

殷玲,吉挺,李冠华,等. 中华蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列及其表达与抗螨性状的相关性[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):45-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.012

中华蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列及其表达与抗螨性状的相关性

殷玲¹, 吉挺², 李冠华¹, 牛德芳¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: *OBP17* 是蜜蜂气味结合蛋白质 (odorant binding proteins, OBPs) 家族中的成员, 参与气味分子的识别, 对嗅觉起重要作用。蜜蜂的抗螨性状与嗅觉密切相关, 为研究蜜蜂 *OBP17* 基因的功能及其与抗螨性状的相关性, 以中华蜜蜂头部组织 cDNA 为模板, PCR 扩增 *OBP17* 基因完整 CDS 序列, 利用生物信息学方法分析 CDS 序列及其编码的氨基酸序列, 利用 RT-PCR 方法检测 *OBP17* 基因在不同抗螨性状的中华蜜蜂头部组织中的相对表达量。结果表明, *OBP17* 基因 CDS 全长为 408 bp, 编码 135 个氨基酸的分泌性蛋白, 无跨膜螺旋, 是比较保守的基因; RT-PCR 检测结果显示, 在蜂螨胁迫下的中华蜜蜂头部组织中, *OBP17* 基因的表达量显著高于未受胁迫的抗性群体及受到同等蜂螨胁迫的敏感性群体。中华蜜蜂 *OBP17* 基因的表达变化与蜂螨感染过程相关, 说明 *OBP17* 基因在中华蜜蜂的抗螨行为中起重要作用。

关键词: 中华蜜蜂; *OBP17*; 克隆; 生物信息学; 狄斯瓦螨

中图分类号: S895.3⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0045-04

昆虫通过嗅觉受体神经元的调节来识别并区分成千上万种气味复合物, 而气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 家族则承担特异性识别、转运气味复合物至受体的运输功能^[1], 因此气味结合蛋白与昆虫的嗅觉敏感性密切相关。目前, 国内外关于蜜蜂 OBPs 家族的基因功能研究较少, 关于中华蜜蜂 OBPs 家族的研究更少。李红亮等对 ASP2 进

行 CDs 的克隆, 并对其功能模式进行分析^[2-3]; 张小辉等克隆了中华蜜蜂气味结合蛋白 5、9、11、12 的完整基因序列^[4]; 陈扬等对中华蜜蜂头部 *CSP3* 基因的 CDS 序列进行分析^[5]。*OBP17* 是蜜蜂气味结合蛋白质家族中的成员, 是低分子量水溶性酸性蛋白质, 有 6 个保守的半胱氨酸位点, 在西方蜜蜂的身体各部位均有表达^[6], 但其具体功能却不得而知。

狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*) 别称大蜂螨, 是对世界养蜂业威胁最大的蜜蜂病虫害, 对西方蜜蜂产业造成了巨大损失^[7], 也是我国最重要、必须严加防范的蜜蜂寄生虫害^[8]。中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 是东方蜜蜂的地理品种, 生活于我国境内, 狄斯瓦螨对其并不造成伤害^[9]。周婷对我国主要

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31372382); 江苏农牧科技职业技术学院重点科研课题 (编号: NSFRC1401)。

作者简介: 殷玲 (1983—), 女, 江苏泰兴人, 博士, 讲师, 主要从事蜜蜂分子生物学研究。E-mail: lingyin_txx@163.com。

效率。本试验提取转基因水稻基因组 DNA 并进行 PCR 检测, 结果表明, 利用优化后的转化体系可将转化率提高到 37.5%。本研究结果证明目的基因已成功转入冀旱糯 3 号的细胞中, 而目的基因的插入位点还需要进一步做 tail-PCR 研究。

参考文献:

- [1] 侯佩臣, 王晓冬, 王美娟, 等. 干旱胁迫下早稻和水稻对 K⁺ 和 Ca²⁺ 的动态吸收研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(23): 5-7, 16.
- [2] 孙重霞, 张桂堂, 梁荣奇, 等. 利用转基因技术改良小麦品质的研究进展[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 398-406.
- [3] 唐微. 转 *Bar* 基因抗除草剂水稻的培育[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(4): 488-490.
- [4] 李国圣, 张卿伟, 张举仁, 等. 玉米丛生芽体系的建立及抗除草剂转基因植株再生[J]. 中国科学: C 辑: 生命科学, 2001, 31(5): 385-391.
- [5] 咸拴狮, 罗晓丽, 王剑. 油菜转基因进展[J]. 山西农业科学, 2006, 34(3): 85-88.

- [6] Deane J E, Roversi P, King C, et al. Structures of the shigella flexneri type 3 secretion system protein MxiC reveal conformational variability amongst homologues [J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(4): 985-992.
- [7] 俞嘉宁, 张林生, 张劲松, 等. 小麦耐逆基因 - *TaLEA3* 的克隆及在酵母中的功能分析[J]. 生物工程学报, 2004, 6(6): 832-838.
- [8] Cheng Z, Taroglli J, Huang X, et al. Wheat LEA genes *PM80* and *PMA1959*, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 71-82.
- [9] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- [10] Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 76(6): 835-840.
- [11] 江玲, 万建民. 植物激素 ABA 和 GA 调控种子休眠和萌发的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(4): 360-365.

中蜂饲养区的大蜂螨寄生状态进行了调查,发现中蜂群中螨的寄生率极低,有些地区的中蜂群中甚至难以找到狄斯瓦螨的踪迹,但也有极少数群体出现与西方蜜蜂感染蜂螨相同的症状,如花子、残翅等^[10]。很多研究表明,嗅觉敏感性强的蜜蜂可以迅速察觉并区分正常与不正常幼虫的气味,其清洁行为更易被激发^[11-12]。蜜蜂嗅觉敏感性的差异可导致其清洁及梳理行为的差异,从而导致抗螨性状的差异^[13];虽然这一机理被广泛接受,但其分子机制却不清晰。

本研究以中华蜜蜂头部组织 cDNA 为模板,PCR 扩增 *OBP17* 基因完整 CDS 序列,利用生物信息学方法分析 CDS 序列及其编码的氨基酸序列,并在蜂螨胁迫及没有蜂螨胁迫的条件下,利用 RT-PCR 方法检测 *OBP17* 基因在不同抗螨性状的中华蜜蜂头部组织中的相对表达量,以期蜜蜂 *OBP17* 基因的功能及其与抗螨性状相关性的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验蜂群及蜂螨胁迫

本试验选用广东昆虫研究所实验蜂场内具有蜂螨抗性、蜂螨敏感性的中华蜜蜂群体各 2 群。将 2 张狄斯瓦螨感染程度相当的巢脾分别放入蜂螨抗性中华蜜蜂、蜂螨易感性中华蜜蜂的蜂箱内,对照组放入无蜂螨感染的西方蜜蜂巢脾,胁迫 24 h 后进行样本采集,4 个蜂群各采集 150 只哺育蜂(18 日龄以内)。

1.2 总 RNA 的提取、检测、反转录

采用 Trizol 法提取中华蜜蜂头部组织的总 RNA。以总 RNA 为模板,使用 First Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司产品)并参照说明书进行反转录,合成 cDNA 第 1 链。

表 1 *OBP17* 基因、 β -actin 基因的引物信息

基因	上、下游引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
<i>OBP17</i>	F:TGTTGAGCAGTGCCAAATTC;R:TGCTATTGCGTTTGCGTTA	102
β -actin	F:TGCCAACACTGTCCTTCTG;R:AATACAACTGGTGAAGCTACAGG	155

PCR 扩增反应体系(20 μ L)为:上下游引物(10 mmol/L)各 0.4 μ L、SYBR Premix Ex *Taq*TM II (2 \times) 10 μ L、ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L、cDNA 1 μ L,并添加 Rnase Free 水 8.2 μ L 使总体积为 20 μ L。试验设置阴性对照,每个样品设 3 个重复。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 热变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 复性 34 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 34 s,40 个循环。PCR 扩增结束后,采集多个信息点进行溶解曲线分析,以显示 PCR 的特异性,程序为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s;95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[14]直接得出 RQ 值的柱形图。

2 结果与分析

2.1 东方蜜蜂 *OBP17* 基因克隆及序列分析

PCR 扩增 *OBP17* 基因目的条带(466 bp),经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 400 ~ 500 bp 之间可见 1 条清晰的特异性条带(图 1)。测序结果显示,其长度为 466 bp,包含完整的 CDS 序列 408 bp,编码 135 个氨基酸,序列已提交至 Genbank (登陆号 KM591216.1)。

利用 clustal x 软件将中华蜜蜂与其他昆虫类的 *OBP17* 基因氨基酸序列进行相似度比较(图 2),与西方蜜蜂(*A. mellifera*,NP_001035297.1)的相似度高达 100.00%,其

1.3 CDs 的克隆测序

参照 GenBank 公布的西方蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列(GenBank 登录号为 DQ435334.1)的编码区进行引物设计,扩增东方蜜蜂的 *OBP17* 基因完整 CDS 序列。引物序列为:F,TAAAAAAAAAAAAAAAAATGAAAAC;R, GTAAGTATGTTGTCG-TATCCTGAAT。

PCR 扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55.7 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。PCR 扩增产物经纯化回收后,与 pMD19-T Simple Vector 进行连接,挑选阳性克隆送至生工生物工程(上海)技术有限公司测序。

1.4 序列分析

利用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析序列的同源性;利用 clustalw 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)分析 *OBP17* 基因与近源物种相同基因的差异;利用 ExPASy 网站的 ProtScale 程序(<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)分析蛋白疏水性结构;对蛋白质跨膜结构进行预测(<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>),并对信号肽区域进行分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>);利用在线工具(<http://www.ch.embnet.org/software/COILS-form.html/>)进行跨膜螺旋预测;利用 PSIPRED v3.0 软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>)预测目的蛋白的二级结构。

1.5 实时定量 PCR 引物设计及目的片段扩增

根据获得的 *OBP17* 基因 CDs 序列及 β -actin(登录号:AB023025)外显子序列,利用 Premier primer 5.0 软件设计引物(表 1)。

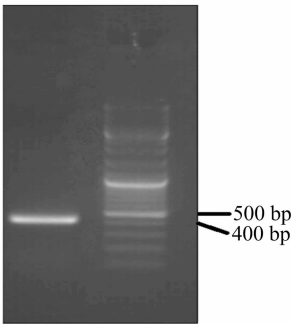


图 1 中华蜜蜂 *Obp17* 基因 PCR 扩增结果

余依次为金小蜂(*Nasonia vitripennis*,CCD17786.1)21.74%、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*,AFI57166.1)20.59%、烟夜蛾(*Helicoverpa assulta*,AGC92792.1)20.59%、拟谷盗(*Tribolium castaneum*,EFA02861.1)13.42%、刺舌蝇(*Glossina morsitans morsitans*,EFA02861.1)11.10%。

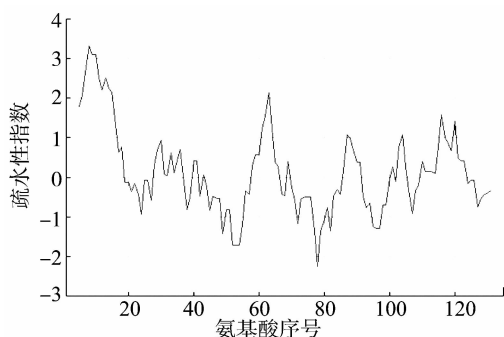
2.2 东方蜜蜂 *OBP17* 基因氨基酸的理化性质

利用 ExPASy 服务器分析中华蜜蜂 *OBP17* 基因蛋白的理化性质,其共有 135 个氨基酸,分子式为 C₆₅₆H₁₀₇₈N₁₆₈O₂₁₀S₁₁、分子量 15 031.4、理论等电点 4.54、估计半衰期 30 h、不稳定

<i>Aips-cerana</i>	---MKTIVIIISAICUCUSANTL-DELKSGLHTVQSVCMKEIGTAQII DD 46
<i>Apis-mellifera</i>	---MKTIVIIISAICUCUSANTL-DELKSGLHTVQSVCMKEIGTAQII DD 46
<i>Helicoverpa-assulta</i>	---MKTIVIIISAICUCUSANTL-DELKSGLHTVQSVCMKEIGTAQII DD 47
<i>Helicoverpa-armigera</i>	---MKTIVIIISAICUCUSANTL-DELKSGLHTVQSVCMKEIGTAQII DD 47
<i>Nasonia-vitripennis</i>	---MKFFTVATFAMCIIGTFAAFTMTEEQAQDLQDKLDCIKETGADIATLLN 49
<i>Tribolium-castaneum</i>	MKSTWFFLLACSLTCLDQEFUDEFLEKMQEFGAQAETDATSDDIAE 50
<i>Glossina-morsitans-morsitans</i>	-----NIPGRFNLPHVSLTDHFLGQ 20
	: : .
<i>Aips-cerana</i>	INEGKINMDDENULLFIECTMKKFNUVDENANFNK--ISSDIURAVLN- 93
<i>Apis-mellifera</i>	INEGKINMDDENULLFIECTMKKFNUVDENANFNK--ISSDIURAVLN- 93
<i>Helicoverpa-assulta</i>	LKGGDYKTESEPLRKYALCMMKSELMTKDGKFKKD--VALAKUPNAAD- 94
<i>Helicoverpa-armigera</i>	LKGGDYKTESEPLRKYALCMMKSELMTKDGKFKKD--VALAKUPNAAD- 94
<i>Nasonia-vitripennis</i>	IKNGIPTLYDDKUNCFAACHLEKFNIMKPDGSMDET--VARLRASKSMS- 96
<i>Tribolium-castaneum</i>	LIARKLPSTHEGKCMIFCMQKKFNMMKENGIGIRAGAI AALKPLQKADP 100
<i>Glossina-morsitans-morsitans</i>	IEYAEIAPKN--AKCFLRCWYKMGILKENLUTSAG---PIELRQHMR- 64
	: * * : : . .
<i>Aips-cerana</i>	--DNEADQLLAECSPIS--DPNALIKISKILECFKFKYKTINQILNS--- 135
<i>Apis-mellifera</i>	--DNEADQLLAECSPIS--DPNALIKISKILECFKFKYKTINQILNS--- 135
<i>Helicoverpa-assulta</i>	--KPTUEKLIDACLANK--GNTPHQTAWNYUKCYHEKDPKHAIFL---- 135
<i>Helicoverpa-armigera</i>	--KPTUEKLIDACLANK--GNTPHQTAWNYUKCYHEKDPKHAIFL---- 135
<i>Nasonia-vitripennis</i>	--QEKVDRLSSCKSEV--GKDKCETGKILECLMKNDAPVILS----- 136
<i>Tribolium-castaneum</i>	ELHQKULKIFUTCGRUKSPDPDCDTATELALCGKKEAEIGLEDALLT 149
<i>Glossina-morsitans-morsitans</i>	----ECNEVATEWAQNN--SNGDECEFAWSFYTCMHESLUKCLT----- 102
	: . * :

图2 部分昆虫的 *OBP17* 基因氨基酸序列对比结果

指数 28.71 (为稳定蛋白)、脂肪指数 111.19、亲水指数 0.146。使用 ProtScal 程序在线分析东方蜜蜂 *OBP17* 基因的疏水性(图3),疏水性指数的最大值、最小值分别为 3.322、-2.256,由此推测中华蜜蜂 *OBP17* 基因蛋白为疏水性蛋白。使用 PSIPRED v3.0 程序分析东方蜜蜂 *OBP17* 基因蛋白的二级结构,预测结果表明 *OBP17* 基因没有 β -折叠,属于全 α 型蛋白。

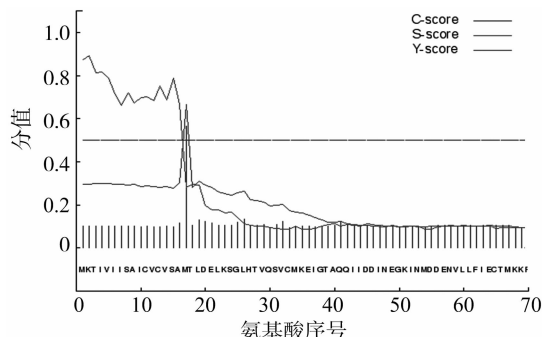
图3 中华蜜蜂 *OBP17* 基因的疏水结构预测

2.3 东方蜜蜂 *OBP17* 基因的蛋白序列信号肽及蛋白质跨膜区域预测

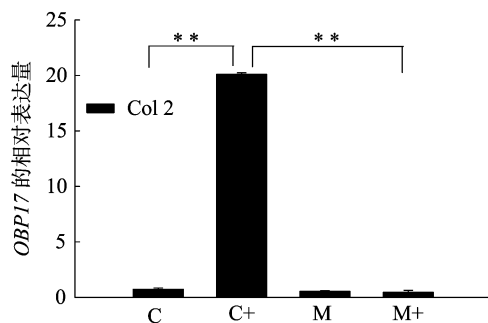
使用 SignalP-4.1 程序^[15]在线分析东方蜜蜂 *OBP17* 基因的信号肽,结果(图4)显示,东方蜜蜂 *OBP17* 基因具有信号肽,最可能的剪切位点预测在第16位点至第17位点间,成熟蛋白启动的位置为17,预测信号肽的长度为第1位点至第16位点氨基酸。使用 TMHMM service 2.0 程序在线分析东方蜜蜂 *OBP17* 基因的跨膜区,并未发现 *OBP17* 基因具有跨膜区。

2.4 *OBP17* 基因在不同抗螨性能蜂群中的表达

对蜂螨胁迫处理组、蜂螨抗性对照组、蜂螨敏感性对照组的中华蜜蜂头部组织中 *OBP17* 基因的表达水平进行比较分析。蜂螨抗性对照组的样品命名为 C,受蜂螨胁迫 24 h 的样品命名为 C+;蜂螨易感对照组的样品命名为 M,受蜂螨胁迫

图4 中华蜜蜂 *OBP17* 基因的信号肽结构预测

24 h 的样品命名为 M+。结果(图5)表明,在蜂螨胁迫下的抗性群体头部组织中,*OBP17* 基因的表达量显著高于未受胁迫的抗性群体和受同等蜂螨胁迫的敏感性群体,可见中华蜜蜂 *OBP17* 基因的表达变化与蜂螨感染过程相关,说明 *OBP17* 基因可能在中华蜜蜂的抗螨行为中起重要作用。

图5 中华蜜蜂 *OBP17* 基因在不同抗性群体头部组织的表达

3 结论与讨论

本试验以中华蜜蜂头部组织为材料,克隆出 *OBP17* 基因完整 CDS 序列,采用生物信息学方法对序列及其编码的蛋白质进行分析和预测。结果表明,*OBP17* 基因 CDS 序列全长为

408 bp, 编码 135 个氨基酸; 将该基因 CDS 区与 GenBank 中其他昆虫纲的同源基因进行比对, 发现其与西方蜜蜂 (NP_001035297.1) 的同源性高达 100%, 充分体现了 2 个物种的近缘关系, 同时表明气味结合蛋白在这 2 个物种间高度保守, 其功能很可能相似。对 *OBP17* 基因蛋白氨基酸序列进行分析和功能预测, 显示其为分泌性疏水蛋白, 无跨膜结构, 这与气味结合蛋白转运气味分子的功能相符合, 并证明试验所克隆序列的正确性。

嗅觉敏感性差异是导致蜜蜂抗螨性状差异的重要原因^[16-18], 而气味结合蛋白 OBPs 对蜜蜂感受外界气味起重要作用。OBPs 与脂溶性气味分子发生的作用, 是昆虫专一性识别外界气味物质所发生的第 1 步生化反应^[6]。经 RT-PCR 分析发现, *OBP17* 基因在蜂螨胁迫下的抗性东方蜜蜂中高度表达, 而在未受蜂螨胁迫的抗性群体及敏感性群体中表达量很低, 可见 *OBP17* 基因在中华蜜蜂的抗螨过程中起重要作用。目前, 梳理行为、卫生行为是最普遍接受的蜜蜂抗螨机制。很多研究表明, 具有抗螨性状的蜜蜂能够发现、抓住、撕咬正在移动的蜂螨, 梳理自己和同伴身上的蜂螨, 还可检查房内已被病害感染的蜜蜂幼虫, 咬开封盖房并清除感染幼虫^[9,19-20]。蜂箱内为暗环境, 蜜蜂很可能通过有效识别蜂螨的特殊气味(螨害体表表皮碳氢化合物) 而将其清除^[21]。由此推测, 蜂螨抗性群体、敏感性群体对蜂螨气味的敏感度差异造成了其蜂螨抗性的差异, 而 *OBP17* 基因可能在此过程中起重要作用。本试验的推测尚须进一步研究加以论证。

参考文献:

- [1] Pelosi P. Perireceptor events in olfaction [J]. Journal of Neurobiology, 1996, 30(1): 3-19.
- [2] 李红亮, 聂文敏, 高其康, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA 的克隆及原核表达 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 933-938.
- [3] 李红亮, 张林雅, 庄树林, 等. 中华蜜蜂普通气味结合蛋白 ASP2 的气味结合功能模式分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 154-161.
- [4] 张小辉, 朱忠珂, 祁艳霞, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白 5, 9, 11, 12 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, 4(7): 140-141.
- [5] 陈 杨, 余林生, 申洁琼, 等. 具有不同抗螨特性的东方蜜蜂 cDNA 文库构建和 *CSP3* 基因 CDs 序列分析 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 21-24.
- [6] Foret S M R. Evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect: the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. Genome Research, 2006, 16(11): 1404-1413.
- [7] Behrens D, Huang Q, Gessner C, et al. Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor* [J]. Ecology and Evolution, 2011, 1(4): 451-458.
- [8] 黄双修, 周 婷, 姚 军, 等. 对中华蜜蜂寄生瓦螨生物学和分类地位及中蜂抗螨机制的新认识 (一) [J]. 蜜蜂杂志, 2003(1): 10-11.
- [9] 谭 星, 余玉生, 张学文, 等. 东方蜜蜂抗螨的试验研究 [J]. 中国养蜂, 2002, 53(6): 10-12.
- [10] 周 婷. 狄斯瓦螨的生物学特性及在我国的自然分布 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [11] Swanson J A, Torto B, Kells S A, et al. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae [J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(9): 1108-1116.
- [12] Martin C, Provost E, Roux M, et al. Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acaricidal parasite *Varroa destructor*: behavioural and electroantennographic data [J]. Physiological Entomology, 2001, 26(4): 362-370.
- [13] Navajas M, Migeon A, Alaux C, et al. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 301.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Petersen T N, Brunak S, Von H G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [16] Gramacho K P, Spivak M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior [J]. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2003, 54(5): 472-479.
- [17] Carcaud J, Hill T, Giurfa M, et al. Differential coding by two olfactory subsystems in the honeybee brain [J]. Journal of Neurophysiology, 2012, 108(4): 1106-1121.
- [18] Yang E C, Chang H C, Wu W Y, et al. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49472.
- [19] Thakur R K, Bienefeld K, Keller R. *Varroa defense* behavior in *Apis mellifera carnica* [J]. American Bee Journal, 1997, 137: 143-148.
- [20] Aumeier P. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees [J]. Apidologie, 2001, 32: 81-90.
- [21] Boecking O, Genersch E. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping [J]. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2008, 3(2): 221-228.