



范荣莉, 王康, 季文娜, 陈孝梅, 蒯哲广, 吉挺. 吡虫啉与环境温度协同作用对意大利蜜蜂的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 445–452.

吡虫啉与环境温度协同作用对意大利蜜蜂的影响

范荣莉¹, 王康¹, 季文娜², 陈孝梅¹, 蒯哲广¹, 吉挺^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 本研究以吡虫啉为例, 旨在探讨不同环境温度下亚致死浓度农药对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 急性毒性、免疫基因和解毒酶系活性的影响。通过人工饲喂法确定不同温度 (25 和 35℃) 下吡虫啉对 1 日龄蜜蜂的经口急性毒性, 并根据毒力曲线计算得到 25℃ 环境的 LC_{10} 为 4.032 mg/L。人工饲喂蜜蜂 2 μ L 该浓度吡虫啉, 分别放置于 25℃ 和 35℃ 环境 24 h。比较两种温度环境中农药对蜜蜂的急性毒性, 测定免疫基因表达、解毒酶和乙酰胆碱酯酶活性。25℃ 和 35℃ 环境中吡虫啉对蜜蜂经口性半数致死浓度 LC_{50} 分别为: 11.074 mg/L 和 8.948 mg/L; 对比 25℃ 环境, 35℃ 环境与吡虫啉产生协同效应, 显著增加农药急性致死性 ($P < 0.05$)。 LC_{10} 吡虫啉能够抑制蜜蜂 *Abaecin*、*Apisimin*、*Defensin 1* 和 *Defensin 2* 的表达, 其中 *Abaecin* 和 *Apidaecin* 抑制效果显著 ($P < 0.05$); 对解毒酶系酶活性测定发现, 细胞色素 450 和羧酸酯酶活性在 25℃ 和 35℃ 环境均出现激活升高 ($P < 0.05$), 且 25℃ 环境中 CYP450 激活效果显著高于其在 35℃ 中 ($P < 0.05$)。乙酰胆碱酯酶的活性在农药处理后显著降低 ($P < 0.05$), 但在不同温度中无显著变化 ($P > 0.05$)。初步发现环境因子会与农药产生协同效应影响农药的急性致死毒性, 其结果可能具有一般普遍性, 这为蜜蜂安全性保护和农药安全使用评价提供新的方向。

关键词: 意大利蜜蜂; 吡虫啉; 温度; 免疫基因; 解毒酶系

中图分类号: Q965.9; S891

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 02-0445-08

Synergistic effects of imidacloprid and ambient temperature on honeybee (*Apis mellifera ligustica*)

FAN Rong-Li¹, WANG Kang¹, JI Wen-Na², CHEN Xiao-Mei¹, LIN Zhe-Guang¹, JI Ting^{1*} (1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Abstract: This study uses imidacloprid as an example to investigate the effects of sublethal concentrations of pesticides on the acute toxicity immune genes and detoxifying enzyme activities of *Apis mellifera ligustica* at different ambient temperatures. The oral acute toxicity of imidacloprid to 1-day-old honeybees at different temperatures (25℃ and 35℃) was determined by artificial feeding method, and the LC_{10} of the environment at 25℃ was calculated to be 4.032 mg/L based on the virulence curve. 2 μ L of this concentration of imidacloprid was artificially fed to honeybees and placed in 25 and 35℃ environments for 24 hours. The acute toxicity of pesticides to bees in two temperature environments was compared, and immune gene expression, detoxifying enzyme and acetylcholine lipase activity were measured. The oral

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (BE2018353); 黑龙江省自然科学基金 (C2017062); 吉林省自然科学基金 (20180101022JC)

作者简介: 范荣莉, 女, 1992 年生, 安徽淮北人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: lily_fan8023@163.com

*** 通讯作者** Author for correspondence: 吉挺, 男, 研究员, E-mail: tj@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-02-23; **接受日期** Accepted: 2020-05-07

LC₅₀ of imidacloprid to bees at 25 and 35°C were 11.074 mg/L and 8.948 mg/L respectively; compared with the 25°C environment, the 35°C environment produced a synergistic effect with imidacloprid, which significantly increased the acute lethality of pesticides ($P < 0.05$). LC₁₀ imidacloprid could inhibit the expression of honeybees *Abaecin*, *Apisimin*, *Defensin 1* and *Defensin 2* ($P < 0.05$), among which *Abaecin* and *Apidaecin* have significant inhibitory effects ($P < 0.05$); The measurement of detoxifying enzyme system enzyme activity showed that cytochrome 450 (CYP450) and carboxylesterase (CarE) activities increased activation at 25 and 35°C ($P < 0.05$), and CYP450 activation effect at 25°C stronger than at 35°C ($P < 0.05$). Acetylcholinesterase activity was significantly decreased by imidacloprid pesticide ($P < 0.05$), but there was no significant change in different temperatures. It was initially found that different environmental temperatures could regulate the acute toxicity of imidacloprid pesticides to honeybees, and the synergy of the two would affect the immunity and detoxifying enzyme system of honeybees to varying degrees. Our work revealed the synergistic effects of imidacloprid pesticides and ambient temperature in honeybees. The results may be general and provide new research perspectives for pesticide safety evaluation and honeybee protection.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; imidacloprid; temperature; immunity gene; Detoxifying enzyme system

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 是一种重要的经济昆虫, 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), 对农业增产增收和生态系统的稳定具有重要作用 (Free 1970; Gallai *et al.*, 2009)。蜜蜂是一种变温动物, 体温随着外界环境温度改变而变化。整个蜂群可以被看作特殊的“超个体”, 当蜂群内存在子脾时, 子脾附近的温度能够维持在 34.5°C 左右 (陈恕仁和曹磊, 2012)。当外界环境温度较低时, 蜜蜂通过胸部肌肉震动产热、相互结团等方式提高蜂群的温度。而当外界气温超过 35°C, 蜜蜂通过扇风、采水降温等方式调节蜂群的温度 (赖康等, 2012)。

温度影响蜜蜂卵、幼虫和蛹期的生长发育, 甚至能够干扰蜜蜂羽化后的行为表现。意蜂工蜂蛹期在 29 ~ 37°C 均可发育, 最适宜温度为 35°C, 随着温度降低工蜂封盖发育期极显著延长。封盖时的发育期温度低于 29°C 或者高于 37°C 会导致意蜂发育畸形, 低于 28°C 或者高于 39°C 意蜂的封盖子全部死亡 (李月, 2008)。最近有研究发现对比 35°C, 32°C 蛹期发育而来的蜜蜂拥有更重的体重和更长的寿命 (Szentgyörgyi *et al.*, 2018)。蛹期温度能够影响成年蜜蜂脑部蘑菇体内突触复合体的大小和结构, 这些变化可能会对蜜蜂神经系统产生影响, 进而改变蜜蜂行为 (Groh *et al.*, 2004)。Becher 等 (2009) 发现在一定范围内 (32 ~ 36°C), 蛹期温度越低的蜜蜂首次采集日龄越晚,

且在社会分工中更倾向于采蜜任务。有研究发现蛹期发育温度显著影响蜜蜂的短期记忆能力, 报道称 35 ~ 36°C 温度环境发育的蜜蜂表现突出的记忆行为, 而经历 32°C 蛹期温度的蜜蜂成年后回巢率降低 (Tautz *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005)。此外, 其他如发育温度对巢内温度的调节行为、采集能力和抗螨梳理行为等研究亦有报道 (Siege *et al.*, 2005; Currie and Tahmasbi 2008; 杨爽等, 2010)。

农药除直接杀死蜜蜂外, 会影响蜜蜂的行为、神经、发育、繁殖力、免疫力、学习能力等其他特征 (Wu *et al.*, 2017)。新烟碱类农药由于其特殊的结构以及对高等动物低毒等特点使其被广泛使用, 吡虫啉就是其中之一 (Castle *et al.*, 2010; Jeschke *et al.*, 2011)。吡虫啉在农业生产上被广泛用于种子、叶面和土壤中多种害虫的防治, 对环境的负面影响也逐渐显露 (张敏恒等, 2012)。目前关于吡虫啉对蜜蜂的影响研究报道有很多: 周婷等 (2013) 发现吡虫啉除了文献报道的抑制 n ACh R 的表达外, 还能抑制 n ACh R- $\alpha 7$ 的表达量; Daniel 等 (2014) 研究了吡虫啉对非洲蜜蜂头部和胸部线粒体生物能功能的影响, 发现吡虫啉可阻断线粒体产能, 导致 ATP 的消耗; 代平礼等 (2013)、Axel 等 (2004) 用吡虫啉以经口方式对蜜蜂进行处理, 发现吡虫啉可损害蜜蜂嗅觉学习能力; 吴艳艳等 (2014) 从细胞水平证实了亚致死剂量吡虫啉对成年意蜂工蜂脑神经细胞具有致凋亡作用。随着农药安全使用指导及风险监控

的逐渐加强,由高毒农药引起的蜜蜂急性中毒的现象得以缓解,但农药的亚致死效应带来的一系列潜在的影响也逐渐地引起重视。如亚致死剂量农药处理后导致蜜蜂幼虫孵化率降低,成年工蜂分工行为不明显,采集酿蜜混乱,巢房清理行为也明显减少,导航定位和辨别同群蜜蜂的能力下降,学习记忆能力受到影响等相继被报道 (Kreissl and Bicker, 1989; Vandame and Belzunces, 1998; Alix *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2012)。

意蜂工蜂蛹期在 29 ~ 37℃ 均可发育,成年工蜂在 10 ~ 38℃ 能够正常出箱活动。因此,外界环境温度和农药很可能是蜜蜂物种同时遭遇的两种胁迫。Piotr 等 (2010) 通过实验室内人工饲喂的方式比较不同发育温度蜜蜂对乐果农药的耐药性,结果发现 33℃ 孵化的蜜蜂幼虫对农药更加敏感,半数致死浓度远高于 (28 倍) 其在 35℃ 环境中的浓度。关于温度对蜜蜂生长发育的影响和农药对蜜蜂的影响研究较多,然而,国内外关于羽化后成年蜜蜂暴露的环境温度与农药的协调作用的研究较少。本文以研究较为透彻的吡虫啉农药为例,分析羽化后蜜蜂在不同温度环境受到吡虫啉胁迫后的影响,以期为农药在不同季节使用的安全性评价以及蜜蜂保护提供新的研究角度。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

试验蜜蜂来自扬州大学试验蜂场,为本地意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*。

1.2 供试试剂及主要仪器

吡虫啉原药 (97%) 来自扬州大学植物保护学院; Trizol 试剂、反转录和荧光定量试剂盒来自诺唯赞生物科技有限公司; 蛋白浓度定量试剂盒, AchE 试剂盒, CarE 试剂盒和 GST 试剂盒均来自索莱宝生物技术有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。恒温培育箱来自江南宁波仪器制造厂 (HWS-328); 全自动酶标仪型号为 Biotek synergy2。

1.3 试虫处理

准备 3 箱群势一致的健康姐妹蜂王群,用稀糖浆奖励饲喂和蜂王限制器控制蜂王在给定空巢脾上产卵 8 h。观察到巢脾上观察到大量卵后将蜂王隔离在限制器外,工蜂可以自由进出哺育幼虫。19 d 后,分别从 3 箱中取出相应巢脾,放到实验

室恒温恒湿培养箱内 (温度 35℃, 湿度 75%)。待新蜂出房后,立即提取 240 头,随机分为 2 组,每组 6 笼,每笼 20 头,分别放入 25 和 35℃ 培养箱环境中。将分组蜜蜂饥饿 5 h 后,人工饲喂 2 μ L 下述不同糖饲料。试验重复 3 次。

1.4 不同温度下吡虫啉胁迫对蜜蜂毒力测定

用丙酮将 97% 吡虫啉原粉配制成 10 000 mg/L 的原液,用 50% 糖水稀释成 0、4、7、10、15 和 20 mg/L 浓度梯度。记录 24 h 急性死亡率,进行不同温度下 24 h 吡虫啉胁迫对蜜蜂毒力测定。

1.5 免疫基因表达测定

根据毒力曲线计算出 25℃ 环境下吡虫啉胁迫对蜜蜂的 LC_{10} 为 4.032 mg/L。采用 1.3 中方法,饲喂 LC_{10} 和 4.032 mg/L 丙酮对照。24 h 后将蜜蜂处死,从不同温度处理的对照和农药胁迫组中各取 3 头蜜蜂,截取头部组织用于免疫基因表达测定,试验重复 3 次。使用 Trizol 法提取总 RNA,按照试剂盒 (FastQuant RT Kit, 天根) 说明书操作反转录出 cDNA。构建 20 μ L 反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTMII 酶 10 μ L, 上、下游引物 (表 1) 各 0.4 μ L, cDNA 0.4 μ L, ROX 0.4 μ L, 无 RNA 酶水补充至 20 μ L。反应条件: 预变性 95℃ 30 s; 循环反应 (30 个): 95℃ 10 s, 60℃ 30 s; 溶解曲线阶段: 60℃ 升温至 95℃。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达定量。

1.6 解毒酶活性测定

根据毒力曲线计算出 25℃ 环境下吡虫啉胁迫对蜜蜂的 LC_{10} 为 4.032 mg/L。采用 1.3 中方法,饲喂 LC_{10} 和 4 mg/L 丙酮对照。24 h 后将蜜蜂处死,从不同温度处理的对照和农药胁迫组中各取 5 头蜜蜂,截取头部组织测定 Ache 活性,腹部用于测定羧酸酯酶 CarE 和 GST 活性,试验重复 3 次。按照蛋白浓度定量试剂盒, AchE 试剂盒, CarE 试剂盒和 GST 试剂盒说明书要求测定蛋白浓度和解毒酶活性。酶活性易受高温影响,采用低温匀浆破碎仪破碎组织。使用 Biotek synergy2 全自动酶标仪进行自动加样和温度控制,以满足酶活试剂盒需要的温度和精确反应时间的要求。

1.7 数据处理

毒力曲线数据使用软件 SPSS 中 probit 分析程序完成,其余采用 Duncan 氏多重和 LSD 互作比较进行分析,文中数据均为平均值 $\pm$ 标准误,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

表 1 基因引物
Table 1 Primer sequences

目的基因 Target genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物长度 (bp) Product size
<i>Abaecin</i> F	GTACCATTACCAAATGTACCA	189
<i>Abaecin</i> R	GACCAGGAAACGTTGGAAC	175
<i>Apidaecin</i> F	TAGTCGCGGTATTTGGAAT	187
<i>Apidaecin</i> R	TTTCACGTGCTTCATATTCTTCA	175
<i>Defensin 2</i> F	GCAACTACCGCCTTTACGTC	149
<i>Defensin 2</i> R	GGGTAACGTGCGACGTTTTA	152
<i>Defensin 1</i> F	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	182
<i>Defensin1</i> R	AATGGCACTTAACCGAAACG	178
<i>Hymenopt</i> F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	169
<i>Hymenopt</i> R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT	174
<i>Apismin</i> F	TGAGCAAAATCGTTGCTGTC	184
<i>Apismin</i> R	AACGACATCCACGTTGATT	191
β - <i>actin</i> F	CCGTGATTTGACTGACTACCT	185
β - <i>actin</i> R	AGTTGCCATTTCTGTTC	168

2 结果与分析

2.1 不同温度下吡虫啉农药对蜜蜂死亡率的影响

1 日龄新出房蜜蜂在 25℃ 和 35℃ 温度环境暴露于吡虫啉农药胁迫的急性毒性回归方程见表 2。蜜蜂的死亡率与吡虫啉农药的浓度呈正相关, 25℃ 和 35℃ 环境中吡虫啉对 1 日龄蜜蜂的急性毒性 LC_{50} 分别为 11.074 mg/L 和 8.948 mg/L, 差异显著 ($P < 0.05$)。说明处于相同浓度的吡虫啉毒素胁迫, 暴露于 35℃ 的蜜蜂死亡率显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明, 温度可以与吡虫啉农药产生协调作用, 对比 25℃, 35℃ 环境温度可以加剧农药对蜜蜂的急性死亡胁迫。

2.2 不同温度下 LC_{10} 吡虫啉农药对蜜蜂免疫基因的影响

在本实验选择的温度条件下, 对照组的免疫基因没有出现显著的表达差异, 表明温度因子不会影响蜜蜂免疫基因的表达。而 LC_{10} 吡虫啉胁迫能抑制机体内免疫基因 *Abaecin*, *Hymenoptaecin*, *Apidaecin*, *Defensin 1*, *Defensin 2* 基因的表达, 其中

Abaecin 和 *Apidaecin* 抑制效果显著 ($P < 0.05$)。这种趋势在 25℃ 和 35℃ 环境中表现一致, 而且 35℃ 环境中下调更为明显, 但是不具统计学差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 温度因子可以与吡虫啉农药产生协调作用, 对比 25℃, 35℃ 环境可能会更大程度的降低蜜蜂免疫能力。

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

温度 (℃) Temperature	回归方程 Y = aX + b	95% 置信 区间 95% CL	半数致死 浓度 (mg/L) LC_{50}
25	Y = 0.182X - 2.015	0.127 ~ 0.237	11.074
35	Y = 0.2X - 1.793	0.139 ~ 0.262	8.948

注: Y, 死亡率对数值; X, 药剂浓度; a, 截距; b, 斜率。Note: Y, mortality (Lg); X, dose; a, intercept; b, slope.

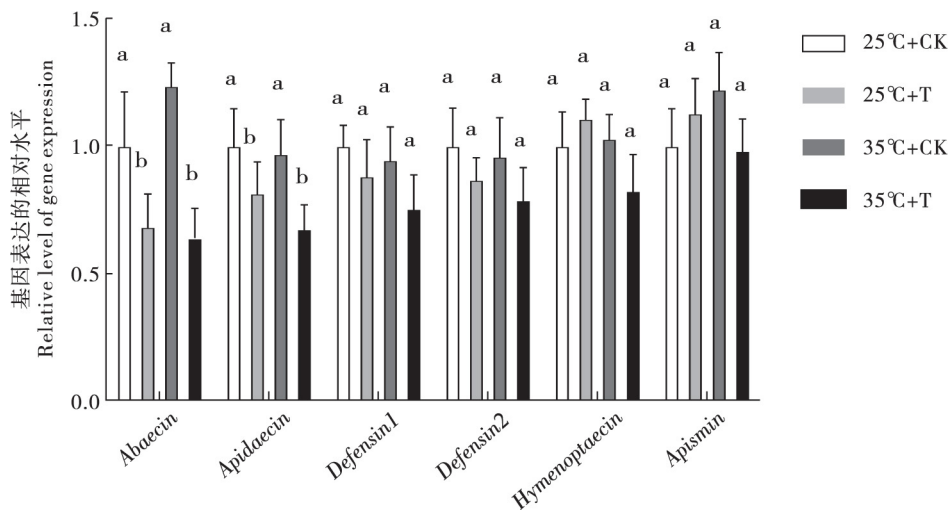


图1 不同温度下 LC₁₀ 吡虫啉对蜜蜂 6 种免疫相关基因表达的影响

Fig. 1 Effects of LC₁₀ imidacloprid on the expression of six immune-related genes in honeybees at different temperatures
注: 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$); 图 2 同。Note: Different small letters above bars represent significant difference ($P < 0.05$); The same for Fig. 2.

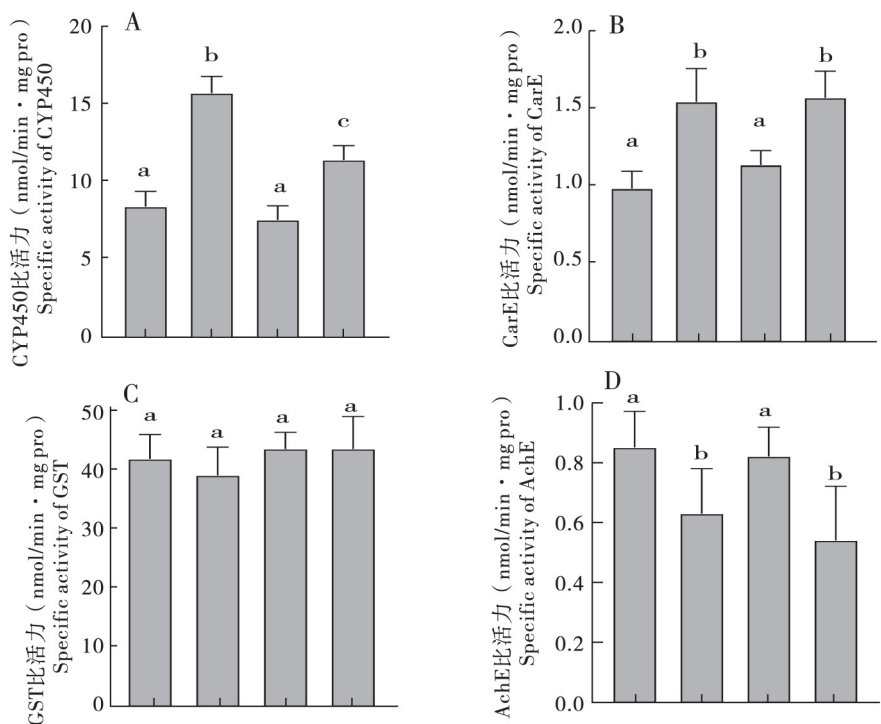


图2 不同温度下 LC₁₀ 吡虫啉对蜜蜂解毒酶和 AchE 活性的影响

Fig. 2 Effects of LC₁₀ imidacloprid on bee detoxifying enzyme and AchE activities at different temperatures
注: A, CYP450, 细胞色素 P450; B, CarE, 羧酸酯酶; C, GST, 谷胱甘肽 S 转移酶; D, AchE, 乙酰胆碱酯酶. Note: A, CYP450, Cytochrome P450; B, CarE, Carboxylesterase; C, GST, Glutathione-S-transferase; D, AchE, Acetylcholinesterase.

2.3 不同温度下 LC₁₀ 吡虫啉农药对蜜蜂解毒酶和 AchE 活性的影响

不同处理蜜蜂的解毒酶活性见图 2。由图可知, CYP450 和 CarE 经过吡虫啉处理活性均显著提高 ($P < 0.05$), AchE 活性出现显著抑制。值得

注意的是, 蜜蜂在 25℃ 环境受到吡虫啉胁迫后 CYP450 激活程度最高, 显著高于两种空白对照, 甚至显著高于其在 35℃ 环境中 ($P < 0.05$)。GST 活性出现不同程度变化, 但不具有统计学意义。

3 结论与讨论

胃毒法是实验室常用的农药安全性评价方法。前期预实验中,采取让蜜蜂自由采食含吡虫啉农药糖水的方式进行农药因子胁迫,结果发现暴露于相同浓度吡虫啉农药的蜜蜂死亡率在各个重复组中差异较大,多次试验发现 24 h 死亡毒力回归曲线相关系数 0.8 ~ 0.9 之间。因此,采取人工单只口头饲喂的方法进行农药胁迫,使得毒力曲线相关系数提高到 0.9 以上,增加了试验结果的准确性,并根据 25℃ 毒力曲线确定 LC_{10} (4.032 mg/L) 剂量浓度进行后续试验分析。

抗菌肽在昆虫先天免疫系统中起到非常重要的作用,是昆虫体液免疫的重要功能物质 (Ferrandon *et al.*, 2007)。目前,蜜蜂上已经鉴定到 6 种免疫效应抗菌肽:常见的 *Defensin* 家族基因 (*Defensin 1* 和 *Defensin 2*),富含亮氨酸的 *Abaecin* 和 *Apidaecin* 蛋白以及蜜蜂物种特有的 *Hymenoptaecin* 和 *Apisimin* 抗菌肽 (Evans *et al.*, 2006)。2006 年蜜蜂全基因组测序完成后,发现蜜蜂种群具有的已知免疫基因家族数量较少 (Weinstock, 2006)。因此,除了群体社会性防御可以有效地降低病原体的压力外,现存免疫基因强大的多态性可能也是维持蜜蜂健康生长的重要因素,如 *Apidaecin* 每个外显子的可变剪切都能编码出一种功能独特的抗菌肽 (Casteels-Josson *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 2006)。这些抗菌肽在蜜蜂抵抗外源毒素侵害如病原菌和农药胁迫方面发挥着重要的作用 (Danilčík *et al.*, 2015; 施腾飞等, 2017)。本研究发现吡虫啉处理可以显著降低 *Abaecin* 和 *Apidaecin* 基因的表达。*Defensin 1*、*Defensin 2*、*Hymenoptaecin* 和 *Apisimin* 基因表达有所降低,但结果差异不显著,在更高的温度 (35℃) 环境中暴露于吡虫啉农药的蜜蜂体内抗菌肽基因转录水平表达受到抑制更为强烈。这些免疫效应抗菌肽的下调表明蜜蜂先天免疫系统可能受到吡虫啉农药的胁迫,对比蜂群正常温度,孵化温度 (35℃) 环境下的蜜蜂免疫系统受到吡虫啉胁迫后影响更为严重。

CYP450、GST 和 CarE 是昆虫体内存在的 3 种重要的解毒酶,在蜜蜂内源化合物合成、信号转导和农药代谢等方面起着非常重要的作用。CYP450 和 CarE 是第一解毒阶段主要解毒酶, GST

主要作用在第二阶段 (Claudianos *et al.*, 2006; Berenbaum and Johnson, 2015)。本研究对以上 3 种酶的比活力进行测定和比较,结果显示 LC_{10} 剂量吡虫啉农药处理可以显著诱导 CYP450 和 CarE 激活,这与前人的研究结果一致 (孟丽峰, 2013)。孟丽峰 (2013) 发现饲喂不同浓度的吡虫啉农药,蜜蜂体内的 GST 的可激活浓度范围偏高 ($LC_{50} \sim LC_{90}$)。在本研究中也发现 GST 活性没出现显著变化,极有可能是由于试验选取的 LC_{10} 未达到激活阈值浓度。此外,本研究比较了暴露于两种不同温度环境下蜜蜂吡虫啉胁迫体内解毒酶活性的变化,发现在 25℃ 环境中蜜蜂体内 CYP450 的激活程度更为明显,表明在不同温度环境蜜蜂代谢外源毒素吡虫啉存在差异,且可能在蜂群最适温度环境中代谢效果更理想,这也可能是蜜蜂在孵化温度中死亡率增加的原因。乙酰胆碱酯酶是生物神经传导中的一种关键性酶,能降解突触之间的乙酰胆碱,终止神经递质对突触后膜的兴奋作用,保证神经信号在生物体内的正常传递 (Soreq and Seidman, 2001)。新烟碱类农药抑制细胞色素 P450 解毒酶活性 (Iwasa *et al.*, 2004),同时与病原体联合胁迫削弱蜜蜂的免疫,使蜜蜂易感病 (Vidau *et al.*, 2011; Pettis *et al.*, 2012)。吡虫啉是典型的新烟碱类神经性毒素,能够与乙酰胆碱竞争受体的结合部位,阻断昆虫的正常神经信号传递,使得神经系统崩溃,甚至导致昆虫死亡 (Matsuda *et al.*, 2001; Cresswell, 2011)。已有大量研究报道发现,吡虫啉农药会降低昆虫体内 AchE 的活性,也会使蜜蜂脑神经细胞凋亡 (吴艳艳等, 2003)。本研究结果也证实吡虫啉胁迫后蜜蜂脑部 AchE 的活性显著受到抑制,而且在 35℃ 环境中抑制更为显著,这可能会蜜蜂的学习记忆、导航定位等生理功能产生影响。

综上所述,环境因子会与农药产生协同效应进而加重农药的急性致死毒性,这为蜜蜂安全性保护和农药安全使用评价提供新的方向。然而,研究结果说明成年蜜蜂似乎更加适应 25℃ 环境,而不是发育温度 35℃,这是一个值得继续研究的课题。

参考文献 (References)

- Alix A, Cortesero AM, Nénon JP, *et al.* Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect [J].

- Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20 (11): 2530 – 2536.
- Axel D, Catherine A, Michel R. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, 78 (2): 83 – 92.
- Becher MA, Scharpenberg H, Moritz RFA. Pupal developmental temperature and behavioral specialization of honeybee workers (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory neural and Behavioral Physiology*, 2009, 195 (7): 673 – 679.
- Casteels-Josson KT, Capaci T, Casteels P, et al. Apidaecin multipetide precursor structure: A putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response [J]. *Embo Journal*, 1993, 12 (4): 1569 – 1578.
- Castle SJ, Byrne FJ, Bi JL, et al. Spatial and temporal distribution of imidacloprid and thiamethoxam in citrus and impact on *Homalodisca coagulata* populations [J]. *Pest Management Science*, 2010, 61 (1): 75 – 84.
- Chen SR, Cao L. Human beings should runderstand bees [J]. *Apiculture of China*, 2012, 18: 62 – 64. 陈恕仁, 曹磊. 人类应重新认识蜜蜂 [J]. *中国蜂业*, 2012, 18: 62 – 64
- Cresswell JE. A meta – analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20 (1): 149 – 157.
- Currie RW, Tahmasbi GH. The ability of high-and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions [J]. *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne de Zoologie*, 2008, 86 (9): 1059 – 1067.
- Dai PL, Zhou T, Wang Q. Effects of imidacloprid on learning performance of *Apis mellifera ligustica* [J]. *Agrochemicals*, 2013, 52 (7): 512 – 514. 代平礼, 周婷, 王强. 吡虫啉对意大利蜜蜂学习行为的影响 [J]. *农药*, 2013, 52 (7): 512 – 514
- Daniel N, Marcos A, Hylana CD. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33 (9): 2070 – 2075.
- Danihlík J, Aronstein K, Petřivalský M. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity: Physiology, biochemistry, and chemical ecology [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2015, 54 (2): 123 – 136.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15 (5): 645 – 656.
- Ferrandon DJ, Imler JL, Hetru C, et al. The drosophila systemic immune response: Sensing and signalling during bacterial and fungal infections [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7 (11): 862 – 874.
- Free JB. Insect pollination of crops [J]. *Quarterly Review of Biology*, 1970, 17 (3): 164 – 164 (1)
- Gallai N, Salles JM, Settele J, et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline [J]. *Ecological Economics*, 2009, 68 (3): 810 – 821.
- Groh CJ, Tautz J, Rössler W. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood – temperature control during pupal development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 2004, 101 (12): 4268 – 4273.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *Crop Protection*, 2004, 23 (5): 371 – 378.
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (7): 2897 – 2908.
- Jones JC, Helliwell P, Beekman M, et al. The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *Journal of Comparative Physiology A-neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 2005, 191 (12): 1121 – 1129.
- Kreissl S, Bicker G. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholinereceptor – like antigen in the brain of the honeybee [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 1989, 286 (1): 71 – 84.
- Lai K, Wang Q, Lan HH, et al. Research Progress on the Influence of Temperature on Bee Behavior [C]. Haikou: Proceedings of the 17th academic conference of bee feeding management committee of China apiculture society, 2012. 赖康, 王青, 蓝华辉, 等. 温度对蜜蜂行为影响研究进展 [C]. 北京: 中国养蜂学会蜜蜂饲养管理专业委员会第 17 次学术会议论文集, 2012
- Li Y. The Effect of Temperature on the Development of Honeybees Sealed Brood [C]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University Master Thesis, 2008. 李月. 温度对蜜蜂封盖子发育的影响 [D]. 福建: 福建农林大学硕士学位论文, 2008
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, et al. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, 22 (11): 573 – 580.
- Medrzycki P, Sgolastra F, Bortolotti L, et al. Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2010, 49 (1): 52 – 59.
- Meng LF. Effects of Imidacloprid on Activities of Detoxifying Enzymes and Development on *Apis mellifera* [C]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. 孟丽峰. 吡虫啉对蜜蜂解毒酶和生长发育的影响 [C]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2013
- Pettis JS, Vanengelsdorp D, Johnson J, et al. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema* [J]. *Naturwissenschaften*, 2012, 99 (2): 153 – 158.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2010, 25 (6): 345 – 353.
- Siegel AJ, Hui J, Johnson RN, et al. Honey bee workers as mobile insulating units [J]. *Insectes Sociaux*, 2005, 52 (3): 242 – 246.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, 2 (4): 294 – 302.
- Szentgyörgyi H, Czekońska K, Tofilski A. Honey bees are larger and live longer after developing at low temperature [J]. *Journal of Thermal*

- Biology*, 2018, 78: 219–226.
- Shi TF, Wang YF, Burton S, *et al.* Sublethal effects of thiamethoxam on immune related gene expression in honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2017, 54 (4): 576–582. 施腾飞, 王宇飞, Sawyer Burton, 等. 亚致死浓度噻虫嗪对西方蜜蜂免疫相关基因表达的影响 [J]. *应用昆虫学报*, 2017, 54 (4): 576–582]
- Tautz J, Maier S, Groh C, *et al.* Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India-Section A*, 2003, 100 (12): 7343–7347.
- Vandame R, Belzunces LP. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation [J]. *Neuroscience Letters*, 1998, 251 (1): 57–60.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, *et al.* Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae* [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (6): e21550.
- Wu YY, Zhou T, Wubie AJ, *et al.* Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee *Apis mellifera ligustica* brain induced by imidacloprid [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (2): 194–203. 吴艳艳, 周婷, Abebe Jenberie WUBIE, 等. 吡虫啉对成年意大利蜜蜂脑神经细胞致凋亡作用 [J]. *昆虫学报*, 2014, 57 (2): 194–203]
- Yang EC, Chang HC, Wu WY, *et al.* Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (1): e49472
- Yang S, Zhuang D, Wang ZW, *et al.* Study on foraging behavior of *Apis cerana* and *Apis mellifera* in warm winter [J]. *Journal of Bee*, 2010, 30 (5): 10–12. 杨爽, 庄迪, 汪正威, 等. 对暖冬期东西方蜜蜂采集行为的研究 [J]. *蜜蜂杂志*, 2010, 30 (5): 10–12]
- Zhou BF, Li Y, Zhu XJ, *et al.* The effect of temperature during sealed brood period on the vein of the honeybee forewing [J]. *Apiculture of China*, 2007, 58 (5): 5–8. 周冰峰, 李月, 朱翔杰, 等. 封盖期发育温度对蜜蜂前翅翅脉增加的影响 [J]. *中国蜂业*, 2007, 58 (5): 5–8]
- Zhang MH, Zhao P, Yan QX, *et al.* The market and environmental impact of the neonicotinoid insecticides [J]. *Agrochemicals*, 2012, 51 (12): 859–962. 张敏恒, 赵平, 严秋旭, 等. 新烟碱类杀虫剂市场与环境影响 [J]. *农药*, 2012, 12: 859–962]
- Zhou T, Song HL, Wang Q. Effects of imidacloprid on the distribution of nicotine acetylcholine receptors in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (11): 1258–1266. 周婷, 宋怀磊, 王强. 吡虫啉对意大利蜜蜂脑乙酰胆碱酯酶受体分布的影响 [J]. *昆虫学报*, 2013, 56 (11): 1258–1266]