



张学风, 林涛, 林小军, 瞿佳宝, 项前, 曾鑫年, 刘家莉. 章鱼胺、多巴胺对桔小实蝇嗅觉学习和记忆的差异性调控研究 [J]. 环境昆虫学报, 2025, 47 (1): 128-139. ZHANG Xue-Feng, LIN Tao, LIN Xiao-Jun, QU Jia-Bao, XIANG Qian, ZENG Xin-Nian, LIU Jia-Li. The differential regulation of octopamine and dopamine on olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2025, 47 (1): 128-139.

章鱼胺、多巴胺对桔小实蝇嗅觉学习和记忆的 差异性调控研究

张学风¹, 林涛², 林小军³, 瞿佳宝¹, 项前¹, 曾鑫年¹, 刘家莉^{1*}

(1. 华南农业大学植物保护学院, 广东省昆虫行为调控工程技术研究中心, 广州 510642;

2. 上饶师范学院生命科学学院, 江西上饶 334001; 3. 广州瑞丰生物科技有限公司, 广州 510642)

摘要: 章鱼胺 (Octopamine, OA) 和多巴胺 (Dopamine, DA) 作为普遍存在于昆虫体内的生物胺, 参与调控其学习和记忆行为。OA 以及 DA 通过与相应的章鱼胺受体 (Octopamine receptors, OARs) 或多巴胺受体 (Dopamine receptors, DARs) 专一性结合, 进而对昆虫的生理过程产生调控效果。本研究旨在通过药理干涉的方法来探索 OA 和 DA 对桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 嗅觉学习和记忆提取的差异性调控作用。结果表明: 在桔小实蝇的学习形成中, 注射 2 种 OARs 拮抗剂酚妥拉明、育亨宾可显著降低其奖赏性嗅觉学习, 但不影响其惩罚性嗅觉学习, 且两种拮抗剂的效应受到注射浓度和时间的影响。注射 2 种 DARs 拮抗剂 SCH23390 和螺哌隆可显著降低其惩罚性嗅觉学习, 但不影响其奖赏性嗅觉学习, 2 种拮抗剂的效果主要受到注射浓度的影响。在桔小实蝇的记忆提取中, 发现注射 2 种 OARs 拮抗剂可显著降低桔小实蝇奖赏性记忆的提取能力, 但不影响其惩罚性记忆的提取, 酚妥拉明的效果受到注射时间的影响, 而育亨宾的效果受到注射浓度的影响。注射 DARs 可同时降低桔小实蝇奖赏性和惩罚性记忆的提取, 其中注射 SCH23390 主要降低惩罚性嗅觉记忆的提取能力, 而螺哌隆主要降低奖赏性嗅觉记忆的提取能力。以上结果显示, OA 和 DA 在调控桔小实蝇的嗅觉学习和记忆提取中存在差异性, 研究结果可为靶向昆虫学习的行为调节剂提供理论参考。

关键词: 桔小实蝇; 章鱼胺; 多巴胺; 受体; 嗅觉学习与记忆

中图分类号: Q968.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2025) 01-0128-12

The differential regulation of octopamine and dopamine on olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*

ZHANG Xue-Feng¹, LIN Tao², LIN Xiao-Jun³, QU Jia-Bao¹, XIANG Qian¹, ZENG Xin-Nian¹, LIU Jia-Li^{1*}

(1. Guangdong Engineering Research Center for Insect Behavior Regulation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Life Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, Jiangxi Province, China; 3. Guangzhou Ruifeng Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: Octopamine (OA) and Dopamine (DA) are biological amines commonly found in insects and are involved in regulating learning and memory behaviors. OA and DA regulate insect physiological processes by binding specifically to their corresponding receptors, Octopamine receptors (OARs) and Dopamine receptors (DARs), respectively. The purpose of this study was to explore the differential regulatory effects of

基金项目: 国家自然科学基金 (32072486); 国家重点研发计划 (2021YFD1000503-03)

作者简介: 张学风, 男, 硕士研究生, 主要从事昆虫行为调控研究工作, E-mail: 1176596296@qq.com

*通讯作者 Author for correspondence: 刘家莉, 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫行为调控, E-mail: shirley4461@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-08-03; 修回日期 Revision received: 2024-10-22; 接受日期 Accepted: 2024-10-25

OA and DA on olfactory learning and memory retrieval in *Bactrocera dorsalis* through pharmacological intervention. The results showed that the injection of two OAR antagonists, phentolamine and yohimbine, significantly reduced reward-based olfactory learning in *B. dorsalis* but did not affect punishment-based olfactory learning. The effects of these antagonists were influenced by both injection concentration and time. In contrast, the injection of two DAR antagonists, SCH23390 and spiperone, significantly reduced punishment-based olfactory learning but had no effect on reward-based olfactory learning. The effects of these DAR antagonists were primarily influenced by injection concentration. In memory retrieval experiments, the injection of OAR antagonists significantly impaired the retrieval of reward-based memories but did not affect punishment-based memories. The effect of phentolamine was dependent on injection time, while the effect of yohimbine was dependent on injection concentration. On the other hand, the injection of DAR antagonists impaired the retrieval of both reward and punishment memories. Specifically, SCH23390 mainly reduced the retrieval of punishment-based olfactory memories, while spiperone primarily reduced the retrieval of reward-based olfactory memories. These results indicate that OA and DA play distinct roles in regulating olfactory learning and memory retrieval in *B. dorsalis*. The findings provide a theoretical foundation for developing behavior regulators targeting insect learning processes.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; octopamine; dopamine; receptor; olfactory learning and memory

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 属双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae 寡鬃实蝇亚科 Dacinae 果实蝇属 *Bactrocera*, 是我国二类进境检疫性害虫 (Chen *et al.*, 2008; 邢楚明等, 2017; 郑传伟等, 2018)。桔小实蝇寄主范围广, 主要以幼虫蛀食果肉进行危害, 常常导致果实提前腐烂、落果, 给种植农户造成严重的经济损失。基于其为害特性, 化学药剂对于成虫及幼虫的防治效果欠佳, 且桔小实蝇对药剂的抗性也存在增强趋势 (Shelly, 1994; 付佑胜等, 2006), 开发靶向其取食行为的行为调节剂或可成为一种新的防控策略。

昆虫强大的学习记忆能力在其后天行为的形成中起到了至关重要的作用, 如觅食、躲避天敌、攻击性、社会交往和交配行为等 (Alloway, 2003), 帮助它们更好地适应不断变化的环境, 减少不必要的代价和能量的消耗, 从而趋利避害 (于佳星, 2011)。昆虫学习和记忆的能力受脑内包括多巴胺 (DA)、章鱼胺 (OA) 在内的等多种生物胺的调控, 例如在果蝇 *Drosophila* 中, OA 与 DA 已被证实能影响其学习和记忆能力 (Schwaerzel *et al.*, 2003)。

OA 是首先在章鱼体内发现的一种生物胺, 它在节肢动物和少数腹足动物中作为一种神经递质和激素被充分研究。OA 在神经系统和外周神经系

统中均有存在, 它的已知作用包括影响感觉输入、脱敏、学习和记忆及对昆虫“情绪”的调节 (Roeder, 2005)。OA 主要通过与其特异性受体 (OARs) 结合从而影响胞内第二信使环腺苷酸 (cAMP) 或钙离子 (Ca^{2+}) 的水平来发挥作用 (Blenau *et al.*, 2001)。在昆虫体内, 已知的 OARs 大致可分为三大类: Oct α Rs, Oct β Rs 和 TyrRs, 这些受体有着不同的作用机理, 调控着昆虫的行为 (Evans *et al.*, 2005)。在昆虫中, 药理拮抗以及基因突变的方法常被应用于对胺类功能的研究。如当通过药理拮抗的方式, 往双斑蟋 *Gryllus bimaculatus* 血淋巴中注射 OARs 拮抗剂米安色林或依匹斯汀时, 可影响其食欲学习 (Unoki *et al.*, 2005)。而 Agarwal 等人 (2011) 通过药理研究发现, OA 加强了蜜蜂 *Apoidea* 在学习中的惩罚效应。在对果蝇的研究中, 通过基因突变的方式, 发现缺乏 OA 的突变体在厌恶型嗅觉学习中出现障碍 (Iliadi *et al.*, 2017)。

在昆虫体内, DA 也通过与特定的多巴胺受体 (DARs) 结合, 参与调控昆虫的多种生理反应和行为过程。昆虫的 DARs 大致可分为两大类: D1-like DARs 和 D2-like DARs (Mustard *et al.*, 2010), 其中 D1-like DARs 包含有 2 中亚型, 分别为 DOP1 和 DOP2, DOP3 则为 D2-like DARs。DOP1 以及

DOP3 仅能偶联细胞内 cAMP 的上升, 而 DOP2 不仅能引起细胞内 cAMP 的上升, 还可以偶联细胞内 Ca^{2+} 的释放 (Himmelreich *et al.*, 2017)。近年来通过基因突变的方法, 证明果蝇具有反本能学习的能力, 而这种能力受到上述两大类受体的调控 (Sun *et al.*, 2020)。昆虫中的 DA 与厌恶学习密切相关, 例如在双斑蟋中, DA 通过与 D1-like DARs DOP1 结合调控其厌恶学习 (Awata *et al.*, 2015)。在蜜蜂中, DARs 还可参与增强食欲记忆 (Klappenbach *et al.*, 2013)。

在不同的昆虫中, OA 与 DA 信号介导的联想学习机制存在差异, Iliadi 等人 (2017) 发现, 果蝇的厌恶联想嗅觉学习依赖于 OA 信号转导, 而 Mizunami 等 (2015) 的研究发现在双斑蟋中 OA 仅介导奖赏性学习。在本课题组的前期研究中初步发现 DA 和 OA 对桔小实蝇的学习和记忆的调控可能不同于目前在果蝇和双斑蟋上的调控方式, 本研究通过选用不同于前期研究的 OARs 拮抗剂酚妥拉明、育亨宾以及 DA D1 型受体拮抗剂 SCH23390 和 D2 型受体拮抗剂螺哌隆来进一步探究两类生物胺对桔小实蝇嗅觉学习和记忆的调控方式, 参与调控的昆虫学习以及记忆类型及相关受体的类型, 通过在不同时间注射不同浓度的拮抗剂来分析各拮抗剂产生效果是否存在时间和浓度效应, 本研究结果为开发基于生物胺受体的新型行为调节剂提供了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试的桔小实蝇种群由本实验室在野外采集, 经过数代繁殖培育获得的室内种群。室内饲养的条件为: 温度 $26\sim 28^{\circ}\text{C}$; 相对湿度 $60\%\sim 80\%$; 光照条件 L : D = 14 h : 10 h。为了避免性别因素的影响, 本试验只使用未交配雄性桔小实蝇成虫为测试对象。在羽化后 2~3 d, 将雄虫从饲养笼 ($30\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 30\text{ cm}$) 中分离出来单独饲养, 10~12 日龄作为本试验的供试虫源。

供试仪器设备: (1) 气泵 (日本 TEION, 5MQ-JPZ0381); (2) 试虫固定管, 参考陈小燕等 (2015) 的方法自制 ADDIN; (3) 流量计 (常州双诚仪表, LZB-10WB); (4) 移液器 (德国

Eppendorf, $2.5\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$); (5) 防水秤 (常熟市双杰测试仪器厂, E3KS 3 kg/0.5 g); (6) 微量注射器, 自制, 其制作方法如下: 首先将毛细玻璃管 ($\Phi 10\text{ mm}$) 在酒精灯火焰上烧至软化, 随后迅速拉断, 则断面处即可形成极细尖端, 即为注射用的玻璃电极; 然后把该玻璃电极未拉制的一端用热熔胶固定于 $10\ \mu\text{L}$ 的枪头处待用; 注射时只需将制备好的枪头套在 $2.5\ \mu\text{L}$ 移液枪上即可。

供试药剂: (1) 甲基丁香酚 (Methyl Eugenol, 简称 ME), 购自东京化成工业株式会社; (2) N, N-二乙基间甲苯甲酰胺 (DEET), 购自上海梯希爱化成工业发展有限公司; (3) 甜橙精油 (广州嘉媚乐天然用品连锁公司); (4) 蔗糖 (分析纯 AR, 天津市大茂化学试剂厂); (5) 酚妥拉明盐酸盐 (Phentolamine hydrochloride)、育亨宾盐酸盐 (Yohimbine hydrochloride)、SCH23390 盐酸盐 (SCH23390 hydrochloride)、螺哌隆盐酸盐 (Spiperone hydrochloride) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; (6) 甲醇、氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、氢氧化钠等其他分析纯的常用化学试剂均购自江苏强盛结构化学股份有限公司。

1.2 行为试验方法

从单独饲养的雄虫种群中随机抓取 20~30 头虫放入定制养虫笼 ($30\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 30\text{ cm}$) 中进行 12 h 的饥饿处理, 期间只提供水, 不提供饲料, 以此来增强其对蔗糖的嗜好。选择饥饿处理后, 并对甜橙精油没有伸喙反应的试虫用于奖赏性训练及学习和记忆的测定。针对惩罚性训练试验, 试虫无需饥饿, 选用对 ME 存在伸喙反应的试虫作为惩罚训练中的测试对象。

训练前 1 h, 将试虫固定于一塑料管 (长 3.5 cm, 直径 8 mm) 中, 确保试虫的头与前足可在外自由活动, 然后将其转移至训练装置旁, 以适应训练环境。同时, 将 $100\ \mu\text{L}$ 甜橙精油或 1% ME (溶于甲醇) 滴至 $4\text{ cm} \times 4\text{ cm}$ “W” 型的滤纸上, 待 ME 溶液中甲醇挥发 5 min 后备用。空气由气泵产生并被输送至含活性炭的瓶中去掉空气中的杂质, 随后进入含蒸馏水的瓶中, 使气流具有一定的湿度。通过气阀调节气流至 $2\text{ L}/\text{min}$, 随后气流进入装有气味源的平底烧瓶中, 并混入气味源以提供嗅觉训练中的气味刺激。训练时, 将出气管末端对准试虫头部约 1 cm 处, 使其感受到气味源。在试虫

背后设有通风罩以便将训练时产生的气体及时排出。另外,每次训练只用一张滤纸,保证气味源的持续均匀。

参照陈小燕等(2015)报道的方法,利用其已建立的经典条件反射训练法对桔小实蝇进行训练。以甜橙精油或ME作为条件刺激联合以1 mol/L蔗糖溶液或0.6% DEET-10%蔗糖溶液(0.6% DEET+10%蔗糖溶于水中)作为非条件刺激对试虫进行奖赏性或惩罚性嗅觉训练。训练时,将试虫放于训练位置5 s,然后给予6 s的条件气味刺激,并记录前3 s伸喙情况,后续3 s同时给予味觉非条件刺激。试验中如对气味不表现出伸喙反应,则排除该个体。每头试虫共训练5次,训练间隔时间为10 min。训练结束后10 min给予试虫条件刺激3 s,并记录其伸喙反应情况,此即为5次训练后桔小实蝇的嗅觉学习效果。训练结束后将桔小实蝇释放至原饲养笼中,期间提供蒸馏水供其取食,并在6 h后放入人工饲料供试虫取食30 min。24 h后,重新测试试虫对条件气味的伸喙反应,分析其24 h的记忆提取能力。在奖赏性训练中,若试虫对甜橙气味学习成功,则其会对该气味刺激表现出伸喙反应。而在惩罚性训练中,若试虫被成功训练厌恶ME,则其在接触该气味刺激时会表现出伸喙反射减弱或消失,整体的试虫的伸喙反射比率降低。

1.3 拮抗剂注射方法

在学习训练或记忆测试前,将桔小实蝇置于冰上麻醉。注射时,将试虫置于体视镜下,用自制的微量注射器将拮抗剂注入试虫腹腔,试验组每头试虫注射1 μ L高浓度(OARs拮抗剂浓度为1 mM, DARs拮抗剂浓度为500 μ M)或低浓度(OARs拮抗剂浓度为100 μ M, DARs拮抗剂浓度为5 μ M)的拮抗剂,对照组注射1 μ L的生理盐水,考虑到桔小实蝇对拮抗剂的代谢,注射时间预设于试验前30 min和60 min两个不同的时间段。上述操作均在10 min内完成。本试验用到的拮抗剂有:OARs拮抗剂酚妥拉明、育亨宾以及DARs拮抗剂螺哌隆、SCH23390。以上拮抗剂已在不同昆虫中被证实有较好的拮抗作用(Lazareno *et al.*, 1982; Rahmani *et al.*, 1987; Kokay *et al.*, 1998;

Cohen *et al.*, 2002)。拮抗剂的注射完成后,将试虫重新固定在试虫管中并置于试验台上使其适应试验所在环境条件,注射30 min或60 min后开展训练和测试。

1.4 统计方法

伸喙反应率为产生伸喙反应的个体占测试总试虫数的百分率。采用卡方检验分析不同组间伸喙反应率的差异,若组间有差异,则采用Z检验分进行事后两两比较。学习表现力指每头试虫在每次训练后的伸喙反应,其中伸喙则记为1,不伸喙则记为0,试虫的伸喙次数介于0~4(奖赏性学习)或0~5(惩罚性学习)。统计试虫5次经过奖赏性或惩罚性训练后的伸喙反应次数,采用曼-惠特尼U检验法(Mann-Whitney U-test)或克鲁斯凯-沃利斯H检验法(Kruskal-Wallis H)比较组间学习表现力,并采用邓肯检验进行事后多重比较。所有数据均使用SPSS 17.0进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 酚妥拉明对桔小实蝇奖赏性嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的奖赏性学习训练中,训练前30 min注射酚妥拉明可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率(图1-a, Kruskal-Wallis, $H=7.917$, $df=2$, $P<0.05$),特别是1 mM时,其伸喙反应率显著低于对照组(Duncan'test, $P<0.05$)。而训练前60 min注射酚妥拉明则对桔小实蝇的伸喙反应率无显著影响(图1-b, Kruskal-Wallis, $H=1.491$, $df=2$, $P=0.474$)。在奖赏性记忆提取测试中,测试前30 min注射酚妥拉明可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率(图1-c, $\chi^2=8.759$, $P<0.05$),事后Z检验表明两种浓度的酚妥拉明均可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率(图1-c, 100 μ M: $P<0.01$; 1 mM: $P<0.05$)。在记忆测试前60 min注射酚妥拉明不会显著影响桔小实蝇的伸喙反应率(图1-d, $\chi^2=1.995$, $P=0.369$)。上述结果说明,短时间内(30 min)注射OARS拮抗剂酚妥拉明会将降低桔小实蝇的学习表现和记忆提取能力,并且高浓度对学习表现的影响更大。

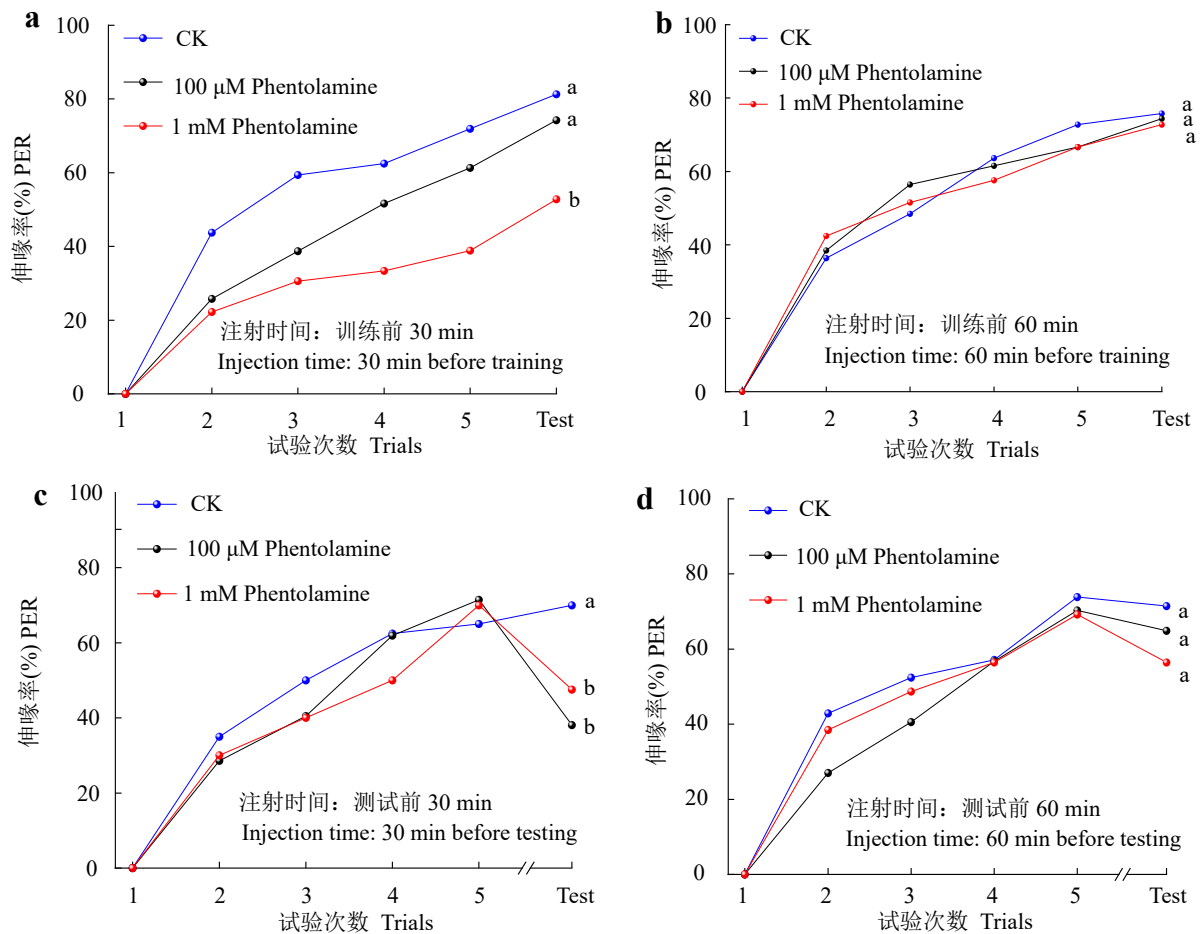


图1 注射章鱼胺拮抗剂酚妥拉明对桔小实蝇奖赏性嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 1 Effects of injection of the octopamine antagonist phentolamine on rewarding olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*

注: CK组为对照组,注射溶液为生理盐水;100 μM 酚妥拉明和1 mM 酚妥拉明组均为试验组。嗅觉学习训练为训练前30 min (a) 或60 min (b) 注射生理盐水或酚妥拉明,记忆测试则在第5次训练后24 h,测试前30 min (c) 或60 min (d) 进行注射。其中每组试虫数量 $n > 40$ 。Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 100 μM phentolamine group and 1 mM phentolamine group were experimental groups. The olfactory learning training was administered by injection of saline or phentolamine 30 min (a) or 60 min (b) before training, and the memory test was administered 24 h after the fifth training and 30 min (c) or 60 min (d) before testing. The number of insects in each group was $n > 40$.

2.2 酚妥拉明对桔小实蝇惩罚性嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的惩罚性训练中,训练前30 min 或60 min 注射酚妥拉明对桔小实蝇的伸喙反应率均无显著性的影响,其伸喙反应率不存在显著差异(图2-a, Kruskal-Wallis, $H=0.122$, $df=2$, $P=0.941$; 图2-b, Kruskal-Wallis, $H=0.752$, $df=2$, $P=0.687$)。在记忆提取测试中,无论是训练后

30 min 还是60 min 注射酚妥拉明,桔小实蝇的伸喙反应率与对照组均无显著差异(图2-c, 100 μM : $\chi^2=0.017$, $P=0.897$; 1 mM: $\chi^2=0.049$, $P=0.824$; 图2-d: 100 μM : $\chi^2=0.062$, $P=0.803$; 1 mM: $\chi^2=0.242$, $P=0.623$)。该结果表明酚妥拉明这一OARs拮抗剂对桔小实蝇的惩罚性学习和记忆提取不产生影响。

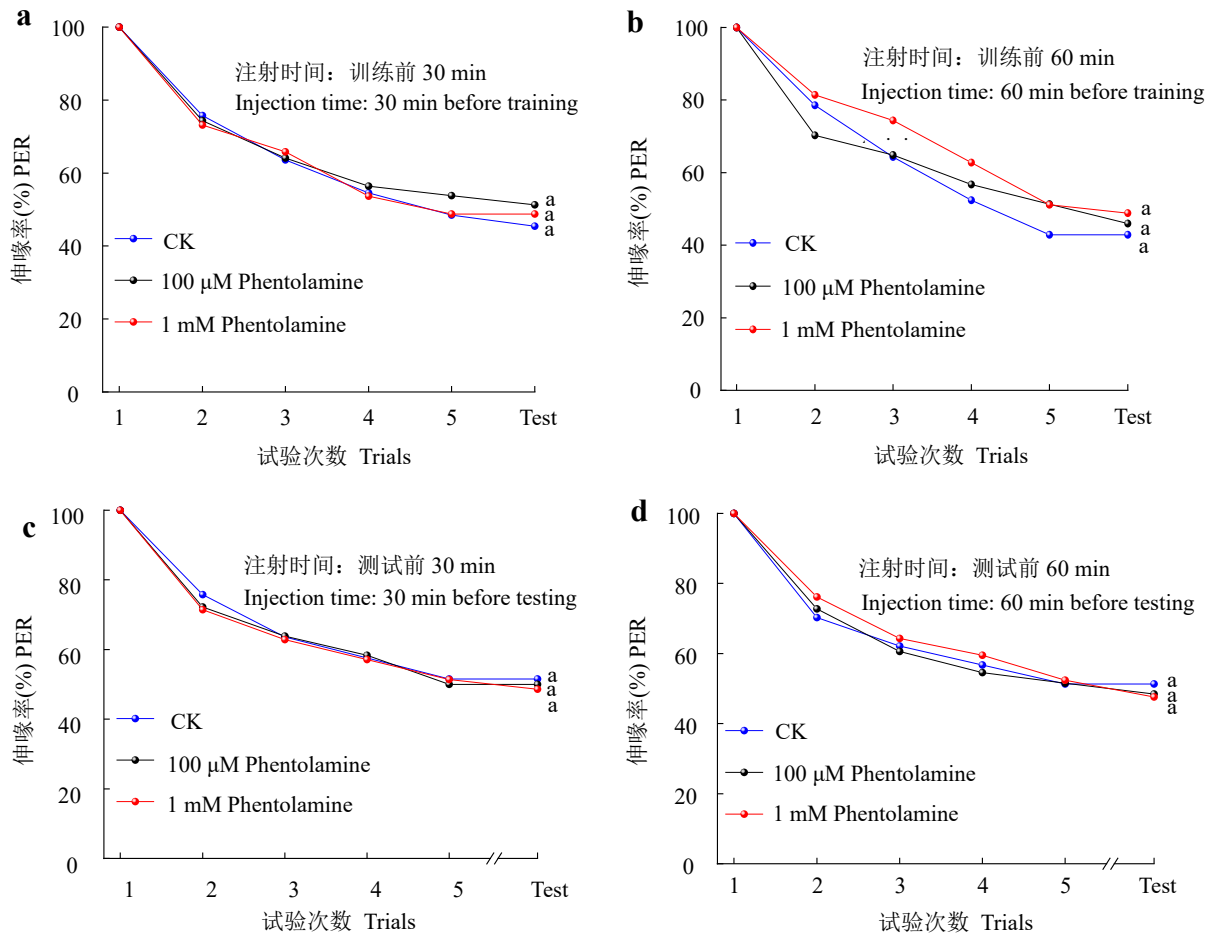


图2 注射章鱼胺拮抗剂酚妥拉明对桔小实蝇惩罚性嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 2 Effects of injection of the octopamine antagonist phentolamine on punitive olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*. Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 100 μM phentolamine group and 1 mM phentolamine group were experimental groups. The olfactory learning training was administered by injection of saline or phentolamine 30 minutes (a) or 60 minutes (b) before training, and the memory test was administered 24 hours after the fifth training and 30 minutes (c) or 60 minutes (d) before the test. The number of insects in each group was $n > 40$.

2.3 育亨宾对桔小实蝇奖赏性嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的奖赏性学习训练中, 训练前 30 min 注射育亨宾可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率 (Kruskal-Wallis, $H=6.218$, $df=2$, $P < 0.05$, 图 3-a), 特别是浓度为 1 mM 时, 对桔小实蝇的学习表现力影响最强, 伸喙反应率显著低于对照组 (Duncan'test, $P < 0.05$)。训练前 60 min 注射育亨宾, 两种测试浓度均不会影响桔小实蝇的伸喙反应率 (Kruskal-Wallis, $H=0.768$, $df=2$, $P=0.681$,

图 3-b); 在奖赏性记忆提取测试中, 在测试前 30 min 前注射育亨宾可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率 ($\chi^2=7.403$, $df=2$, $P < 0.05$, 图 3-c), 通过事后 Z 检验发现, 仅在注射 1 mM 育亨宾可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率 ($P < 0.05$, 图 3-c)。类似的在测试前 60 min 注射育亨宾亦会降低桔小实蝇伸喙反射率 (图 3-d, $\chi^2=7.081$, $df=2$, $P < 0.05$), 并且高浓度 (1 mM) 的拮抗剂显著降低了伸喙反应率 ($P < 0.05$)。

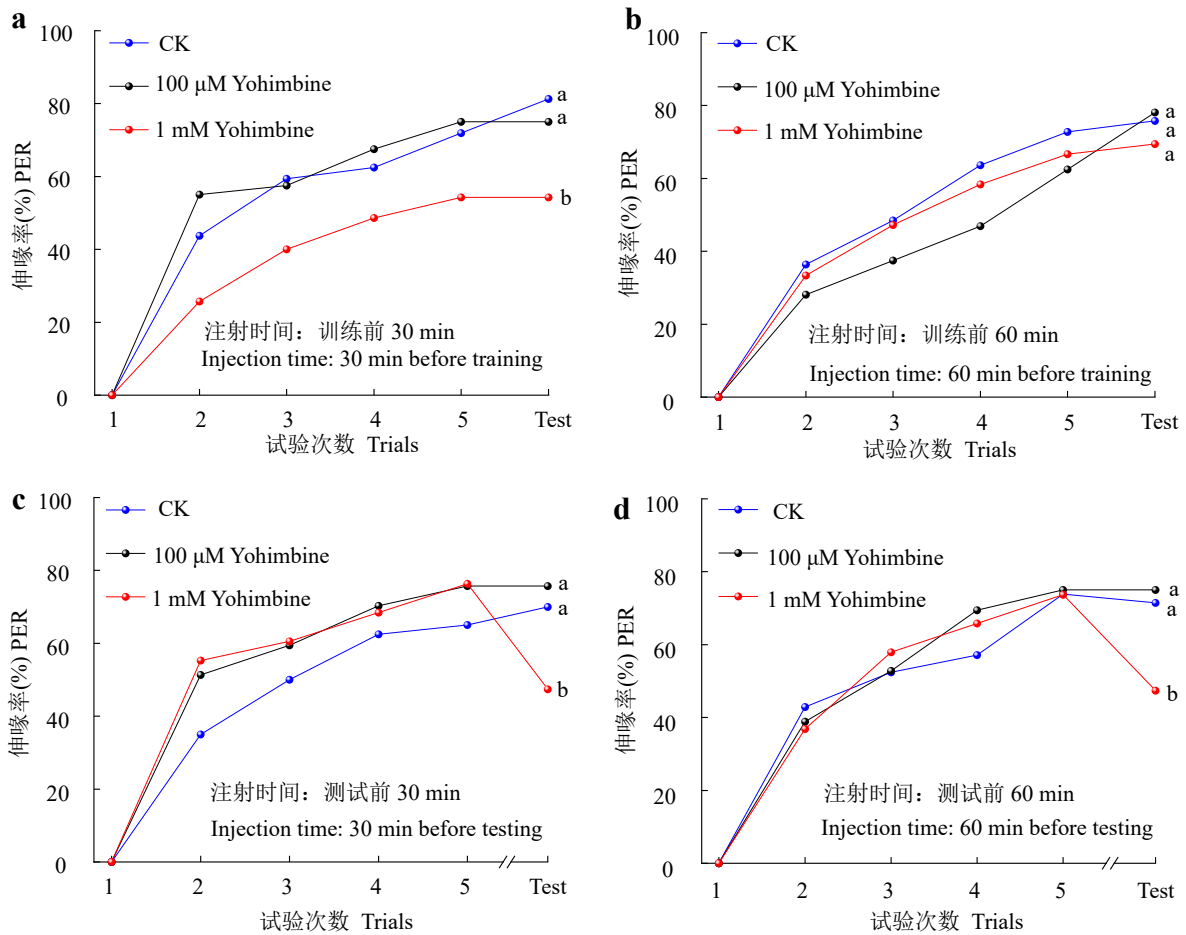


图3 注射章鱼胺拮抗剂育亨宾对桔小实蝇的奖赏性嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 3 Effects of injection of the octopamine antagonist Yohimbine on rewarding olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*
 注: CK组为对照组, 注射溶液为生理盐水; 100 μM 育亨宾和1 mM 育亨宾组均为试验组。嗅觉学习训练为训练前30 min (a) 或60 min (b) 注射生理盐水或育亨宾, 记忆测试则第5次训练后24 h, 测试前30 min (c) 或60 min (d) 进行注射。其中每组试虫数量 $n > 40$ 。Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 100 μM yohimbine group and 1 mM yohimbine group were experimental groups. The olfactory learning training was administered with saline or yohimbine 30 minutes (a) or 60 minutes (b) before training, and the memory test was administered 24 hours after the fifth training and 30 minutes (c) or 60 minutes (d) before testing. The number of insects in each group was $n > 40$.

2.4 育亨宾对桔小实蝇惩罚性嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的惩罚性训练中, 在训练前30 min 或60 min 注射育亨宾对桔小实蝇的伸喙反应率均无显著性的影响, 其伸喙反应率不存在显著差异 (图4-a, Kruskal-Wallis, $H=0.122$, $df=2$, $P=0.941$; 图4-b, Kruskal-Wallis, $H=0.752$, $df=2$, $P=0.687$)。在记忆提取测试中, 无论是测试前30 min 还是60 min 注射育亨宾, 桔小实蝇的伸喙反应率与对照组均无显著差异

(图4-c, 100 μM : $\chi^2=0.016$, $P=0.900$; 1 mM: $\chi^2=0.059$, $P=0.808$; 图4-d: 100 μM : $\chi^2=0.057$, $P=0.811$; 1 mM: $\chi^2=0.110$, $P=0.741$)。结果表明注射育亨宾这一OARS拮抗剂对桔小实蝇的惩罚性学习和记忆提取不产生影响。

2.5 螺哌隆对桔小实蝇嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的奖赏性训练中, 训练前30 min 注射两种浓度的螺哌隆均不影响桔小实蝇的伸喙反应率 (图5-a, Kruskal-Wallis test, $H=0.312$, $df=2$, $P=0.856$)。在记忆测试中, 测试前30 min 注

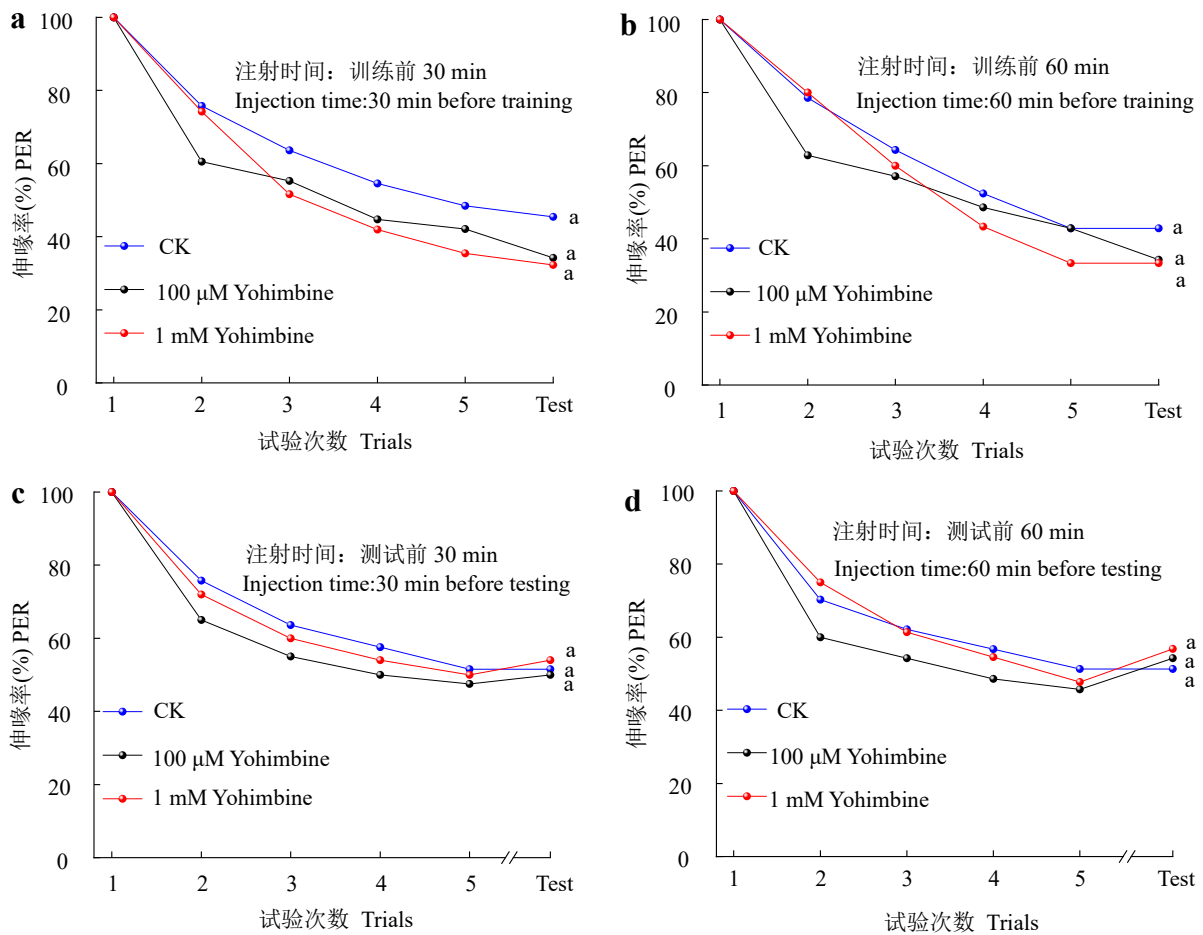


图4 注射章鱼胺拮抗剂育亨宾对桔小实蝇的惩罚性嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 4 Effects of injection of the octopamine antagonist phenolamine on punitive olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*. Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 100 μM yohimbine (a) and 1 mM yohimbine (b) groups were experimental groups. The olfactory learning training was administered with saline or yohimbine injection 30 minutes (c) or 60 minutes (d) before training, and the memory test was administered 24 hours after the fifth training and 30 minutes or 60 minutes before the test. The number of insects in each group was $n > 40$.

射螺哌隆可降低影响桔小实蝇的伸喙反应率(图5-b, $\chi^2=6.094$, $df=2$, $P < 0.05$), 通过事后Z检验发现, 注射两种浓度的螺哌隆均可显著降低桔小实蝇的伸喙反应率(图5-b, $5 \mu\text{M}$: $P < 0.05$; $100 \mu\text{M}$: $P < 0.05$)。在惩罚性训练中, 训练前30 min注射螺哌隆可显著升高桔小实蝇的伸喙反应率(图5-c, Kruskal-Wallis test, $H=9.630$, $df=2$, $P < 0.05$), 通过事后检验发现, 注射两种浓度的螺哌隆均可显著升高桔小实蝇的伸喙反应率(图5-c, Duncan's test, $5 \mu\text{M}$: $P < 0.05$; $100 \mu\text{M}$: $P < 0.05$)。在记忆提取测试中, 测试前30 min注射螺哌隆不影响桔小实蝇的伸喙反

应率(图5-d, $\chi^2=1.856$, $df=2$, $P=0.395$)。

2.6 SCH23390对桔小实蝇嗅觉学习及记忆提取的影响

在对桔小实蝇的奖赏性训练中, 训练前30 min注射两种浓度的SCH23390均不影响桔小实蝇的学习表现力(图6-a, Kruskal-Wallis test, $H=0.750$, $df=2$, $P=0.687$)。且在奖赏记忆测试中, 测试前30 min前注射SCH23390, 处理组伸喙反应率与对照组不存在差异(图6-b, $\chi^2=3.732$, $P=0.155$)。在惩罚性训练中, 训练前30 min注射SCH23390可显著影响桔小实蝇的嗅觉学习表现力(图6-c,

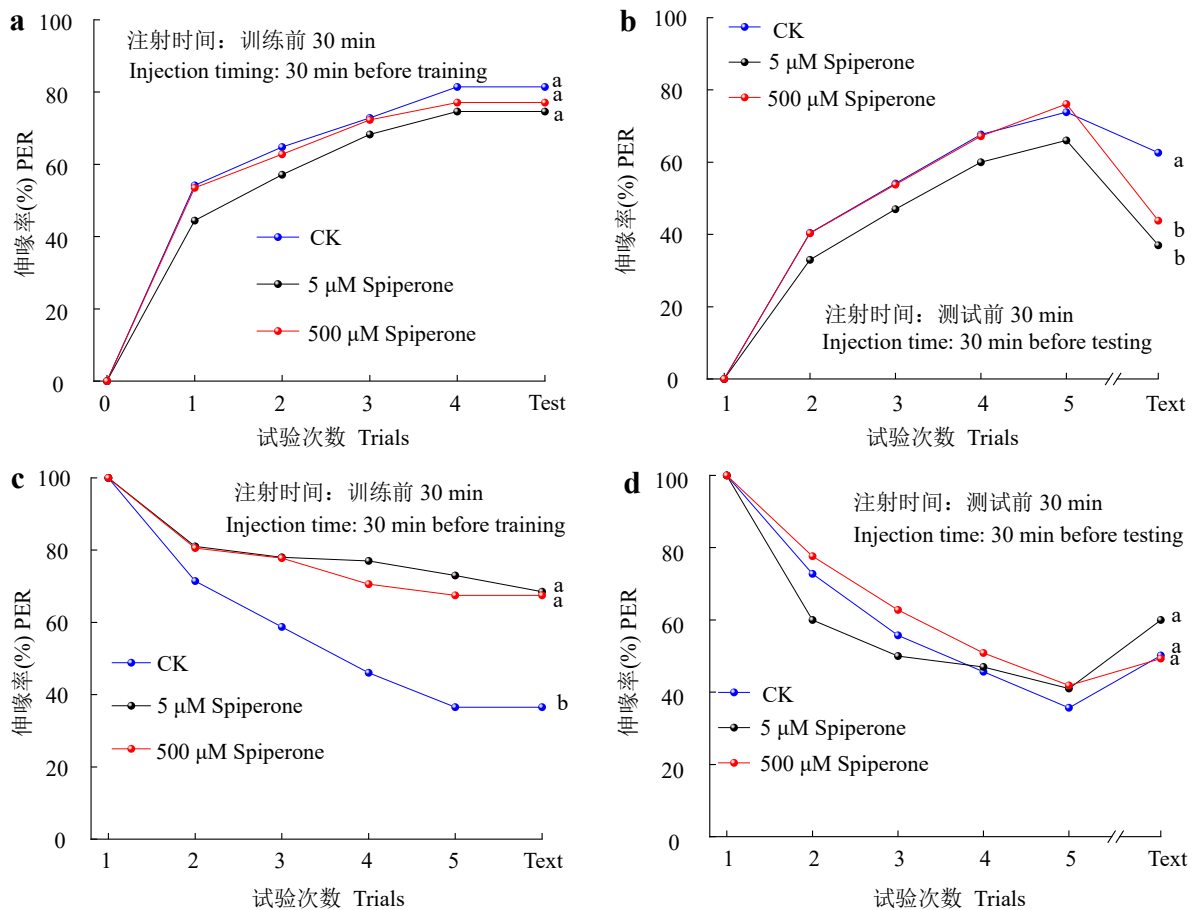


图5 注射多巴胺拮抗剂螺哌隆对桔小实蝇嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 5 Effects of injection of the dopamine antagonist spiperone on olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*

注: CK组为对照组,注射溶液为生理盐水;5 μM螺哌隆和500 μM螺哌隆组均为试验组。嗅觉学习训练为奖赏性(a)和惩罚性(c)训练前30 min注射生理盐水或螺哌隆,记忆测试则在第5次训练后24 h,奖赏性记忆(b)和惩罚性记忆(d)测试前30 min进行注射。其中每组试虫数量n>40。Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 5 μM spiperone and 500 μM spiperone groups were experimental groups. In olfactory learning training, saline solution and spiperone was injected 30 min before rewarding training (a) and punitive training (c), and the memory test was administered 24 h after the fifth training session and drugs was injected 30 min before reward (b) and punitive (d) memory test. The number of insects in each group was n>40.

Kruskal-Wallis test, $H=7.192$, $df=2$, $P<0.05$), 事后检验发现仅在药剂浓度为5 μM时,桔小实蝇的惩罚性学习表现力显著低于对照组(图6-c, Duncan'test, $P<0.05$)。在惩罚记忆测试中,测试前30 min注射SCH23390可显著提高桔小实蝇的伸喙反射率(图6-d, $\chi^2=4.017$, $df=2$, $P<0.05$),通过事后Z检验发现,注射两种浓度的SCH23390后,处理组桔小实蝇的伸喙反应率均显著高于对照组(图6-d, 5 μM: $P<0.05$; 100 μM: $P<0.05$)。

3 结论与讨论

本研究通过神经药理学手段,通过体外显微

注射DARs和OARs拮抗剂的方法结合经典嗅觉奖赏性和惩罚性联想学习范式来探究两种生物胺对桔小实蝇嗅觉学习以及记忆提取的具体调控作用。研究表明注射酚妥拉明和育亨宾两种OARs拮抗剂可影响桔小实蝇奖赏性嗅觉学习以及记忆的提取,但不会影响其惩罚性嗅觉学习以及记忆的提取。而注射SCH23390和螺哌隆两种DARs拮抗剂可显著影响桔小实蝇的惩罚性嗅觉学习但不影响其奖赏性嗅觉学习。两种拮抗剂可分别影响桔小实蝇的惩罚性记忆提取和奖赏性记忆提取。

OA对于昆虫学习与记忆的调控在物种间相对比较一致,通过药理干涉的方法注射OARs拮抗剂米安色林,发现可影响蜜蜂、双斑蟋等昆虫的奖

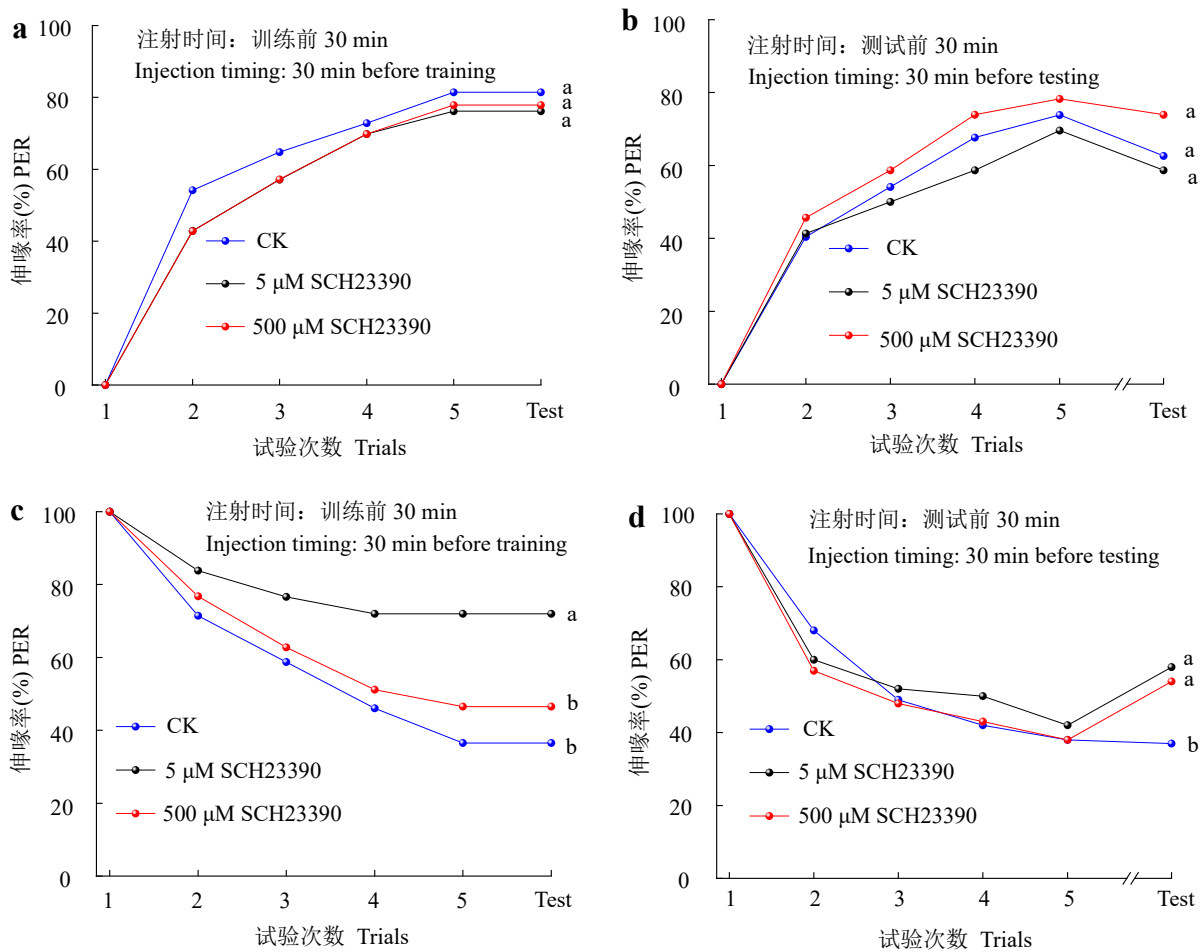


图6 注射多巴胺拮抗剂23390对桔小实蝇嗅觉学习和记忆的影响

Fig. 6 Effects of injection of the dopamine antagonist SCH23390 on olfactory learning and memory in *Bactrocera dorsalis*

注: CK组为对照组, 注射溶液为生理盐水; 5 μM SCH23390和500 μM SCH23390组均为试验组。嗅觉学习训练为奖赏性(a)和惩罚性(c)训练前30 min注射生理盐水或SCH23390, 记忆测试则在第5次训练后24 h, 奖赏性记忆(b)和惩罚性记忆(d)测试前30 min进行注射。其中每组试虫数量 $n > 40$ 。Note: CK group was the control group, and the injection solution was normal saline. 5 μM SCH23390 and 500 μM SCH23390 groups were experimental groups. In olfactory learning training, saline solution and SCH23390 was injected 30 min before rewarding training (a) and punitive training (c), and the memory test was administered 24 h after the fifth training session and drugs was injected 30 min before reward (b) and punitive (d) memory test. The number of insects in each group was $n > 40$.

赏性嗅觉学习以及记忆的提取 (Scheiner *et al.*, 2002; Unoki *et al.*, 2005)。本研究在前期研究中也发现注射OARs拮抗剂米安色林和依匹斯汀可显著影响桔小实蝇的奖赏性嗅觉学习以及记忆的提取 (于金鑫, 2020)。但值得注意的是通过体外转染细胞的方法发现米安色林和依匹斯汀还可作用于DARs (Beggs *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017)。此外, 米安色林也还可作用于昆虫的五羟色胺受体 (Thamm *et al.*, 2010; Blenau *et al.*, 2017)。本研究通过注射酚妥拉明和育亨宾两种在其它昆虫中确定为OARs拮抗剂的药剂也得到了类似前期注

射米安色林和依匹斯汀的结果。在前期研究以及本研究中所使用的OARs拮抗剂的特异性可能有待进一步验证, 但在前期研究和本研究观察到不同类型的拮抗剂具有相似的效果, 表明OA参与调控昆虫的奖赏性嗅觉学习以及记忆提取。本研究还发现在奖赏性嗅觉学习中酚妥拉明和育亨宾需要较高的浓度 (1 mM) 和较短的注射间隔 (30 min) 才能发挥拮抗作用, 而在奖赏性记忆提取中酚妥拉明的起效浓度可低至100 μM , 而育亨宾的起效时间可延长至60 min, 两种药剂发挥作用需要的浓度和时间在学习的两种阶段存在的差异也可能

预示着在奖赏性嗅觉学习以及记忆提取的两个过程中参与的生物胺受体不同。

DA对于生物体学习与记忆的调控存在明显的种间差异。在人及动物中,DA被证明主要传输奖赏性信号(Barron *et al.*, 2010)。目前在果蝇的研究中发现DA可同时调控奖赏性和惩罚性嗅觉学习和记忆,而在双斑蟋的研究中研究者提出DA仅参与调控昆虫的惩罚性嗅觉学习和记忆。因在两种昆虫上的研究方法有差异,一种采用基因突变的方法(Sun *et al.*, 2020),一种采用药理干涉的方法(Unoki *et al.*, 2005),目前还无法确定两种观念是否可表明昆虫种间的信号传导差异性。本研究发现注射DARs拮抗剂SCH23390和螺哌隆除了可损害桔小实蝇的惩罚性嗅觉学习以及记忆提取外还可损害桔小实蝇的奖赏性嗅觉记忆提取,本试验采用药理干涉的方法得到了与果蝇上采用突变体相似的结果,本研究结果为DA调控昆虫学习与记忆的种间差异性提供了更多的证据。需要值得注意的是SCH23390仅影响惩罚性记忆的提取,而螺哌隆仅影响奖赏性记忆的提取,这可能与两种药剂的药理特性有关,即它们产生拮抗效果的DARs有差异。通过细胞转染的方法,有研究发现SCH23390主要拮抗DOP1和DOP2两种D1型DARs(Mustard *et al.*, 2003),而对DOP3这一D2型受体的拮抗作用测试的较少。在对二化螟 *Chilo suppressalis* DARs的测试作用中发现这一拮抗剂对3种DARs均有拮抗作用(Xu *et al.*, 2017)。另一DARs拮抗剂螺哌隆在果蝇和蜜蜂中被证实主要拮抗DOP1和DOP2受体,而对DOP3没有显著的拮抗效果(Kokay *et al.*, 1996; Kokay *et al.*, 1999)。虽然本试验还未在桔小实蝇上开展完整的受体药理特性验证,但由前期研究也可得知两种拮抗剂作用的DARs类型存在一定的差异,这一差异在桔小实蝇中也大概率存在。因此,本试验给出一种假设:参与调控桔小实蝇奖赏性和惩罚性记忆提取的DARs存在差异。

确定哪些亚型的OARs和DARs参与了桔小实蝇的嗅觉条件反射在未来的研究中十分必要。不幸的是,目前还没有报道任何昆虫物种中存在能够区分不同亚型OA或DA受体的特定拮抗剂。幸运的是,可以通过RNA干涉的方法或者构建突变体的方法来验证非模式昆虫中不同类型生物胺受体对于昆虫嗅觉学习的调控作用。目前,在蜜蜂

以及双斑蟋中(Matsumoto *et al.*, 2015)通过干涉和CRISPR/Cas9的基因编辑技术证明DOP1参与调控双斑蟋的惩罚而非奖赏信号通路。

对于长期记忆来说,已有研究证明,它的形成过程是需要稳定的蛋白质参与(Tully *et al.*, 1994),这个阶段称为长期记忆的巩固过程,以此来巩固长期的记忆形成。由研究可知,OA参与桔小实蝇长期记忆的巩固过程,时间跨度为3~6 h。于金鑫等人的研究(Yu *et al.*, 2023)已经证明蛋白质合成参与的桔小实蝇长期记忆巩固过程的时间跨度为训练后4~6 h,本试验所得的结果与这项研究的结果大致相同,由此可以推测,OA可能对桔小实蝇长期记忆巩固中的蛋白质合成过程有调控作用,且OA的作用时间要比蛋白质合成过程提前1 h,推测可能是由于OA介导的信息传导到相应细胞发生反应需要一定的时间跨度。

参考文献 (References)

- Agarwal M, Guzmán MG, Morales-Matos C, *et al.* Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (9): e25371.
- Alloway TM. Learning and memory in insects [J]. *Annual Review of Entomology*, 2003, 17 (1): 43-56.
- Awata H, Watanabe T, Hamanaka Y, *et al.* Knockout crickets for the study of learning and memory: dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 1-9.
- Barron AB, Sovik E, Cornish JL. The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2010, 4: 1-9.
- Beggs KT, Tyndall J, Mercer AR. Honey bee dopamine and octopamine receptors linked to intracellular calcium signaling have a close phylogenetic and pharmacological relationship [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (11): e26809.
- Blenau W, Baumann A. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 48 (1): 13-38.
- Blenau W, Stöppler D, Balfanz S, *et al.* Dm5-HT_{2B}: Pharmacological characterization of the fifth serotonin receptor subtype of *Drosophila melanogaster* [J]. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 2017, 11: 28.
- Chen P, Ye H. Relationship among five populations of *Bactrocera dorsalis* based on mitochondrial DNA sequences in western Yunnan, China [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2008, 132 (7): 530-537.
- Chen XY, Liu JL, Guo WJ, *et al.* Associative olfactory conditioning in

- male adults of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58 (9): 973–980. [陈小燕, 刘家莉, 郭文举, 等. 桔小实蝇雄成虫联系性嗅觉学习 [J]. 昆虫学报, 2015, 58 (9): 973–980]
- Cohen RW, Mahoney DA, Can HD. Possible regulation of feeding behavior in cockroach nymphs by the neurotransmitter octopamine [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2002, 15 (1): 37–50.
- Evans PD, Maqueira B. Insect octopamine receptors: A new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors [J]. *Invertebrate Neuroscience*, 2005, 5 (3–4): 111–118.
- Fu YS, Pan GD, Pan JP, et al. Research status and progress in the attracting substance to *Bactrocera dorsalis* Hendel [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2006, 9: 1919–1921. [付佑胜, 赵桂东, 潘建平, 等. 桔小实蝇引诱物质研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 9: 1919–1921]
- Himmelreich S, Masuho I, Berry JA, et al. Dopamine receptor DAMB signals via gq to mediate forgetting in *Drosophila* [J]. *Cell Reports*, 2017, 21 (8): 2074–2081.
- Iliadi KG, Iliadi N, Boulianne GL. *Drosophila* mutants lacking octopamine exhibit impairment in aversive olfactory associative learning [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2017, 46 (5): 2080–2087.
- Klappenbach M, Kaczer L, Locatelli F. Dopamine interferes with appetitive long-term memory formation in honey bees [J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2013, 106: 230–237.
- Kokay I, McEwan J, Mercer A. Autoradiographic localisation of [3H]-SCH23390 and [3H]-spiperone binding sites in honey bee brain [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 1998, 394 (1): 29–37.
- Kokay IC, Ebert PR, Kirchoff BS, et al. Distribution of dopamine receptors and dopamine receptor homologs in the brain of the honey bee, *Apis mellifera* L. [J]. *Microscopy Research and Technique*, 1999, 44 (2–3): 179–189.
- Kokay IC, Mercer AR. Characterisation of dopamine receptors in insect (*Apis mellifera*) brain [J]. *Brain Research*, 1996, 706 (1): 47–56.
- Lazareno S, Nahorski SR. Selective labelling of dopamine (D2) receptors in rat striatum by [3H] domperidone but not by [3H] spiperone [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1982, 81 (2): 273–285.
- Matsumoto Y, Matsumoto CS, Wakuda R, et al. Roles of octopamine and dopamine in appetitive and aversive memory acquisition studied in olfactory conditioning of maxillary palpi extension response in crickets [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2015, 9: 1–9.
- Mustard JA, Blenau W, Hamilton IS, et al. Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee *Apis mellifera* reveals agonist-independent activity [J]. *Molecular Brain Research*, 2003, 113 (1–2): 67–77.
- Mustard JA, Pham PM, Smith BH. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56 (4): 422–430.
- Rahmani MA, Cheema IR, Sen S, et al. Evaluation of isomers of octopamine for in vitro alpha-adrenergic stimulation of the aortic smooth muscle from spontaneously hypertensive rats [J]. *Cytobios*, 1987, 52 (208): 7–16.
- Roeder T. Tyramine and octopamine: Ruling behavior and metabolism [J]. *Annual Review of Entomology*, 2005, 50: 447–477.
- Scheiner R, Plückhahn S, Öney B, et al. Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees [J]. *Behavioural Brain Research*, 2002, 136 (2): 545–553.
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, et al. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila* [J]. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23 (33): 10495–10502.
- Shelly TE. Consumption of methyl eugenol by male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae): low incidence of repeat feeding [J]. *Florida Entomologist*, 1994, 77 (2): 201–208.
- Sun RC, Delly J, Sereno E, et al. Anti-instinctive learning behavior revealed by locomotion-triggered mild heat stress in *Drosophila* [J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2020, 14.
- Thamm M, Balfanz S, Scheiner R, et al. Characterization of the 5-HT_{1A} receptor of the honeybee (*Apis mellifera*) and involvement of serotonin in phototactic behavior [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67 (14): 2467–2479.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, et al. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila* [J]. *Cell*, 1994, 79 (1): 35–47.
- Unoki S, Matsumoto Y, Mizunami M. Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study [J]. *European Journal of Neuroscience*, 2005, 22(6): 1409–1416.
- Xing CM, Han DY, Zhang FP, et al. Effect of climatic factors on population dynamics of *Bactrocera dorsalis* in mango plantation [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2017, 37 (4): 48–51. [邢楚明, 韩冬银, 张方平, 等. 气象因子对芒果园桔小实蝇种群动态的影响 [J]. 热带农业科学, 2017, 37 (4): 48–51]
- Xu G, Wu SF, Gu GX, et al. Pharmacological characterization of dopamine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 83: 80–93.
- Yu JX, Hui YM, Xue JA, et al. Formation characteristics of long-term memory in *Bactrocera dorsalis* [J]. *Insect Science*, 2023, 30 (3): 829–843.
- Yu JX. Adaptation of insect behavior to its surroundings [J]. *Jilin Agriculture*, 2011, 8: 242–243. [于佳星. 昆虫行为与周围环境的适应 [J]. 吉林农业, 2011, 8: 242–243]
- Yu JX. The Differential Regulation of Olfactory Learning by Octopamine on Different Sugar Reward in *Bactrocera dorsalis* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020. [于金鑫. 章鱼胺对不同糖奖赏下桔小实蝇嗅觉学习的差异调控 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020]
- Zheng CW, Zhou YF, Wang UX, et al. The method for feeding *Bactrocera dorsalis* Hendel by using new type of *Bactrocera* breeding box [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2018, 47 (2): 32–38. [郑传伟, 周益锋, 王艺璇, 等. 利用新型实蝇多态养虫箱饲养桔小实蝇的方法 [J]. 西部林业科学, 2018, 47 (2): 32–38]