK2	44 564 660	43 173 284 (96.88%)	6 037 359 572	98.45	5 781 535 518	94.28
CK3	46 725 270	4 5290 950 (96.93%)	6 219 236 066	98.52	5 964 725 512	94.49
Ic1	49 337 052	47 731 906 (96.75%)	6 463 194 275	98.68	6 223 434 168	95.02
Ic2	43 509 464	42 157 684 (96.89%)	5 876 729 939	98.48	5 631 709 813	94.38
Ic3	50 215 364	48 672 670 (96.93%)	6 718 897 366	98.48	6 439 253 820	94.38

CK1、CK2 和 CK3 为对照组的 3 个生物学重复; Ic1、Ic2 和 Ic3 为 Ic 组的 3 个生物学重复。

CK1, CK2 and CK3 represent three biological replicates of CK group; Ic1, Ic2 and Ic3 represent three biological replicates of Ic group.

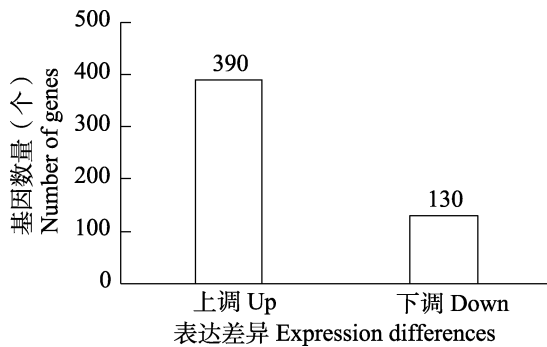


图 3 Ic 组与 CK 组差异表达基因数量

Fig. 3 Number of DEGs between CK and Ic

2.2.3 GO 分析

Ic 组对比 CK 组的差异表达基因 GO 分类结果显示, 差异表达基因分为生物学进程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function), 上调基因共分布于 55 个 GO term, 富集基因数量最多的是细胞进程 (Cellular process)、细胞 (Cell)、细胞组件 (Cell part)、细胞膜 (Membrane)、细胞膜组件 (Membrane part)、结合 (Binding) (表 2)。下调基因共分布于 48 个 GO term, 富集基因数量较多的依次是细胞进

表 2 Ic 组与 CK 组上调表达基因 GO 功能分类
Table 2 GO analysis of up-regulated genes between CK and Ic

生物学进程 Biological process		细胞组分 Cellular component		分子功能 Molecular function	
GO 条目 Term	基因数 Number	GO 条目 Term	基因数 Number	GO 条目 Term	基因数 Number
行为 Behavior	17	细胞 Cell	146	抗氧化活性 Antioxidant activity	2
生物附着 Biological adhesion	20	细胞连接 Cell junction	19	结合 Binding	116
生物调节 Biological regulation	89	细胞组件 Cell part	146	催化活性 Catalytic activity	77
细胞聚集 Cell aggregation	1	胞外基质 Extracellular matrix	10	通道调节器活性 Channel regulator activity	3
细胞成分组织 Cellular component organization or biogenesis	59	胞外基质成分 Extracellular matrix component	4	电子转移活性 Electron transfer activity	4
细胞进程 Cellular process	141	胞外区 Extracellular region	54	酶调节剂的活性 Enzyme regulator activity	5
发育进程 Developmental process	61	胞外区组件 Extracellular region part	32	分子功能调节因子 Molecular function regulator	11
局部建立 Establishment of localization	50	细胞膜 Membrane	112	分子传感器活性 Molecular transducer activity	16
生长 Growth	11	细胞膜组件 Membrane part	103	营养储藏活动 Nutrient reservoir activity	2
免疫系统进程 Immune system process	13	细胞膜内腔 Membrane-enclosed lumen	18	感受调节活动 Receptor regulator activity	3
定位 Localization	56	细胞器 Organelle	91	信号传感器活性 Signal transducer activity	18
运动 Locomotion	17	细胞器组件 Organelle part	59	结构分子活性 Structural molecule activity	20
代谢进程 Metabolic process	97	含蛋白质复合物 Protein-containing complex	44	转录因子活性、蛋白结合 Transcription factor activity, protein binding	3
多细胞生物进程 Multicellular organismal process	78	超分子纤维 Supramolecular fiber	13	转运器活性 Transporter activity	28
多组织进程 Multi-organism process	27	突触 Synapse	16		
生物进程的负调节 Negative regulation of biological process	30	突触组件 Synapse part	14		
生物进程的积极调节 Positive regulation of biological process	25	病毒 Virion	1		
生物进程的调节 Regulation of biological process	75	病毒组件 Virion part	1		
生殖 Reproduction	21				
生殖进程 Reproductive process	21				
应激反应 Response to stimulus	74				
节奏进程 Rhythmic process	5				
信号 Signaling	46				

程 (Cellular process)、细胞 (Cell)、细胞组件 (Cell part)。富集在有关生殖功能的差异表达基因中，上调基因数量为 21 个，下调基因数量为 5 个 (表 3)。

表 3 Ic 组与 CK 组下调表达基因 GO 功能分类
Table 3 GO analysis of down-regulated genes between CK and Ic

生物学进程 Biological process		细胞组分 Cellular component		分子功能 Molecular function	
GO 条目 Term	基因数 Number	GO 条目 Term	基因数 Number	GO 条目 Term	基因数 Number
行为 Behavior	3	细胞 Cell	45	结合 Binding	31
生物附着 Biological adhesion	3	细胞连接 Cell junction	1	催化活性 Catalytic activity	31
生物调节 Biological regulation	27	细胞组件 Cell part	45	电子转移活性 Electron transfer activity	2
细胞死亡 Cell killing	2	胞外基质 Extracellular matrix	2	酶调节活性 Enzyme regulator activity	2
细胞组成成分或生物成因 Cellular component organization or biogenesis	14	胞外区 Extracellular region	26	分子功能调节因子 Molecular function regulator	2
细胞进程 Cellular process	41	胞外区组件 Extracellular region part	10	分子传感器活性 Molecular transducer activity	4
解毒 Detoxification	1	细胞膜 Membrane	34	信号传感器活性 Signal transducer activity	5
发育进程 Developmental process	22	细胞膜组件 Membrane part	28	结构分子活性 Structural molecule activity	5
局部建立 Establishment of localization	15	细胞膜内腔 Membrane-enclosed lumen	5	转录因子活性、蛋白结合 Transcription factor Activity protein binding	1
生长 Growth	3	细胞器 Organelle	28	转运器活性 Transporter activity	12
免疫系统进程 Immune system process	7	细胞器组件 Organelle part	15		
定位 Localization	19	含蛋白质复合物 Protein-containing complex	4		
运动 Locomotion	6	超分子纤维 Supramolecular fiber	2		
代谢进程 Metabolic process	29	突触 Synapse	2		
多细胞生物进程 Multicellular organismal process	27	突触组件 Synapse part	1		
多组织进程 Multi-organism process	12				
生物进程的负调节 Negative regulation of biological process	11				
生物进程的积极调节 Positive regulation of biological process	11				
生物进程的调节 Regulation of Biological process	23				
生殖 Reproduction	5				
生殖进程 Reproductive process	5				
应激反应 Response to stimulus	28				
信号 Signaling	18				

2.2.4 KEGG 代谢通路富集分析 KEGG 代谢通路富集分析结果为, 上调基因富集在 159 个通路, 其中富集基因数最多的是蛋白质消化吸收 (Protein digestion and absorption)、神经活性配体-受体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor

interaction)(表 4)。下调基因富集在 71 个通路, 其中富集基因数最多的是溶酶体 (Lysosome)、胰液分泌 (Pancreatic secretion)、神经活性配体-受体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor interaction)(表 5)。

表 4 Ic 组与 CK 组差异表达基因的 KEGG 代谢通路富集分析

Table 4 KEGG enrichment analysis of DEGs between CK and Ic

上调基因 Up-regulated genes		下调基因 Down-regulated genes	
描述 Description	基因数 Number	描述 Description	基因数 Number
维生素消化吸收 Vitamin digestion and absorption	5	矿物吸收 Mineral absorption	2
胆汁分泌 Bile secretion	5	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	3
脂肪消化吸收 Fat digestion and absorption	4	碳水化合物消化吸收 Carbohydrate digestion and absorption	3
蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	8	胰腺分泌 Pancreatic secretion	4
醛固酮合成与分泌 Aldosterone synthesis and secretion	4	唾液分泌 Salivary secretion	3
卵巢类固醇生成 Ovarian steroidogenesis	3	胰高血糖素信号通路 Glucagon signaling pathway	3
氨基丁酸能突触 GABAergic synapse	4	甲状腺激素合成 Thyroid hormone synthesis	2
胆碱能突触 Cholinergic synapse	5	催乳素信号通路 Prolactin signaling pathway	3
突触囊泡周期 Synaptic vesicle cycle	3	胰岛素分泌 Insulin secretion	3
造血细胞谱系 Hematopoietic cell lineage	3	嗅觉传导 Olfactory transduction	2
肾素血管紧张素系统 Renin-angiotensin system	3	ECM 受体相互作用 ECM-receptor interaction	2
补体和凝血级联 Complement and coagulation cascades	2	粘着 Focal adhesion	3
细胞粘附分子 Cell adhesion molecules (CAMs)	3	PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway	3
血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	4	溶酶体 Lysosome	5
吞噬体 Phagosome	5	神经活性配体受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	4
细胞周期-酵母 Cell cycle - yeast	4	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	2
细胞周期 Cell cycle	5	MAPK 信号通路-酵母 MAPK signaling pathway - yeast	1
神经活性配体受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	12	2-氧代羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	1

续表 4 (Table 4 continued)

上调基因 Up-regulated genes		下调基因 Down-regulated genes	
描述 Description	基因数 Number	描述 Description	基因数 Number
细胞色素 P450 对外源物质的代谢 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	2	卟啉与叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	2
β -半乳糖生物合成 Betalain biosynthesis	1	视黄醇代谢 Retinol metabolism	3
苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	1	亚油酸 Linoleic acid metabolism	2
甲烷代谢 Methane metabolism	2	糖胺聚糖降解 Glycosaminoglycan degradation	1
丁酸代谢 Butanoate metabolism	2	链霉素生物合成 Streptomycin biosynthesis	1
丙酸代谢 Propanoate metabolism	3	其他聚糖降解 Other glycan degradation	1
α -亚麻酸代谢 alpha-Linolenic acid metabolism	2	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	3
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	4	赖氨酸降解 Lysine degradation	2
氰基氨基酸代谢 Cyanoamino acid metabolism	1	赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	1
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	3
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	3	抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	1
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	4	半乳糖代谢 Galactose metabolism	2

3 讨论

新烟碱类杀虫剂由于用量少、持久性强等特点,已成为全世界最主要的杀虫剂之一(庄明亮等,2019)。吡虫啉从1992年面市以后,在我国发展飞快。吡虫啉目前对我国的养蜂生产和蜜蜂授粉等行业产生了较大的威胁,并且吡虫啉对蜜蜂的伤害不仅仅体现在急性致死,还会通过影响蜜蜂的学习等行为来间接的伤害蜜蜂及蜂群(蔚添添,2019)。

为明确吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂生长发育及基因表达的影响,本文模拟外出的工蜂采集含有吡虫啉的花蜜及花粉,并存储于蜂巢之中,再由工蜂再吸取含有吡虫啉的饲料哺育雄蜂这一过程,研究吡虫啉对雄蜂幼虫发育的影响,并且

利用 Illumina HiSeq 测序技术对刚羽化的雄蜂进行转录组测序,进而对食用吡虫啉的雄蜂的差异表达基因进行分析。

在前期大量关于雄蜂的研究中,作者发现雄蜂虽然体型较大,但其抗逆性较低,例如温度不适、震动等不利条件都会对雄蜂产生较大的影响,所以推测雄蜂对农药的敏感度可能更高。根据吡虫啉对工蜂的半致死浓度,本试验设置3组不同浓度吡虫啉饲料的试验组,并与对照组进行比较。结果经吡虫啉处理后的雄蜂幼虫体重均低于对照组,其中 Ia 组雄蜂幼虫体重最高, Ic 组雄蜂幼虫体重最低,说明吡虫啉会抑制雄蜂幼虫的生长发育,并且吡虫啉浓度越高,抑制越强。在试验中我们观察发现,正常的雄蜂幼虫体型健硕、表皮光亮,身体呈 C 形,状态较为活跃,

而经吡虫啉处理后, 雄蜂幼虫均体型较小, 身体弯曲减少, 行动缓慢, 并且此现象随浓度增大, 变得更为明显。Davis 等 (1988) 研究发现工蜂幼虫食用乐果后, 虫体不再出现明显的“C”形, 并且多数幼虫不可以旋转, 这与本试验结果相似, 并进一步证明了本试验结果的可靠性。通过比较对照组雄蜂和经吡虫啉处理后雄蜂幼虫死亡率, 结果表明经吡虫啉处理后的幼虫死亡率均高于对照组, 且雄蜂幼虫的死亡率随吡虫啉浓度增高而增大, 说明吡虫啉会引起雄蜂幼虫死亡, 吡虫啉浓度越大死亡率越大。有关农药与蜜蜂相关试验中, 大多数研究对象为工蜂, 少有关于雄蜂的研究。Yang 等 (2012) 研究不同浓度的吡虫啉对蜜蜂幼虫的影响, 发现低浓度的吡虫啉, 不影响蜜蜂幼虫的化蛹和羽化, 但高浓度的吡虫啉, 会降低蜜蜂幼虫化蛹率和羽化率(谭丽超等, 2016)。Gregorc 和 Ellis (2011) 研究发现蜜蜂幼虫食用吡虫啉后, 中肠组织中的细胞凋亡。本研究中, 意大利蜜蜂雄蜂取食吡虫啉后, 出现了死亡, 并且死亡率随吡虫啉浓度增大而增大, 结果与前人(代平礼等, 2013; 庄明亮等, 2019)研究的工蜂试验结果相类似。

雄蜂主要作用是与蜂王交配, 因此雄蜂对蜂群繁衍有着非常重要的作用。本研究利用 Illumina HiSeq 测序技术来研究吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂基因表达的影响。结果发现取食含有吡虫啉的饲料后, 雄蜂的上调基因为 390 个, 下调基因 130 个, 上调基因多于下调基因, 说明雄蜂在吡虫啉胁迫后, 产生了一定的响应胁迫的应答反应, 推测这与雄蜂的免疫与解毒等功能有关。上调与下调基因均富集在神经活性配体-受体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor interaction), 说明吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂的神经系统产生了影响。Matsuda 等 (2001) 及 Belzunces 等 (2012) 研究发现, 吡虫啉伪装成神经递质, 与神经受体结合, 造成神经兴奋, 致使昆虫死亡。Suchail 等 (2010) 通过研究发现, 吡虫啉不仅对意大利蜜蜂具有直接的神经毒性, 代谢产物同样可以结合神经受体来影响神经系统。本研究结果表明吡虫啉影响了雄蜂的神经系统, 这与 Matsuda 等

(2001) 和 Belzunces 等 (2012) 研究的吡虫啉对工蜂影响结果相似。雄蜂通过蜂王信息素来寻找处女蜂王, 因此雄蜂具有发达的嗅觉。由于吡虫啉可以对雄蜂的神经系统产生影响, 怀疑吡虫啉对雄蜂的生殖行为影响更大, 具体影响还需进一步研究。

富集在有关生殖功能的差异表达基因中, 上调基因数量为 21 个, 下调基因数量为 5 个。上调基因明显多于下调基因, 说明雄蜂有关生殖的基因被激活表达。Pashalidou 等 (2020) 做过有关植物与熊蜂的一些研究, 利用欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 来咬破番茄和黑芥菜的叶片, 观察植物生长情况, 结果发现熊蜂会在花粉稀缺时啃咬还未开花植物的叶片, 从而促进这些植物开花, 被咬破的植物开花时间均有所提前。因此, 在植物生命受到威胁时, 植物会提前开花, 发育生殖系统, 以便在死亡之前完成授粉, 最大限度的繁殖后代。本研究利用吡虫啉饲喂意大利蜜蜂雄蜂, 对雄蜂造成了一定的毒性, 而有关雄蜂的生殖系统的基因上调较多, 因此我们推测雄蜂在受到吡虫啉胁迫时, 雄蜂个体受到了不利的影 响, 很可能在死亡之前促进雄蜂生殖系统尽快发育, 最大限度的繁殖后代。雄蜂的生殖功能在蜜蜂的繁衍中至关重要, 未来应针对吡虫啉对雄蜂生殖的具体影响进一步研究。

综上所述, 本研究探明了吡虫啉对意大利蜜蜂雄蜂生长发育的影响, 并利用 Illumina HiSeq 测序技术对正常及经吡虫啉处理的意大利蜜蜂雄蜂差异表达基因进行分析, 研究结果为蜜蜂资源保护和蜜蜂遗传育种提供一定的理论依据。

参考文献 (References)

- Adler LS, Seifert MG, Wink M, Morse GE, Turlings T, 2012. Reliance on pollinators predicts defensive chemistry across tobacco species. *Ecology Letters*, 15(10): 1140–1148.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL, 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43(3): 348–370.
- Charvet R, Moineau I, Bengsch ER, Colin ME, Bonmatin JM, Marchand PA, 2005. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13): 36–41.

- Chen SL, 2001. The Apicultural Science in China. Beijing: China Agricultural Publishing House. 4–15. [陈盛禄, 2001. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社. 4–15.]
- Cang T, Wang YH, Yu RX, Wu CJ, Chen LP, Wu SG, Zhao XP, 2012. The acute toxicity and risk assessment of 25 pesticides used in nectar plant to *Apis mellifera* L. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 24(5): 853–859. [苍涛, 王彦华, 俞瑞鲜, 吴长兴, 陈丽萍, 吴声敢, 赵学平, 2012. 蜜源植物常用农药对蜜蜂急性毒性及风险评价. *浙江农业学报*, 24(5): 853–859.]
- Davis AR, Solomon KR, Shuel RW, 1988. Laboratory studies of honeybee larval growth and development as affected by systemic insecticides at adult-sublethal levels. *Journal of Apicultural Research*, 27(3): 146–161.
- Dai PL, Zhou T, Wang Q, Wu YY, Geng WL, Song HL, 2013. Effects of imidacloprid on learning performance of *Apis mellifera* Ligustica. *Agrochemicals*, 52(7): 512–514. [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. *农药*, 52(7): 512–514.]
- Farooqui T, 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*, 62(1): 122–136.
- Gregorc A, Ellis JD, 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2): 200–207.
- Gong RZ, Chen R, Chen LY, 1999. Evaluation of toxicity and safety of imidacloprid to environmental organisms. *Pesticide Science and Administration*, 3(2): 3–5. [龚瑞忠, 陈锐, 陈良燕, 1999. 吡虫啉对环境生物的毒性与安全性评价. *农药科学与管理*, 3(1): 3–5.]
- Liu PF, Wu J, Li HY, Lin SW, 2011. Economic values of bee pollination to China's agriculture. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(24): 5117–5123. [刘朋飞, 吴杰, 李海燕, 林素文, 2011. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估. *中国农业科学*, 44(24): 5117–5123.]
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573–580.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S, 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3): 361–364.
- Pashalidou FG, Lambert H, Peybernes T, Mescher MC, Moraes CMD, 2020. Bumble bees damage plant leaves and accelerate flower production when pollen is scarce. *Science*, 368(6493): 881–884.
- Pettis JS, Dennis V, Johnson J, Galen D, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2): 153–158.
- Potts SG, Polce C, Biesmeijer JC, Garratt MPD, Jenner N, Breeze, TD, 2014. Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 184(100): 34–40.
- Ratnieks FLW, Carreck NL, 2010. Clarity on honey bee collapse? *Science*, 327(8): 152–153.
- Stoner KA, Eitzer BD, 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE*, 7(6): 39114.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2010. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(11): 2482–2486.
- Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Solda L, Girolami V, 2011. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6): 1564–1568.
- Tan LC, Bu YQ, Cheng Y, Zhou JY, Shan ZJ, 2016. Indoor toxicity research of imidacloprid on honeybee larvae. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 11(4): 253–257. [谭丽超, 卜元卿, 程燕, 周军英, 单正军, 2016. 吡虫啉对蜜蜂幼虫的室内毒性研究. *生态毒理学报*, 11(4): 253–257.]
- Wei TT, 2019. Study on molecular mechanism of effects of a sublethal dose of imidacloprid on learning behavior in *Apis mellifera* L. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [蔚添添, 2019. 亚致死剂量吡虫啉影响意大利蜜蜂学习行为的分子机制研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Xue YB, 2016. Bee Artificial Insemination. Beijing: China Agricultural Publishing House. 2–3. [薛运波, 2016. 蜜蜂人工授精技术. 北京: 中国农业出版社. 2–3.]
- Yu CH, Lin RH, Fu MR, Zhou YM, Brock TCM, 2014. Impact of imidacloprid on life-cycle development of *Coccinella septempunctata* in laboratory microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110(2): 168–173.
- Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW, 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11): 49472.
- Zhang YM, Li JY, 2004. Application and safety of imidacloprid. *Journal of Medical Pest Control*, 12(2): 728–730. [张咏梅, 李今越, 2004. 吡虫啉的应用及其安全性研究进展. *医学动物防制*, 12(2): 728–730.]
- Zhuang ML, Li ZY, Wang JZ, Liu NN, Wang Z, 2019. Metabolomic analysis imidacloprid effect of honeybee worker based on liquid chromatograph mass spectrometer. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 46(8): 2220–2227. [庄明亮, 李志勇, 王进州, 刘楠楠, 王志, 2019. 基于 LC-MS 技术的代谢组学方法研究吡虫啉对工蜂代谢的影响. *中国畜牧兽医*, 46(8): 2220–2227.]
- Zhou T, Song HL, Wang Q, Dai PL, Wu YY, Sun JH, 2013. Effects of imidacloprid on the distribution of nicotine acetylcholine receptors in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera* Ligustica). *Acta Entomologica Sinica*, 56(11): 1258–1266. [周婷, 宋怀磊, 王强, 代平礼, 吴艳艳, 孙继虎, 2013. 吡虫啉对意大利蜜蜂脑乙酰胆碱受体分布的影响. *昆虫学报*, 56(11): 1258–1266.]