

中华蜜蜂酪胺受体基因克隆及表达分析

张丽珍, 张永, 胡景华, 王子龙, 曾志将

江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045

摘要: 酪胺(tyramine)属于生物多聚胺类, 是昆虫中枢神经系统内重要的神经递质、神经调质和神经激素, 参与调控昆虫的多种行为和生理过程, 如酪胺受体基因参与调控动物的学习与记忆。本研究首次克隆获得中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)酪胺受体基因 *Actyr1* 和 *Actyr2* 的全长 cDNA 序列, 利用 qRT-PCR 方法鉴定了 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂不同组织器官中的表达谱, 采用地高辛原位杂交技术对 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在大脑中的表达进行了定位。中华蜜蜂 *Actyr1*、*Actyr2* 的 cDNA 全长序列分别为 1241 bp(GenBank 登录号: KC814693)和 1270 bp(GenBank 登录号: KC814694), 分别编码 297、399 个氨基酸残基。qRT-PCR 分析结果表明, *Actyr1* 和 *Actyr2* 在不同组织中的表达量为头部最高, 其次是腹部表皮, 触角和胸部肌肉的表达量最低, 并且头部的表达量显著高于其他组织的表达量; 原位杂交结果显示, *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂大脑蘑菇体的凯尼恩细胞、触角叶周围的细胞处均有较强阳性着色。这些研究表明, *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因可能参与了蜜蜂的学习记忆, 并且在相同的细胞中互相作用, 共同调控蜜蜂的生物学功能。

关键词: 中华蜜蜂; 酪胺受体基因; 分子克隆; 表达分析

Molecular cloning and expression analysis of the tyramine receptor genes in *Apis cerana cerana*

Lizhen Zhang, Yong Zhang, Jinghua Hu, Zilong Wang, Zhijiang Zeng

Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: Tyramine is a biological polyamine, which serves important functions as neurotransmitters, neuromodulators and neurohormone of the central nervous system. It participates in the regulation of various behavior and physiological processes in insects. For example, tyramine and its receptor genes are involved in the regulation of learning and memory in the animals. In this study, the full-length cDNA sequences of the tyramine receptor genes (*Actyr1* and *Actyr2*) of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, were cloned and sequenced for the first time. Their expression patterns were examined

收稿日期: 2017-03-21; 修回日期: 2017-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31260524, 31602015, 31402147)和国家蜂产业技术体系项目(编号: CARS-45-KXJ12)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.31260524, 31602015, 31402147) and the Earmarked Fund for the China Agriculture Research System (No. CARS-45-KXJ12)]

作者简介: 张丽珍, 博士, 实验师, 研究方向: 蜜蜂行为及分子生物学。E-mail: zlzcg@126.com

张永, 硕士研究生, 专业方向: 蜜蜂分子生物学。E-mail: 502315963@qq.com

张丽珍和张永为并列第一作者。

通讯作者: 曾志将, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 蜜蜂生物学。E-mail: bees1965@sina.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-096

网络出版时间: 2018/1/9 11:00:16

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180109.1100.003.html>

in different tissues by qRT-PCR and localized in the head by *in situ* hybridization with digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes. The full-length cDNAs of *Actyr1* and *Actyr2* are 1241 bp (GenBank accession no. KC814693) and 1270 bp (GenBank accession no. KC814693) in length and encode 297 amino acids and 399 amino acids, respectively. qRT-PCR results showed that the expression levels of both *Actyr1* and *Actyr2* were the highest in the head, followed by the abdomen, then the antennae and the lowest in the thorax. The expression level in the head was significantly higher than that in other tissues. Moreover, *in situ* hybridization showed that the expression of *Actyr1* and *Actyr2* genes were mainly localized to the Kenyon cells of the mushroom bodies and cells around the antennal lobes. These observations suggest that some interactions between these two genes in certain cells could be important in regulating various biological functions, such as learning and memory, in the honeybee.

Keywords: *Apis cerana cerana*; tyramine receptor genes; molecular cloning; expression analysis

酪胺(tyramine)属于生物多聚胺类,是昆虫中枢神经系统内重要的神经递质、神经调质和神经激素,参与调控昆虫的多种行为和生理过程,如参与调控求偶^[1]、运动^[2]、学习记忆^[3]和繁殖^[4]等。昆虫体内的酪胺相当于脊椎动物体内的去甲肾上腺素^[5],其作用途径也是通过结合在细胞膜上的 G 蛋白偶联受体,从而激活这些受体,导致细胞内第二信使的浓度发生改变(如 cAMP 和 Ca^{2+}),从而引起各种生理生化反应^[6,7]。

药理学和行为学研究发现,酪胺受体基因参与调控动物的学习与记忆。2000 年, Kutsukake 等^[8]发现酪胺受体基因突变后的果蝇(*Drosophila*)个体经 PER(proboscis extension reflex)测试后,嗅觉学习能力下降。Blenau 等^[6]成功克隆了西方蜜蜂(*Apis mellifera*)酪胺受体基因 *Amtyr1*,发现该基因广泛分布在大脑和食管神经节中,推测该基因可能参与了蜜蜂高级认知能力的信号传导过程。2015 年,袁安等^[9,10]发现饲料蛋白水平和发育温度过低会抑制西方蜜蜂 *Amtyr1* 的表达并造成记忆力的下降。2017 年, Scheiner 等^[11]用药理学方法激活酪胺受体提高了哺育蜂和采集蜂的味觉反应,并且提高了哺育蜂的奖赏学习能力。

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)简称中蜂,是东方蜜蜂(*Apis cerana*)的指名亚种,也是我国饲养的重要蜂种。相比西方蜜蜂(*Apis mellifera*),中华蜜蜂性情温驯、抗寒、耐热、抗螨能力强、嗅觉灵敏,善于采集零星蜜源或低密度花蜜,对颜色和方向的认知能力更强^[12~14]。中华蜜蜂养殖生产的健康发展对我国生态环境的保护和农作物产量的提高有着重要作用。

但是,目前中华蜜蜂种群数量和分布区域都显著降低,有些地方甚至处于濒危状态,这对依赖蜜蜂授粉的农业造成了巨大的损失。蜂群数量的减少可能与环境的改变有关,也可能与成年工蜂学习记忆能力的下降有关^[15]。

中华蜜蜂具有其他蜂种不可替代的资源优势和种质特性,但是对中华蜜蜂酪胺受体基因的研究目前还未见报道。本研究首次克隆获得中华蜜蜂酪胺受体基因 *Actyr1* 和 *Actyr2* 的全长 cDNA 序列,分析了这两个基因在大脑中的表达定位情况,为进一步探讨 *Actyr1* 和 *Actyr2* 对中华蜜蜂学习记忆的功能机制提供基础,为利用和保护我国的特有蜂种资源提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

中华蜜蜂由江西农业大学蜜蜂研究所饲养提供,均来自同一群健康无病的蜂群。用干净的镊子抓取后足带有花粉的采集蜂,置于无 RNA 酶的 EP 管中, -80°C 保存待用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和反转录

取 20 只中华蜜蜂的大脑,经研磨器处理后,利用 Trizol 裂解提取大脑总 RNA,使用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 纯度。选择纯度合适的 RNA,用

反转录酶试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA , -80℃冰箱保存 , 备用。

1.2.2 PCR 扩增及测序

参照 GenBank 中西方蜜蜂 *Amtyr1* 和 *Amtyr2* 的 cDNA 序列 , 利用生物学软件 Primer5.0 设计引物 (引物序列信息见表 1) , 扩增中华蜜蜂 *Amtyr1* 和 *Amtyr2* 基因。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 扩增体系为 10 μL , 包括 10×*Taq* Buffer 1.0 μL、dNTP mixture 0.8 μL、*LA-Taq* DNA polymerase 0.1 μL、上下游引物各 0.2 μL , cDNA 1 μL , 加 ddH₂O 至 10 μL。PCR 扩增条件 : 94℃预变性 5 min ; 94℃变性 1 min , 复性(*Actyr1* 56℃ , *Actyr2* 58℃) 1 min , 72℃延伸 2 min , 30 个循环 ; 72℃再延伸 10 min , 4℃保存 1 h。PCR 产物经 15% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测 , 胶回收试剂盒(上海普洛麦格生物公司)回收目的片段。

取胶回收产物 1~3 μL 与 pMD 18-T 载体于 16℃连接反应 30 min , 转化到 JM109 大肠杆菌感受态细胞中 , 涂布于含有氨苄抗生素的培养基平板上 , 37℃倒置培养 24~30 h。挑取单菌落 , 利用 PCR 扩增进行转化后阳性克隆子的鉴定 , 得到正确的重组子后在恒温培养箱中扩大培养 , 由上海英杰生物公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析

利用 DNASTar 软件中的 Seqman 程序进行序列拼接 , 获得 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因全长 cDNA 序列 , 并在 NCBI 网站上用 Blast 进行序列比对分析 ; 利用 ClustalX 比较分析中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因氨

基酸序列与其他物种的序列相似性 ; 用 MEGA4.1 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树(3000 次重抽样)。

1.2.4 qRT-PCR 检测 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂不同组织中的表达

将刚出房的工蜂用标记笔标记 , 取约 25 只同日龄采集工蜂进行组织分离 , 分别取其触角、头(去除触角)、胸部肌肉、腹部表皮 ; 每种组织分成 3 个平行样 , 取样过程均在干冰上操作 , 取样后迅速放入液氮中 , 经研磨加入 1 mL Trizol 裂解液提取 RNA。获得的各组织 RNA 经检测合格后 , 利用反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。

根据中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因的 cDNA 序列 , 利用软件 Primer5.0 设计 qRT-PCR 定量扩增引物(引物序列见表 1) , 以 *β-actin* 为内参基因。

qRT-PCR 扩增体系为 10 μL , 包括 SYBR Premix Ex *Taq*(2×)5 μL , 上、下游引物各 0.4 μL , ROX Reference Dye(50×) 0.2 μL , ddH₂O 3 μL , cDNA 1 μL。qRT-PCR 扩增条件 : 95℃预变性 30 s ; 95℃ 10 s , 58.9℃ 1 min , 40 个循环。空白对照模板为 ddH₂O。每个样品进行 3 次重复。根据每个样品与内参基因 *β-actin* 所得的 *Ct* 值 , 采用 2^{-ΔΔ*Ct*} 法进行数据分析 , 利用 StatView 软件进行方差分析。

1.2.5 原位杂交

根据中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因的 cDNA 序列 , 利用原位杂交试剂盒(上海罗氏公司)合成酪胺受体基因寡核苷酸探针 , 探针序列如下 :

Actyr1 探针序列(总长 167 bp) : ATCTCTTGCTACGTCGCCCTCCGGCTGTATATCAACGGTTGAGTTACAGCTAGATACCTGTCTATGGATATGGCGCATACGATAGTATGCTGGCAGTACAGAGAAGAATGTCGAGGGAGACCCACGAGTCGCAGAGCATCGGGCCCAACTCCCAGGTACCACCTGTA。

Actyr2 探针序列(总长 126 bp) : ACCACGACAA-CGGTTTACCAATTCATCGAGGAGAGGCAGAGGATCTCGTTGTGCAAGGAGAGACGAGCCGCGAGGACATTGGGCGTGATAATGGGCGTGTTTCGTCGTGTGCTGGCTACCGTTCTTT。

将解剖好的中华蜜蜂大脑放在 4% 中性甲醛固定过夜 , 再经过脱水、透明、浸蜡、包埋和切片处理

表 1 引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

用途	基因名称	引物序列(5'→3')
PCR	<i>Actyr1</i>	F:GCCAAACCAACCAGCAAATC R:CAATGGAGCGGGGTAAAG
	<i>Actyr2</i>	F:AACAGCAACGGGATGAAGAA R:AGAAACGCACCCTGAAGAGAGT
qRT-PCR	<i>Actyr1</i>	F:AATCCAAGGAGTGCGAGGTG R:TGCGTGTCAATGGGAAGAAG
	<i>Actyr2</i>	F:TCTCTTCAGGGTGCGTTTCT R:GTTAACCTGCGACGTGCTCT

制作石蜡切片；将切片分别用二甲苯、无水乙醇和 DEPC 水脱蜡两次，经蛋白酶 K 于 37℃ 温育 30 min，杂交缓冲液约 150 μ L 孵育 10 min，之后每张切片加入杂交液（稀释的预杂交液，探针 1:80 稀释，10 μ L/张），空白对照不含有探针，于 42℃ 杂交 18~30 h；杂交后再用 5 \times SSC 洗涤浸泡封闭，加 anti-DIG-Ap 稀释液（1:1000），4℃ 轻摇过夜，加入按比例配置的 NBT、BCIP 和稀释液的显色液（1:1250），避光显色 0.5~4 h，洗涤终止显色，再滴加核固红复染，快速进行脱水透明，中性树胶封片，使用高清显微镜观察拍照。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂酪胺受体基因的克隆及序列分析

本研究首次克隆获得了中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 全长 cDNA 序列。*Actyr1* 序列全长为 1241 bp（GenBank 登录号：KC814693），推测编码 297aa，分子量为 33.458 kDa，等电点为 9.80。*Actyr2* 序列全长为 1270 bp（GenBank 登录号：KC814694），推测编码 399aa，分子量为 44.588 kDa，等电点为 8.61。通过 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)数据库分

析 *Actyr1* 和 *Actyr2* 的氨基酸序列均包括 2 个结构域。

根据中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 的氨基酸序列，采用 MEGA4.0 软件构建系统进化树，结果如图 1 所示。从图 1A 可见，中华蜜蜂与小蜜蜂（*Apis florea*）、西方蜜蜂聚成一支；从图 1B 可见，中华蜜蜂与西方蜜蜂聚成一支。

2.2 中华蜜蜂酪胺受体基因在不同组织中的表达分析

利用 qRT-PCR 分析了中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因在不同组织中的表达情况，结果见图 2 所示。由图 2 可知，*Actyr1* 和 *Actyr2* 均在中华蜜蜂头部（去除触角）的表达量最高，显著高于触角、胸部肌肉、腹部表皮中的表达量，*Actyr1* 在胸部肌肉中几乎不表达。

2.3 中华蜜蜂酪胺受体基因在大脑中的表达定位

经地高辛原位杂交，*Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂大脑蘑菇体的凯尼恩细胞、触角叶周围的细胞以及侧前桥神经纤维网细胞均有阳性着色（图 3）。另外，*Actyr1* 在髓质与小叶之间的细胞也有阳性着色。

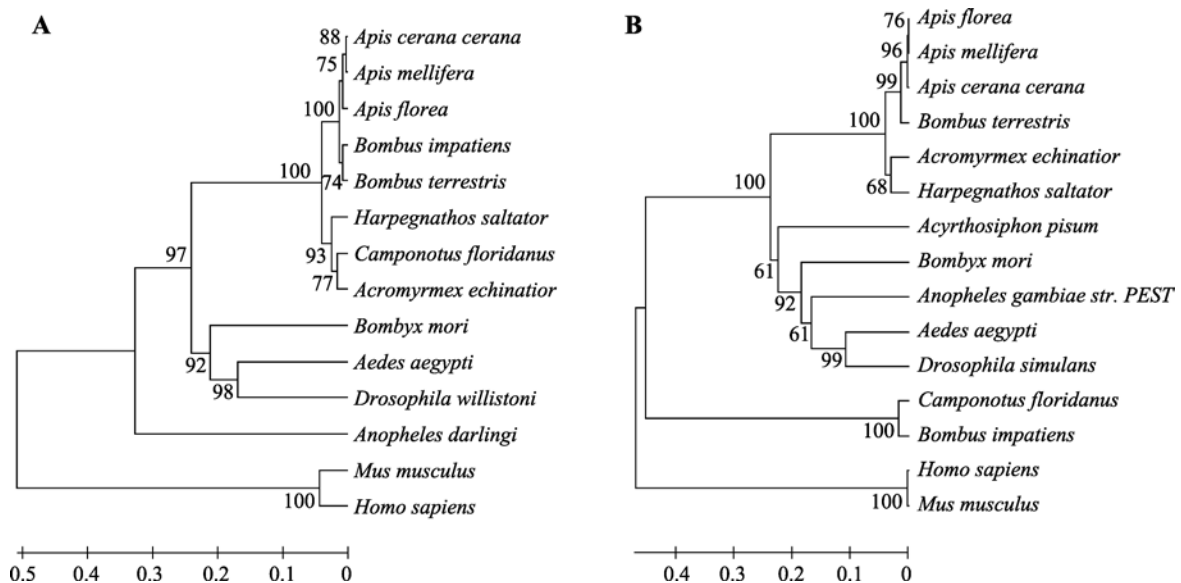


图 1 中华蜜蜂与其他物种 Tyr1、Tyr2 氨基酸序列系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino acid sequence of Tyr1、Tyr2 from *A. cerana cerana* and other species

A：中华蜜蜂与其他物种 Tyr1 系统进化树；B：中华蜜蜂与其他物种 Tyr2 系统进化树。

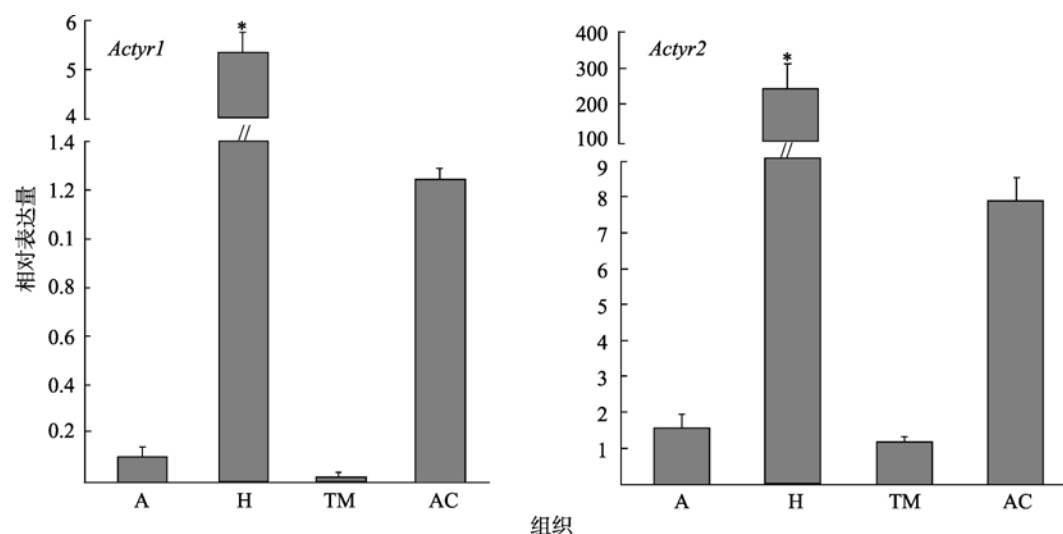


图 2 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂各组织中的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *Actyr1* and *Actyr2* in different tissues of *A. ceranacerana*

A: 触角; H: 头; TM: 胸部肌肉; AC: 腹部表皮。数值均以平均数 \pm SEM 计算; *表示 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在不同组织中的表达差异显著 ($P < 0.05$)。

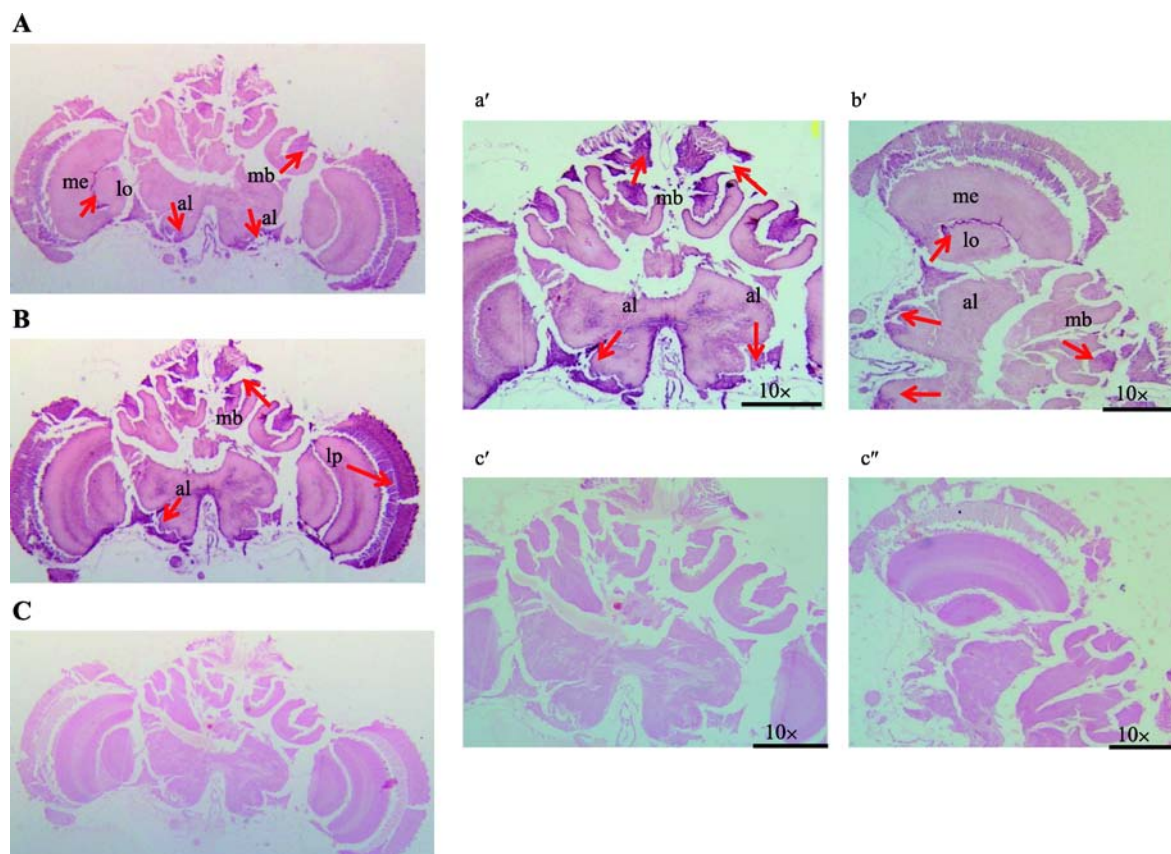


图 3 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂大脑中的表达定位

Fig. 3 Expression localization of *Actyr1* and *Actyr2* in the brain of *A. ceranacerana*

A、B: 分别表示 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂大脑中的表达部位; a'、b': 分别表示 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂大脑中阳性着色较强部位的放大图; C、c'、c'' 为空白对照。箭头表示阳性着色; mb: 蘑菇体; al: 触角叶; me: 髓质; lo: 小叶; lp: 侧前桥神经纤维网。

3 讨 论

本研究首次克隆获得中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因全长 cDNA 序列, 其长度分别为 1241 bp 和 1270 bp。系统进化分析结果表明, 中华蜜蜂 *Actyr1* 和 *Actyr2* 氨基酸序列与西方蜜蜂序列相似性较高, 且高度同源, 而且 *Amtyr1* 基因受体与果蝇的 *Dmtyr* 同源^[6,16]。上述结果表明, *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因编码酪氨受体。

研究已证实, 果蝇和西方蜜蜂的酪胺受体基因主要表达在头部(去除触角)—大脑的蘑菇体, 另外在果蝇的心脏肌肉和绛色细胞中特有表达^[6,17]。本研究对中华蜜蜂采集蜂的触角、头、胸部肌肉、腹部表皮 4 个组织中 *Actyr1* 和 *Actyr2* 的表达量进行了分析, 证实 *Actyr1* 和 *Actyr2* 也主要表达在中华蜜蜂的头部。另外, 腹部表皮中的表达量高于触角、胸部肌肉, 这可能是由于蜜蜂的心脏位于腹部, 有研究表明酪胺受体基因在蜜蜂的心脏中也有表达^[5,18]。

原位杂交结果表明, *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因在中华蜜蜂大脑的神经细胞中均有表达, 如蘑菇体凯尼恩细胞、触角叶周围细胞、中心体的神经区域以及髓质和小叶之间的细胞, 与西方蜜蜂大脑中的表达定位情况相似^[6,19,20]。已有研究证明蘑菇体与昆虫记忆的形成、恢复、储存直接相关^[21-23], 而在触角叶退化了的古老昆虫如蜉蝣目(Ephemeroptera)、蜻蜓目(Odonata)及石蛎目(Microcoryphia)中, 嗅觉记忆也几乎完全退化^[24-26]。另外, 章鱼胺受体(octopamine receptors)已被证明参与了蜜蜂感官信号的输入、触觉信号的输出以及大脑的高级认知功能^[27]。章鱼胺受体与酪胺受体同属起信号传导作用的 G 蛋白偶联受体, 且具有相似的结构和生理环境^[28,29], 因此, *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因可能参与调控了中华蜜蜂的学习记忆过程。

本研究发现 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因的表达谱一致, 均是在头部最高, 其次是在腹部表皮、触角和胸部肌肉, 且它们均在蘑菇体的凯尼恩细胞和触角叶周围细胞处的阳性着色较强, 可见 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因在大脑中的表达区域有重叠。我们推测酪胺受体基因可能在凯尼恩细胞或者触角叶周围细胞中互相

作用, 共同调控蜜蜂的部分生物学功能, 包括学习记忆。另外, 本研究首次发现 *Actyr1* 和 *Actyr2* 在中华蜜蜂腹部表皮中表达。但是 *Actyr1* 和 *Actyr2* 基因是如何共同调控蜜蜂的生物学功能, 参与了哪些关键信号通路以及如何影响中华蜜蜂学习记忆还有待于深入研究。

参考文献(References):

- [1] Avila FW, Bloch Qazi MC, Rubinstein CD, Wolfner MF. A requirement for the neuromodulators octopamine and tyramine in *Drosophila melanogaster* female sperm storage. *Proc Natl AcadSci USA*, 2012, 109(12): 4562-4567. [DOI]
- [2] Huang J, Liu W, Qi YX, Luo J, Montell C. Neuromodulation of courtship drive through tyramine-responsive neurons in the *Drosophila* brain. *CurrBiol*, 2016, 26(17): 2246-2256. [DOI]
- [3] Roeder T. Octopamine in invertebrates. *ProgNeurobiol*, 1999, 59(5): 533-561. [DOI]
- [4] Selcho M, Pauls D, el Jundi B, Stocker RF, Thum AS. The role of octopamine and tyramine in *Drosophila* larval locomotion. *J Comp Neurol*, 2012, 520(16): 3764-3785. [DOI]
- [5] Wu FS, Guo JY, Huang J, Ye GY. Advances in insect octopamine and tyramine. *Acta Entomol Sin*, 2010, 53(10): 1157-1166.
吴非凡, 郭建洋, 黄佳, 叶恭银. 昆虫体内章鱼胺和酪胺的研究进展. *昆虫学报*, 2010, 53(10): 1157-1166. [DOI]
- [6] Blenau W, Balfanz S, Baumann A. *Amtyr1*: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem*, 2000, 74(3): 900-908. [DOI]
- [7] 谢启文. 现代神经内分泌学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 1-40. [DOI]
- [8] Kutsukake M, Komatsu A, Yamamoto D, Ishiwa-Chigusa S. A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 2000, 245(1): 31-42. [DOI]
- [9] Yuan A, Guo YH, Wu XB, Huang X, Liao CH. Effects of dietary protein level on homing capability and Memory related gene expression of *Apis mellifera ligustica*. *Chin J Anim Nutr*, 2016, 28(1): 296-302.
袁安, 郭亚惠, 吴小波, 黄晓, 廖春华. 饲粮蛋白质水平对意大利蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响.

- 动物营养学报, 2016, 28(1): 296–302. [DOI]
- [10] Yuan A, Guo YH, Huang X, Liao CH, Wu XB. Effect of brood developmental temperature on the homing capability and memory related gene expression of worker bees *Apis mellifera* L. *Chin J Appl Entomol*, 2016, 53(6): 1261–1266.
- 袁安, 郭亚惠, 黄晓, 廖春华, 吴晓波. 发育温度对蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响. *应用昆虫学报*, 2016, 53(6): 1261–1266. [DOI]
- [11] Scheiner R, Reim T, Søvnik E, Entler BV, Barron AB, Thamm M. Learning, gustatory responsiveness and tyramine differences across nurse and forager honeybees. *J Exp Biol*, 2017, 220(Pt 8): 1443–1450. [DOI]
- [12] Abrol DP. Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. London: Springer, 2013. [DOI]
- [13] Chen SL. The Apicultural Science in China. Beijing: China Agriculture Press, 2001, 480–501.
- 陈盛祿. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001, 480–501. [DOI]
- [14] Qin QH, He XJ, Tian LQ, Zhang SW, Zeng ZJ. Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A*, 2012, 198(10): 777–786. [DOI]
- [15] van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen YP, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6481. [DOI]
- [16] Beggs KT, Tyndall JDA, Mercer AR. Honey bee dopamine and octopamine receptors linked to intracellular calcium signaling have a close phylogenetic and pharmacological relationship. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26809. [DOI]
- [17] El-Kholy S, Stephano F, Li Y, Bhandari A, Fink C, Roeder T. Expression analysis of octopamine and tyramine receptors in *Drosophila*. *Cell Tissue Res*, 2015, 361(3): 669–684. [DOI]
- [18] 曾志将. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社, 2007, 4–12. [DOI]
- [19] Humphries MA, Mustard JA, Hunter SJ, Mercer A, Ward V, Ebert PR. Invertebrate D2 type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J Neurobiol*, 2003, 55(3): 315–330. [DOI]
- [20] Beggs KT, Hamilton IS, Kurshan PT, Mustard JA, Mercer AR. Characterization of a D2-like dopamine receptor (*Am-DOP3*) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(8): 873–882. [DOI]
- [21] Popov AV, Peresleni AI, Savvateeva-Popova EV, Wolf R, Heisenberg M. The role of the mushroom bodies and of the central complex of *Drosophila melanogaster* brain in the organization of courtship behavior and communicative sound production. *Evol Biochem Physiol*, 2004, 40(6): 641–652. [DOI]
- [22] Falibene A, Roces F, Rössler W. Long-term avoidance memory formation is associated with a transient increase in mushroom body synaptic complexes in leaf-cutting ants. *Front Behav Neuro Sci*, 2015, 9: 84. [DOI]
- [23] Hammer M, Menzel R. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem*, 1998, 5(1–2): 146–156. [DOI]
- [24] Strausfeld NJ, Hansen L, Li Y, Gomez RS, Ito K. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem*, 1998, 5(1–2): 11–37. [DOI]
- [25] Lin C, Strausfeld NJ. Visual inputs to the mushroom body calyces of the whirligig beetle *Dineutus sublineatus*: modality switching in an insect. *J Comp Neurol*, 2012, 520(12): 2562–2574. [DOI]
- [26] Rebora M, Dell’Oto A, Rybak J, Piersanti S, Gaino E, Hansson BS. The antennal lobe of *Libellula depressa* (Odonata, Libellulidae). *Zoology*, 2013, 116(4): 205–214. [DOI]
- [27] Grohmann L, Blenau W, Erber J, Ebert PR, Strünker T, Baumann A. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem*, 2003, 86(3): 725–735. [DOI]
- [28] Roeder T. Metabotropic histamine receptors—nothing for invertebrates? *Eur J Pharmacol*, 2003, 466(1–2): 85–90. [DOI]
- [29] Roeder T. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol*, 2005, 50: 447–477. [DOI]

(责任编辑: 任军)