



杨晨, 颜幸超, 江武军, 等. 中草药烟熏对西方蜜蜂抗氧化酶、解毒酶活性及其基因表达的影响[J]. 江西农业大学学报, 2024, 46(2): 456–466.

YANG C, YAN X C, JIANG W J, et al. Effects of Chinese herbal medicine smoking on antioxidant enzymes, detoxification enzymes activity, and gene expression in western honeybee (*Apis mellifera*)[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(2): 456–466.

中草药烟熏对西方蜜蜂抗氧化酶、解毒酶活性及其基因表达的影响

杨晨¹, 颜幸超¹, 江武军², 胡景华², 史莹³, 黄张宁庆¹, 何旭江^{1*}

(1. 江西农业大学 蜜蜂研究所, 江西 南昌 330045; 2. 江西省养蜂研究所, 江西 南昌 330052; 3. 江西省九江市武宁县农业农村局, 江西 九江 332300)

摘要:【目的】蜜蜂疾病是影响养蜂业发展的重要因素之一, 可显著降低蜂群繁殖速度、蜂产品产量和品质, 甚至造成蜜蜂大量死亡。旨在研究中草药烟熏对蜜蜂的抗氧化能力和解毒能力的影响, 进而探究中草药烟熏对蜜蜂的影响, 为探寻新型蜜蜂病虫害绿色防控方式提供科学依据。【方法】以西方蜜蜂(*Apis mellifera*)为研究对象, 选用1 260只健康1日龄西方蜜蜂工蜂, 随机分成6组, 每组3个生物学重复, 每个重复70只蜜蜂。使用干稻草(对照组)、艾草、蒲公英、虎杖、忍冬藤、板蓝根6种干草作为烟熏燃料, 从2日龄开始烟熏, 每48 h烟熏1次。每天记录各组蜜蜂死亡率, 第14天烟熏6 h后分别测定各组抗氧化酶活性和解毒酶活性, 以及相关免疫基因和解毒基因表达。【结果】与对照组相比, 中草药烟熏显著改变健康蜜蜂的存活率、抗氧化酶活性和解毒酶活性。蒲公英组的存活率显著降低($P<0.05$), 但其他组蜜蜂的存活率与对照组差异不显著($P>0.05$)。与对照组相比, 艾草组、蒲公英组和板蓝根组超氧化物歧化酶活性显著升高($P<0.05$); 艾草组、蒲公英组、忍冬藤组过氧化氢酶活性显著升高($P<0.05$); 蒲公英组、虎杖组总抗氧化酶活性显著升高($P<0.05$); 艾草组、板蓝根组谷胱甘肽-S-转移酶活性显著升高($P<0.05$); 艾草组、蒲公英组、虎杖组乙酰胆碱酯酶活性显著升高; 艾草组细胞色素P450活性显著升高($P<0.05$)。对照组羧酸酯酶活性与中草药烟熏处理组无显著影响($P>0.05$)。此外, 艾草组显著上调*Vg*、*Defensin2*、*AmNOS*和*PTP-99A*基因表达($P<0.05$)。【结论】以艾草、蒲公英、虎杖、忍冬藤、板蓝根作为烟熏燃料, 可显著提高蜜蜂机体抗氧化和解毒能力, 其中艾草对提高蜜蜂抗氧化酶和解毒酶活性以及免疫和解毒相关基因表达量的效果最佳。因此, 利用中草药作蜜蜂烟熏材料在提高蜜蜂抵抗力的同时, 不增加劳动力成本, 不污染蜂产品, 是解决养蜂疾病防控的简单而有效途径, 对蜜蜂生态高效饲养和促进养蜂业发展具有重要意义。

关键词: 西方蜜蜂; 中草药; 烟熏; 抗氧化酶; 解毒酶; 免疫基因; 解毒基因

中图分类号: S894 文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2024)02-0456-11



收稿日期: 2023-11-29 修回日期: 2023-12-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1600202)、国家自然科学基金项目(32160815)和江西省主要学术学科与技术带头人项目(20204BCJL23041)

Project supported by the National key research and development program(2022YFD1600202), National Natural Science Foundation of China(32160815) and Jiangxi Provincial Academic and Technical Leader Project(20204BCJL23041)

作者简介: 杨晨, 硕士生, orcid.org/0009-0002-1045-6901, yc2000962021@163.com; *通信作者: 何旭江, 副研究员, 博士, 主要从事蜜蜂生物学研究, orcid.org/0000-0001-7445-8944, hexujiang3@163.com。

©《江西农业大学学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

Effects of Chinese herbal medicine smoking on antioxidant enzymes, detoxification enzymes activity, and gene expression in western honeybee (*Apis mellifera*)

YANG Chen¹, YAN Xingchao¹, JIANG Wujun², HU Jinghua²,
SHI Ying³, HUANG Zhangningqing¹, HE Xujiang^{1*}

(1.Institute of Honeybee, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.Institute of Honeybee of Jiangxi Province, Nanchang 330052, China; 3. Rural Bureau of Wuning County, Jiujiang City of Jiangxi Province, Jiujiang, Jiangxi 332300, China)

Abstract: [Objective] As a significant hindrance to beekeeping industry, honeybee diseases can decrease the reproductive rate of colonies, the quality and yield of bee products, and even potentially causing colony loss. This study aims to study the effects of herbal fumigation on the antioxidant and detoxification capacity of honeybees, thus providing a scientific basis for exploring new green prevention and control techniques for honey bee pests and diseases. [Method] The west honeybees (*Apis mellifera*) were used as experimental materials, a total of 1260 healthy one-day-old worker honeybees were randomly divided into 6 groups, each group had three biological replicates, consisting of 70 honeybees per biological replicate. A large amount of smoke was generated using straw (control group), *Artemisia argyi*, *Taraxacum mongolicum* Hand, *Reynoutria japonica* Houtt, *Lonicera japonica* Thunb, and *Isatis tinctoria* Linnaeus. Smoke was administered once every other day from the 2nd day after emerging. Each group's daily mortality rate was recorded. The antioxidant enzyme, detoxification enzyme activity, related immune and detoxification gene expression were measured after exposing them to Chinese herbal smoke for 6 hours a day for 14 days. [Result] The experiment revealed that the Chinese herbal smoking had a significant impact on the survival rate, the antioxidant enzyme and detoxification enzyme activities of the healthy honeybees. The *Taraxacum mongolicum* Hand group had a significantly reduced survival rate in comparison with that of the control group ($P < 0.05$), whereas there was no significant difference between the control group and other Chinese herbal groups ($P > 0.05$). The *Artemisia argyi*, *Taraxacum mongolicum* Hand and *Isatis tinctoria* Linnaeus groups exhibited significantly increased activities of Super Oxidase Dimutase in comparison with that of the control group ($P < 0.05$). The Peroxidase activities of the *Artemisia argyi*, *Taraxacum mongolicum* Hand and *Lonicera japonica* Thunb groups were also significantly increased compared with that of the control group ($P < 0.05$). The Total Antioxidant Capacity enzyme activities of the *Taraxacum mongolicum* Hand and *Reynoutria japonica* Houtt groups were also significantly increased in comparison with that of the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the activity of Glutathione S transferase significantly increased in the *Artemisia argyi* and *Isatis tinctoria* Linnaeus groups ($P < 0.05$); The activity of Acetylcholinesterase in the *Artemisia argyi*, *Taraxacum mongolicum* Hand and *Reynoutria japonica* Houtt groups significantly increased ($P < 0.05$). The activity of Cytochrome P450 significantly increased in the *Artemisia argyi* group ($P < 0.05$). No significant effect was found between carboxylesterase activity in the control group and the Chinese herbal medicine smoking groups ($P > 0.05$). In addition, the *Artemisia argyi* group significantly up-regulated gene expression of *Vg*, *Defensin2*, *AmNOS* and *PTP-99A* ($P < 0.05$). [Conclusion] Using *Artemisia argyi*, *Taraxacum mongolicum* H and, *Reynoutria japonica* Houtt, *Lonicera japonica* Thunb, and *Isatis tinctoria* Linnaeus for smoking apparatus in beekeeping can greatly enhance the honeybee's antioxidant and detoxifying ability, among which the *Artemisia argyi* was the most effective in increasing the activities of antioxidant, detoxification enzymes and the expression of immune, detoxification-related genes in honeybee. Therefore, the use of Chinese herbal medicine as honeybee fumigation materials is a simple and effective way to

solve the problem of beekeeping disease prevention and control without increasing labour costs and contaminating bee products while improving bee resistance, and it is of great significance to the ecological and efficient rearing of honeybee and the promotion of apiculture.

Keywords: *Apis mellifera*; Chinese herbal; smoking; antioxidant enzymes; detoxification enzymes; immune genes; detoxification genes

【研究意义】蜜蜂是一种重要的经济昆虫,是现代农业的重要组成部分,也是自然界最重要的传粉者之一^[1-2]。除了维持生态系统平衡,蜜蜂还提供许多营养丰富的蜂产品^[3]。然而,近年来,世界各地蜜蜂受到生物及非生物因素压力的影响,出现了蜂群衰竭失调(colony collapse disorder, CCD)和极高的冬季死亡率^[4-5]。在近十年中,美国的蜜蜂数量已经大幅减少,特别是2019年冬季蜜蜂的死亡率超过40%^[6]。许多病原体 and 寄生虫严重影响着蜜蜂的健康^[7-10],如肠道寄生虫[东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)、蜜蜂孢子虫(*Nosema apis*)]、病毒[蜜蜂残翅病毒(deformed wing virus)、囊状幼虫病毒(sacbrood virus)、以色列蜜蜂急性麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus)]和外部寄生虫[(狄斯瓦螨(*Varroa destructor*)、亮热厉螨(*Tropilaelaps infestation*)]等。因此,蜜蜂健康繁殖已成为科学研究的热点。中草药是一种宝贵的医疗资源。几千年来,中草药在许多临床治疗中发挥了重要作用。中草药含有多种有效成分,如黄酮类(flavonoids)、多糖(polysaccharide)、有机酸(organic acids)、皂苷(saponin)、生物碱(alkaloid)等^[11-12]。其主要活性成分具有抗病原微生物、促进生长、抗应激、抗氧化以及提高机体免疫力等多种功效^[13-19]。在畜禽养殖业中,中草药的作用功效与抗生素及其他抗病虫害的药物功效相似,甚至更加有效^[20-21]。中草药因其作用方式独特、效果好、无残留、无污染、无耐药性等优点,在畜牧业中得到越来越多的应用^[22]。因此,将中草药应用到蜜蜂养殖生产中,不仅能帮助蜜蜂抵御各类疾病,还能解决蜂产品抗生素残留问题,对养蜂业的发展有重要意义,同时可以提高我国整体蜂产品品质和国际市场竞争力。【前人研究进展】白文凤等^[23]发现使用芹菜(*Apium graveolens*)籽熏杀蜂螨效果较好,狄斯瓦螨死亡率高达80%。研究还发现芹菜籽中的香芹酚(carvacrol)、邻伞花烃(O-cymene)和萜品烯(A-terpinene)3种主成分物质杀螨效果最强。苏晓玲等^[24]在实验室条件下发现丁香油和茴香油对狄斯瓦螨具有较好的熏杀能力。郑火青等^[25]在不严重伤害蜜蜂的情况下评估了11种中药材精油对蜂螨的熏蒸效果,研究发现芳香玫瑰木(odoriferous rosewood)精油和茴香(fennel)精油的杀螨率达65%以上,具有较大的应用潜力。研究还发现穿心莲(*Andrographis paniculata*)汤剂的2种单体穿心莲内酯(andrographolide)和脱氢穿心莲内酯(dehydrographolide)能有效抑制微孢子虫孢子^[26]。李继莲等^[27]研究发现使用腺苷(adenosine)和L-脯氨酸(L-proline)2种板蓝根提取物能有效抑制中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus)对中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)幼虫生长发育的影响,并通过下调感染幼虫免疫基因的表达来调节宿主的免疫反应。Stamets等^[28]发现多孔蘑菇菌丝的提取物以剂量依赖性的方式降低蜜蜂残翅病毒和西奈湖病毒(Lake Sinai virus)。在田间试验中,饲喂灵芝(*Ganoderma lucidum* Curtis)提取物的蜂群,蜜蜂残翅病毒量降低79倍,西奈湖病毒量降低45 000倍。Pascual等^[29]研究发现葡萄酿酒后的渣粉中含有高剂量的花青素(anthocyanidin),将葡萄渣粉作为蜜蜂的膳食补充剂可显著增强蜜蜂对残翅病毒的免疫反应。邓位喜等^[30]使用中草药组方“消腐汤”防治中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病(European foulbrood)的治愈率为58.82%,有效率为76.47%,且效果显著优于抗生素组。

【本研究切入点】前人研究已证实中草药在蜜蜂养殖过程中具有良好的有效性、实用性和可行性。虽然已有蜂农将艾草作为喷烟器燃料进行烟熏,但没有具体系统性研究报道中草药烟熏对蜜蜂是否能够产生有利影响。本研究使用中草药替代喷烟器中的发烟材料,探究中草药烟熏是否对蜜蜂健康养殖产生有利影响,为中草药烟熏应用于实际生产提供理论依据。【拟解决的关键问题】本研究拟选用艾草、虎杖、蒲公英、板蓝根、忍冬藤5种中草药为试验材料,探究其烟熏效果对蜜蜂存活率和体内抗氧化酶及解毒酶活性的影响,进而探究中草药烟熏处理对蜜蜂的影响,为蜜蜂生态健康饲养和养蜂业的发展提供参考。

1 材料与方

1.1 供试蜜蜂饲养

试验所用西方蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂群饲养于江西农业大学蜜蜂研究所,试验开展时间为2022年10月。从3群健康蜂群中各取出一张即将出房的封盖子脾置于35℃、相对湿度75%的恒温恒湿培养箱(DHK 150S,上海埃开仪器设备有限公司),12 h后收集3张巢脾上的出房幼蜂1 260只,随机分为6组,每组3个生物学重复,每个生物学重复70只蜜蜂。在实验室条件下使用特制塑料饲养杯饲养蜜蜂,并放置恒温恒湿培养箱中饲养14 d。每天更换1次质量浓度500 g/L蔗糖水,并记录蜜蜂存活率。

1.2 试验饲养装置

饲养蜜蜂装置底部直径12 cm,顶部直径8 cm,高15 cm。装置主要由进烟通道、通气通道、饲喂通道组成(图1)。中草药干草燃烧产生的烟雾通过进烟通道进入杯中。杯子周围设有通气通道,底部两侧存在两个饲喂通道,用于插入装有质量浓度500 g/L蔗糖水的1.5 mL离心管。此外,饲喂通道也是取出死亡蜜蜂的通道。

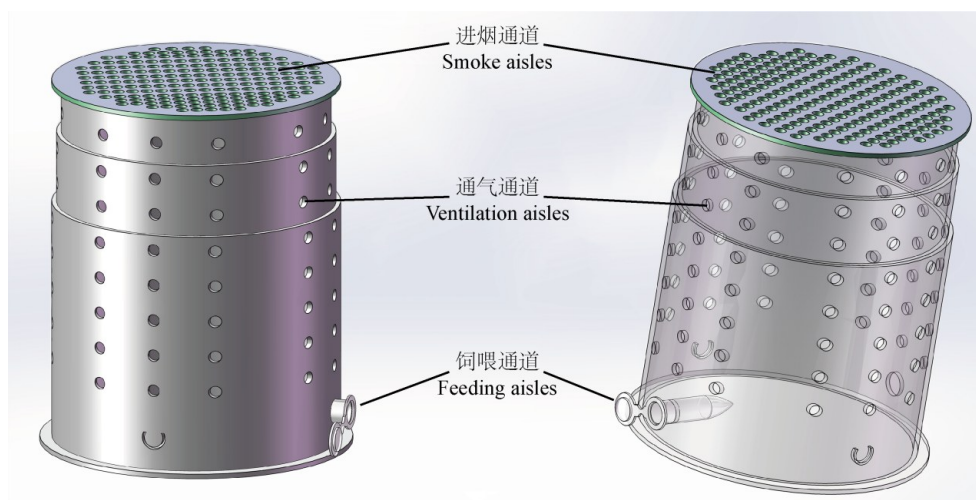


图1 蜜蜂中草药烟熏处理饲养装置

Fig.1 Honeybee feeding device of Chinese herbal medicine smoke treatment schematic

1.3 中草药烟熏处理

本试验选用艾草(*Artemisia argyi*)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand)、虎杖(*Reynoutria japonica* Houtt)、忍冬藤(*Lonicera japonica* Thunb)、板蓝根(*Isatis tinctoria* Linnaeus)5种中草药干草,均购自北京同仁堂中药有限公司。对照组采用干稻草燃烧处理。第2天起,燃烧中草药产生大量烟雾,将饲养装置中的进烟通道置于中草药发烟点上方50 cm处,烟雾从进烟通道进入饲养蜜蜂的装置,对装置内的蜜蜂烟熏30 s。每48 h烟熏1次。第14天烟熏处理6 h后,使用液氮将蜜蜂快速冷冻30 s后移至-80℃冰箱保存。

1.4 酶液制备及抗氧化酶、解毒酶活性检测

1.4.1 酶液制备

随机取各试验组中24只蜜蜂(每个重复8只),分别按1:9的比例加入无菌生理盐水,使用匀浆机(SN1006109,安倍医疗器械贸易有限公司)将组织样本研磨成组织匀浆^[31]。在25℃、3 000 r/min下离心10 min取上清液放置于1.5 mL无菌无酶离心管中,并保存于-20℃冰箱中。为确保酶活性,2 d内完成检测。

1.4.2 抗氧化酶、解毒酶活性检测

本试验共检测超氧化物歧化酶(super oxidase dimutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、总抗氧化酶(total antioxidant capacity, T-AOC)3种抗氧化酶和羧酸酯酶(carboxylesterase, CES)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S transferase, GST)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)4种解毒酶^[32-34]。以上所用酶活性试剂盒均购自上海酶联生物技术有限公司。参

考试试剂盒说明,采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附法进行检测,使用 VT0544-0998 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)在 450 nm 处测定吸光度(OD 值)。用 ELISACALE 软件拟合标准曲线,并根据标准曲线计算酶的活性值。各组每种酶随机检测 12 只蜜蜂,每个重复 4 只。

1.5 RNA 提取、反转录及免疫与解毒基因 qPCR 检测

1.5.1 RNA 提取

从对照组和艾草组各随机取蜜蜂 3 只(每个生物学重复各提取 1 只),使用 *TransZol Up Plus RNA Kit* (ER501-01-V2,北京全式金生物)提取整只蜜蜂总 RNA。采用 NanoDrop™ ONE^c微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司)检测 RNA 浓度。

1.5.2 反转录

按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒(RR037Q,Takara)说明,在 T100™ PCR 仪(伯乐生命医学产品有限公司)将总 RNA 反转录为 cDNA。具体步骤为:将 10 μL 反应体系 I (2 μL 总 RNA、5 μL RNase Free dH₂O、1 μL gDNA Eraser、2 μL 5x gDNA Eraser Buffer)放入 PCR 仪中 42 °C 反应 2 min,待温度降到 4 °C 时将板子拿出,加入 10 μL 反应体系 II (1 μL PrimeScript PT Enzyme Mix I、4 μL 5x gDNA Eraser Buffer、2 μL RT Primer Mix、4 μL RNase Free dH₂O)后再次放入 PCR 仪中,反应条件为:37 °C 10 min, 85 °C 5 s,待温度降到 4 °C 后反应完成获得第一链 cDNA。

1.5.3 免疫与解毒基因 qPCR 检测

按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(RR820Q,Takara)说明,在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)进行测定。20 μL 反应体系(10 μL TB Green Fast qPCR Mix、0.4 μL ROX、上下游引物各 0.8 μL、2 μL cDNA、6 μL ddH₂O)。qRT-PCR 反应条件为:50 °C 预变性 2 min;95 °C 10 min,1 个循环;95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 1 min,40 个循环;95 °C 延伸 15 s。以 *β-actin* 作为内参基因,参考并选取 3 个蜜蜂免疫基因 *Domeless*, *Vitellogenin (Vg)*, *Defensin2*^[35-36] 和 3 个解毒基因 Nitric oxide synthase (*NOS*) (*AmNOS*), *Glutathione S-transferase S3 (GSTS3)*, *Protein tyrosinephosphatase 99A (PTP-99A)*^[37],按照上述方法进行实时荧光定量 qPCR 试验。基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列信息
Tab.1 Primers sequences in RT-qPCR assay

基因 Genes	正向引物 F. primer(5'-3')	反向引物 R. primer(5'-3')	退火温度/°C <i>T_m</i>
<i>β-actin</i>	ATGCCAACACTGTCTTTCTGG	GACCCACCAATCCATACGGA	57.5
<i>Domeless</i>	TTGTGCTCCTGAAAATGCTG	AACCTCCAAATCGCTCTGTG	54.3
<i>Vg</i>	TCTCACGCATCACGAATA	GGAGGAGTACCAGGTAAGGT	56.8
<i>Defensin2</i>	TGCGACGTTTATCATGGCA	ACGCCATTTCTGCAACTACC	55.3
<i>AmNOS</i>	TCCACTCGCAGGTACTTTCC	TCTGGAGGATCACCATTTC	55.5
<i>PTP-99A</i>	CGCGCGAGTAAGAGAAAGAG	TGGAACAAGGGAACGAAAC	54.5
<i>GSTS3</i>	TGCATATGCTGGCATTGATT	TCCTCGCCAAGTATCTTGCT	53.6

1.6 统计分析

使用 SPSS 26 进行统计分析。其中,Kaplan-Meier 检验各组蜜蜂存活率与对照组之间的差异性,采用单因素方差分析 Wilcoxon 检验各组酶活性与对照组之间的差异性。使用独立样本 *t* 检验艾草组与对照组之间的基因表达量的差异性。*P*<0.05 为差异显著。

2 结 果

2.1 中草药烟熏处理对西方蜜蜂存活率的影响

由图 2 可知,不同中草药烟熏处理对西方蜜蜂的存活率存在差异。与对照组相比,蒲公英组存活率显著降低(*P*<0.05)。中草药烟熏处理组间,艾草组、蒲公英组和虎杖组蜜蜂存活率显著低于板蓝根组(*P*<0.05);蒲公英组蜜蜂存活率显著低于忍冬藤组(*P*<0.05)。艾草组、板蓝根组和虎杖组蜜蜂存活率与对照组差异均不显著(*P*>0.05)。

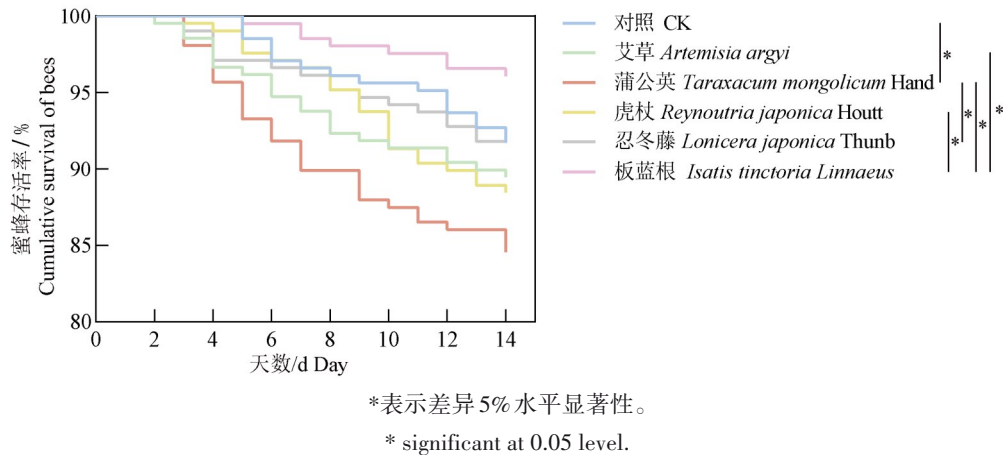


图2 中草药烟熏处理对蜜蜂存活率的影响
Fig.2 Honeybee survival rate following challenge during the smoking treatment of Chinese herbal medicine

2.2 中草药烟熏处理对西方蜜蜂抗氧化酶活性的影响

由图3可知,中草药烟熏处理可显著影响蜜蜂抗氧化酶的活性含量。图3A结果显示,艾草组、蒲公英组和板蓝根组SOD活性显著高于对照组($P<0.05$),且艾草组SOD含量显著高于其他中草药烟熏处理组($P<0.05$)。中草药烟熏处理组间SOD活性对比结果显示,蒲公英组和板蓝根组显著高于虎杖组和忍冬藤组($P<0.05$)。蒲公英组和板蓝根组之间,对照组、虎杖组和忍冬藤组之间SOD含量无显著差异($P>0.05$);图3B结果显示,艾草组、蒲公英组和忍冬藤组POD活性显著高于对照组($P<0.05$)。中草药烟熏处理组间POD活性对比结果显示,艾草组显著高于虎杖组、忍冬藤组和板蓝根组($P<0.05$);蒲公英组显著高于虎杖组和板蓝根组($P<0.05$);虎杖组显著高于板蓝根组($P<0.05$)。艾草组和蒲公英组之间,蒲公英组和忍冬藤组之间,虎杖组和忍冬藤组之间,CK组和虎杖组之间,对照组和板蓝根组之间POD活性差异不显著($P>0.05$);图3C结果显示,蒲公英组、虎杖组T-AOC活性显著高于对照组($P<0.05$)。中草药烟熏处理组间T-AOC活性对比结果显示,蒲公英组显著高于忍冬藤组和板蓝根组($P<0.05$),艾草组、虎杖组和忍冬藤组显著高于板蓝根组($P<0.05$)。艾草组、蒲公英组和虎杖组之间,艾草组、虎杖组和忍冬藤组之间,对照组、艾草组、忍冬藤组和板蓝根组之间T-AOC活性均无显著性差异($P>0.05$)。

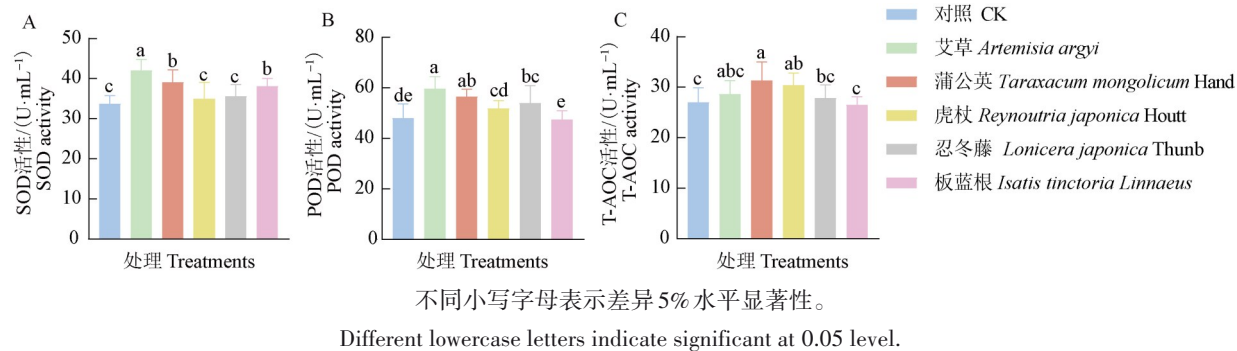


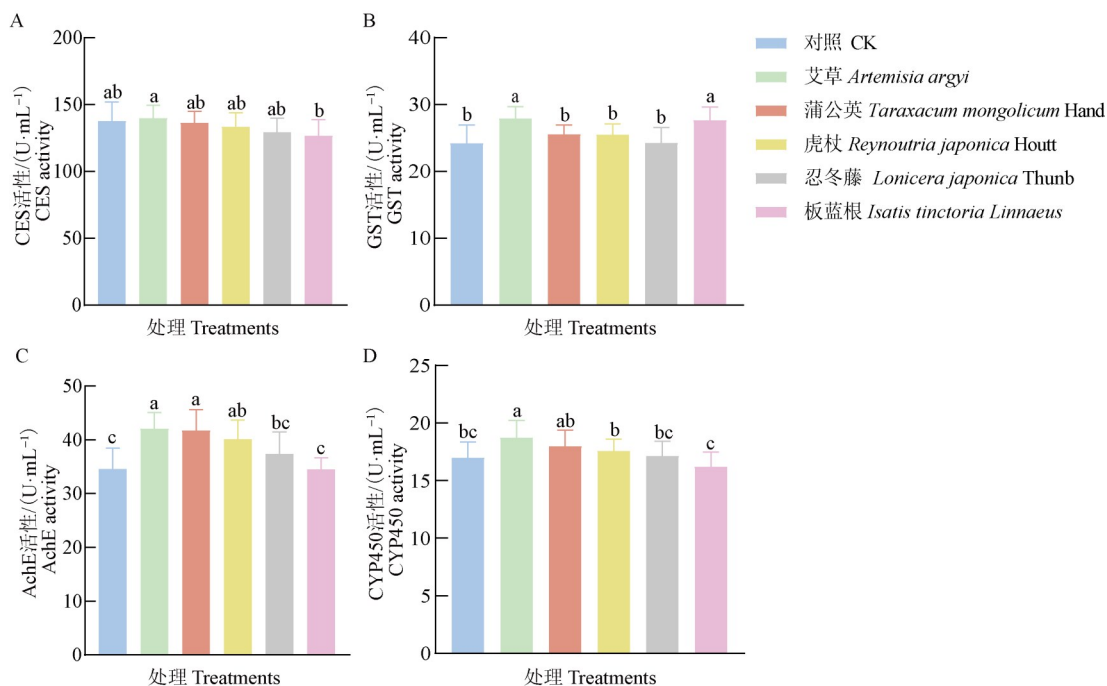
图3 中草药烟熏处理对蜜蜂抗氧化酶活性的影响

Fig.3 Effect of Chinese herbal smoke treatment on antioxidant enzymes activity in honeybee

2.3 中草药烟熏处理对西方蜜蜂解毒酶活性的影响

由图4可知,中草药烟熏处理可影响蜜蜂解毒酶的活性含量。图4A结果显示,艾草组CES活性显著高于板蓝根组($P<0.05$),对照组、艾草组、蒲公英组、虎杖组和忍冬藤组之间,对照组、蒲公英组、虎杖组、忍冬藤组和板蓝根组之间CES活性无显著差异($P>0.05$);图4B结果显示,艾草组和板蓝根组GST活性显著高于对照组、蒲公英组、虎杖组和忍冬藤组($P<0.05$)。艾草组和板蓝根组之间,对照组、蒲公英组、虎杖组和忍冬藤组之间GST活性无显著差异($P>0.05$);图4C结果显示,艾草组、蒲公英组、虎杖组AchE活

性显著高于对照组($P<0.05$)。中草药烟熏处理组间 AchE 活性对比结果显示,艾草组和蒲公英组显著高于忍冬藤组和板蓝根组($P<0.05$),虎杖组显著高于忍冬藤组($P<0.05$)。艾草组、蒲公英组和虎杖组之间,虎杖组和忍冬藤组之间,对照组、忍冬藤组和板蓝根组之间 AchE 活性无显著差异($P>0.05$);图 4D 结果显示,艾草组 CYP450 活性显著高于对照组($P<0.05$)。中草药烟熏处理组间 CYP450 活性对比结果显示,艾草组显著高于虎杖组、忍冬藤组和板蓝根组($P<0.05$),蒲公英组和虎杖组显著高于板蓝根组($P<0.05$),艾草组和蒲公英组之间,对照组、蒲公英组、虎杖组和忍冬藤组之间,对照组、忍冬藤组和板蓝根组之间 CYP450 活性含量无显著差异($P>0.05$)。



不同小写字母表示差异 5% 水平显著性。

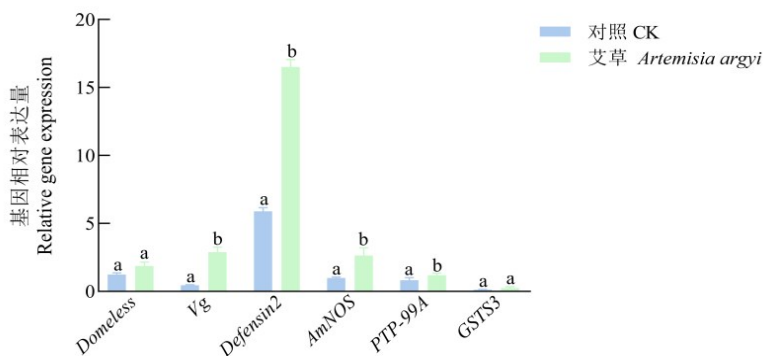
Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level.

图 4 中草药烟熏处理对蜜蜂解毒酶活性的影响

Fig.4 Effect of Chinese herbal smoke treatment on detoxification enzymes activity in honeybee.

2.4 艾草烟熏处理对西方蜜蜂免疫基因和解毒基因表达量的影响

由图 5 可知,艾草烟熏处理可影响蜜蜂免疫基因和解毒基因表达量。与对照组相比,艾草烟熏处理后显著上调 *Vg*、*Defensin2*、*AmNOS* 和 *PTP-99A* 基因的表达量($P<0.05$),而 *Domeless*、*GSTS3* 基因与对照组的表达量无显著差异($P>0.05$)。



不同小写字母表示差异 5% 水平显著性。

Different lowercase letters indicate significant at 0.05 level.

图 5 艾草烟熏处理对蜜蜂免疫基因和解毒基因表达量的影响

Fig.5 Effect of wormwood fumigation treatment on the expression of immune and detoxification genes in honeybee

3 讨论

蜜蜂具有极高的生态和经济价值,对保护自然环境和农业生产有着重要的作用^[1,38-39]。近年来,生物和非生物胁迫对蜜蜂健康遭到了很大影响,如入侵性大黄蜂、外寄生螨、病毒、有害微生物和农用化学品等^[40-43]。蜜蜂健康的研究逐渐成为蜜蜂科学领域的热点和难点。

本试验利用艾草、虎杖、蒲公英、板蓝根、忍冬藤5种中草药作为烟熏材料对蜜蜂进行烟熏处理,在相同环境下,板蓝根作为烟熏材料能够提升蜜蜂的存活率,但蒲公英组的蜜蜂存活率最低,且显著低于对照组、忍冬藤组和板蓝根组。这可能是以蒲公英作为燃料产生的烟雾可能对蜜蜂具有一定毒性。张城达等^[44]研究发现高剂量的复方蒲公英制剂对幼龄大鼠有一定的毒性作用。蜜蜂机体内酶活性含量结果显示,以艾草和蒲公英等中草药作为烟熏材料能显著提高蜜蜂体内多种抗氧化酶和解毒酶活性。艾草烟熏处理显著提高了SOD、POD、GST、AchE、CYP450活性,蒲公英烟熏处理显著提高了SOD、POD、T-AOC、AchE活性,其效果甚至优于其他中草药烟熏处理组。研究^[45-47]表明中草药中的有效活性成分对超氧化物和羟基自由基具有清除作用,可能通过激活MAPK信号级联、激活蛋白-1、Fox转录因子等信号通路,从而抑制体内氧化应激。因此,艾草等中草药也可以提高蜜蜂的抗氧化酶和解毒酶活性。此外,本研究还发现艾草烟熏治疗后可促进免疫基因和解毒基因表达,Vg、Defensin2、AmNOS和PTP-99A基因显著上调。研究^[48-49]发现,Vg蛋白可以通过清除自由基,减少氧化应激,从而提高抗氧化性能。此外,Defensin 2基因是蜜蜂免疫效应抗菌肽中的一种^[50]。抗菌肽在昆虫先天性免疫系统中起重要的作用,是昆虫体液免疫调节的重要功能物质^[51]。本研究发现艾草处理组能够显著上调蜜蜂机体Vg基因的表达,并发现Defensin 2基因上调表达量约高出2.8倍,表明艾草处理组可有效提高蜜蜂机体的抗氧化和免疫水平。因此,选用适宜的中草药作为烟熏材料很有可能对蜜蜂产生正向、积极的影响,对于延长蜜蜂寿命、防治病虫害、改善蜜蜂健康、提升蜂产品质量等方面具有一定的应用前景。

中草药作为一种良好的抗生素替代品,在蜜蜂产业领域中具有广泛的应用潜质和发展前景。虽然将中草药作为保健品或防治病虫害已初步应用于养蜂业^[52-56],但这些用药很多由蜂农自身经验试验得来,缺乏科学的理论依据,容易忽视其本身对蜜蜂的毒性作用,阻碍了中草药的实践生产应用。未来,可以结合基因功能组学、代谢组学、网络药理学、分子药理学等先进技术策略对其机制进行深入系统的研究,全面论证中草药的多靶点功能机制。利用先进技术对复杂活性成分进行提取分析,并对其中的单一成分进行定性定量分析,进而探究有效成分的作用机制。

烟熏作为蜜蜂养殖中常见的技术手段,在养蜂业中被普遍地运用,以中草药为烟熏材料进行烟熏处理在蜜蜂养殖领域是一个新的尝试,为养蜂业提供了一种可能的中草药投入生产的新途径,同时也可能是中草药在动物生产应用的新方法。最近的研究表明中草药渣经发酵之后,可以充分应用于动物生产中^[57],使用中草药渣作为烟熏材料或许是一种减少成本的方式。此外,应充分发挥我国中草药资源优势,开拓新型中草药资源,加强中草药中有效成分机制研究,探寻新型蜜蜂病虫害绿色防控技术,推动蜂产业的发展。

4 结论

艾草、虎杖、蒲公英、板蓝根、忍冬藤5种中草药作为烟熏材料能提高蜜蜂的存活率、体内抗氧化酶活性和解毒酶活性。尤其是艾草烟熏处理后,蜜蜂体内抗氧化酶活性和解毒酶活性最佳。艾草烟熏处理还可以提高免疫基因和解毒基因的表达量,但未来还需进一步对这些中草药潜在的应用价值进行评估,特别是确定中草药中发挥作用的有效成分。将中草药烟熏应用于实际生产中,探究烟熏对蜂群饲养管理、生产性能、繁殖性能等生物学特性的影响。因此,利用艾草等中草药作为蜜蜂饲养过程中的烟熏材料,可有效提高蜂群的抗氧化、解毒和免疫能力。这种简单高效的中草药烟熏方式,不增加养蜂劳动强度,也不污染蜂产品,在蜜蜂绿色生态高效养殖方面却有着重要作用,具有很好的实践性和高效性,对促进养蜂业高效发展,保护和利用蜜蜂资源具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] 曾志将.养蜂学[M].4版.北京:中国农业出版社,2023:1-80.

- ZENG Z J. Apiculture[M]. 4th ed. Beijing: China Agricultural Press, 2023, 1-80.
- [2] POTTS SG, IMPERATRIZ-FONSECA V, NGO HT, et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being[J]. Nature, 2016, 540(7632): 220-229.
- [3] DAINESE M, MARTIN EA, AIZEN MA, et al. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production[J]. Science advances, 2019, 5(10): eaax0121.
- [4] COX-FOSTER L D, CONLAN S, HOLMES C E, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder[J]. Science, 2007, 318(5848): 283-287.
- [5] SWITANEK M, CRAILSHEIM K, TRUHETZ H, et al. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate[J]. Science of the total environment, 2017, 579: 1581-1587.
- [6] BRUCKNER S, WILSON M, AURELL D, et al. A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: results from the bee informed partnership for 2017-18, 2018-19, and 2019-20[J]. Journal of apicultural research, 2023, 62(3): 429-443.
- [7] LI N, LI C, HU T, et al. Nationwide genomic surveillance reveals the prevalence and evolution of honeybee viruses in China[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 6.
- [8] BORBA RS, HOOVER SE, CURRIE RW, et al. Phenomic analysis of the honey bee pathogen-web and its dynamics on colony productivity, health and social immunity behaviors[J]. Plos one, 2022, 17(1): e0263273.
- [9] DEGRANDI-HOFFMAN G, CHEN Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees[J]. Current opinion in insect science, 2015, 10: 170-176.
- [10] MARTÍN-HERNÁNDEZ R, BARTOLOMÉ C, CHEJANOVSKY N, et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective[J]. Environmental microbiology, 2018, 20(4): 1302-1329.
- [11] ROBARDS K, PRENZLER P D, TUCKER G, et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits[J]. Food chemistry, 1999, 66(4): 401-436.
- [12] ZHU T, WANG L, FENG Y, et al. Classical active ingredients and extracts of Chinese herbal medicines: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and molecular mechanisms for ischemic stroke[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2021, 2021: 8868941.
- [13] HÆGGSTRÖM E, LUUKKALA M. Ultrasound detection and identification of foreign bodies in food products[J]. Food control, 2001, 12(1): 37-45.
- [14] 艾素, 汤伟, 郭若琳, 等. 微生物发酵中草药及其活性物质的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1110-1118.
- AI S, TANG W, GUO R L, et al. Research progress on Chinese herbal medicine fermentation and profile of active substances derived[J]. China journal of Chinese materia medica, 2019, 44(6): 1110-1118.
- [15] WU J, YANG C L, SHA Y K, et al. Koumine alleviates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction in IPEC-J2 cells by regulating Nrf2/NF- κ B pathway[J]. American journal of Chinese medicine, 2020, 48(1): 127-142.
- [16] LIU C, WEN W, SHAO J, et al. Fast and comprehensive characterization of chemical ingredients in traditional Chinese herbal medicines by extractive atmospheric pressure photoionization (EAPPI) mass spectrometry[J]. Rapid communications in mass spectrometry, 2017, 31(18): 1491-1498.
- [17] WU H W, FENG Y H, WANG D Y, et al. Effect of total flavones from *Cuscuta chinensis* on anti-abortion via the MAPK signaling pathway[J]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2018, 2018: 6356190.
- [18] REN Y, CHEN X, LI P, et al. Si-Miao-Yong-An decoction ameliorates cardiac function through restoring the equilibrium of SOD and NOX2 in heart failure mice[J]. Pharmacological research, 2019, 146: 104318.
- [19] HAN L, YANG J, JING L, et al. Tau-TCHF inhibits splenic apoptosis via PI3K-Akt signaling pathway in chickens[J]. Advances in experimental medicine and biology, 2019, 1155: 555-563.
- [20] 唐文雅, 聂福旭, 聂福霄, 等. 复方中草药添加剂对白羽王鸽生产性能、血液生化指标和胴体品质的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 2023, 42(5): 11-15.
- TANG W Y, NIE F X, NIE F X et al. Effects of adding compound Chinese herbal medicine additives in diets on productive performance, serum biochemical indexes and carcass quality of pigeon[J]. Journal of animal science and veterinary medicine, 2023, 42(5): 11-15.
- [21] 齐茜, 刘洪柏, 麦丽开, 等. 复方中草药对闪光鲟生长及血液生化指标的影响[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(01): 160-167.
- QI X, LIU H B, MAI L K, et al. Effects of Chinese medicinal herb compound additives on growth and blood biochemical indicator of *Acipenser stellatus*[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2016, 38(01): 160-167.

- [22] YIN B, LI W, QIN H, et al. The use of Chinese skullcap (*Scutellaria baicalensis*) and its extracts for sustainable animal production[J]. *Animals*, 2021, 11(4): 1039.
- [23] 白文凤, 黄强. 植物成分对蜂螨繁殖影响研究[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(6): 1496-1503.
BAI W F, HUANG Q. Study on effect of phytochemical on *Varroa destructor* reproduction[J]. *Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis*, 2023, 45(6): 1496-1503.
- [24] 苏晓玲, 郑火青, 费中华等. 中草药精油对蜜蜂狄斯瓦螨的熏杀效果[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(05): 1189-1195.
SU X L, ZHENG H Q, FEI Z H, et al. Effectiveness of herbal essential oils as fumigants to control *Varroa destructor* in laboratory assays[J]. *Chinese journal of applied entomology*, 2012, 49(05): 1189-1195.
- [25] LIN Z, SU X, WANG S, et al. Fumigant toxicity of eleven Chinese herbal essential oils against an ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) of the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of apicultural research*, 2020, 59(2): 204-210.
- [26] CHEN X, WANG S, XU Y, et al. Protective potential of Chinese herbal extracts against microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of western honey bees, *Apis mellifera* L [J]. *Journal of Asia-Pacific entomology*, 2021, 24(1): 502-512.
- [27] ZHANG X, SUN L, ZHAO D, et al. Adenosine and L-proline can possibly hinder Chinese sacbrood virus infection in honey bees via immune modulation[J]. *Virology*, 2022, 573: 29-38.
- [28] STAMETS P E, NAEGER N L, EVANS J D, et al. Extracts of polypore mushroom mycelia reduce viruses in honey bees [J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 13936.
- [29] PASCUAL G, SILVA D, VARGAS M, et al. Dietary supplement of grape wastes enhances honeybee immune system and reduces deformed wing virus (DWV) load [J]. *Antioxidants*, 2022, 12(1): 54.
- [30] 邓位喜, 刘廷江, 马啸天, 等. 中草药组方“消腐汤”防治中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病试验研究[J]. 湖北畜牧兽医, 2021, 42(5): 5-7.
DENG W X, LIU T J, MA X T, et al. Experimental study on the prevention and control of European larval putrefaction in Chinese honey bees by the Chinese herbal medicine formula “anti-rot soup” [J]. *Hubei journal of animal and veterinary medicine*, 2021, 42(5): 5-7.
- [31] 刘楠楠, 张发, 徐凯, 等. 欧洲黑蜂和新疆黑蜂越冬期抗氧化酶活性及相关基因表达分析[J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(5): 1051-1059.
LIU N N, ZHANG F, XU K, et al. Analysis of antioxidant enzyme activity and gene expression of European dark bee (*Apis mellifera mellifera*) and Xinjiang black bee during wintering period [J]. *Journal of environment entomology*, 2020, 42(5): 1051-1059.
- [32] 段辛乐, 熊曼琼, 刘文斌, 等. 苜蓿花期三种杀菌剂对意大利蜜蜂保护酶和解毒酶的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(11): 74-82.
DUAN X L, XIONG M Q, LIU W B, et al. Effects of three fungicides on the activities of protective enzymes and detoxifying enzymes in *Apis mellifera* [J]. *Acta prataculturae Sinica*, 2022, 29(11): 74-82.
- [33] 马卫华, 李新宇, 申晋山, 等. 温室环境对蜜蜂群势、抗氧化酶系和解毒酶系的影响[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(5): 1104-1110.
MA W H, LI X Y, SHEN J S, et al. The effect of the greenhouse environment on the antioxidant and detoxification enzyme systems of honeybee colonies [J]. *Chinese journal of applied entomology*, 2020, 57(5): 1104-1110.
- [34] 苏晓玲, 陈道印, 赵东绪, 等. 中华蜜蜂越冬期抗寒生理生化指标研究[J]. 环境昆虫学报, 2022, 44(3): 586-594.
SU X L, CHEN D Y, ZHAO D X, et al. Study on physiological and biochemical indexes of cold resistance of *Apis cerana cerana* during overwintering period [J]. *Journal of environmental entomology*, 2022, 44(3): 586-594.
- [35] HUANG Q, KRYGER P, LECONTE Y, et al. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections [J]. *Journal of invertebrate pathology*, 2012, 109(3): 297-302.
- [36] SEEHUUS SC, NORBERG K, GIMSA U, et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2006, 103(4): 962-967.
- [37] BONCRISTIANI H, UNDERWOOD R, SCHWARZ R, et al. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera* [J]. *Journal of insect physiology*, 2012, 58(5): 613-620.
- [38] 江慧枝, 江武军, 李震, 等. 优质山乌柏蜂蜜生产及其成分分析[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(6): 1473-1485.
JIANG H Z, JIANG W J, LI Z, et al. Production and composition analysis of high quality *Triadica cochinchinensis* honey [J]. *Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis*, 2023, 45(6): 1473-1485.

- [39] 李震,黄强,彭成涛,等.油茶授粉蜜蜂的培育与应用[J].江西农业大学学报,2023,45(4):944-951.
LI Z, HUANG Q, PENG C T, et al. Cultivation and application of *Camellia oleifera* pollination bees[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(4): 944-951.
- [40] DONG S, GU G, LIN T, et al. An inhibitory signal associated with danger reduces honeybee dopamine levels[J]. Current biology, 2023, 33(10): 2081-2087.
- [41] DONG Z X, TANG Q H, LI W L, et al. Honeybee (*Apis mellifera*) resistance to deltamethrin exposure by modulating the gut microbiota and improving immunity[J]. Environmental pollution, 2022, 314: 120340.
- [42] HUANG Q, LARIVIERE P J, POWELL J E, et al. Engineered gut symbiont inhibits microsporidian parasite and improves honey bee survival[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2023, 120(25): e2220922120.
- [43] WEI X, EVANS JD, CHEN Y, et al. Spillover and genome selection of the gut parasite *Nosema ceranae* between honey bee species[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2022, 12: 1026154.
- [44] 张城达,宋翼升,扈荣,等.复方蒲公英制剂幼龄大鼠重复给药毒性研究[J].中国比较医学杂志,2020,30(2):33-42.
ZHANG C D, SONG Y S, HU R, et al. Repeated doses toxicity of compound Taraxacum mongolicum extract in juvenile rats[J]. Chinese journal of comparative medicine, 2020, 30(2): 33-42.
- [45] FAN M, ZHANG X, SONG H, et al. Dandelion (*Taraxacum* genus): a review of chemical constituents and pharmacological effects[J]. Molecules, 2023, 28(13): 5022.
- [46] 牛晓静.中华蜜蜂 AccJNK 介导的 MAPK 级联通路响应农药胁迫的功能分析[D].泰安:山东农业大学,2023.
NIU X J. The function analysis of accJNK mediated MAPK cascade response to pesticide stress in *Apis cerana cerana* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023.
- [47] 王欣欣.中华蜜蜂 MKK6 基因介导的 MAPK 级联途径在氧化应激中的功能分析[D].泰安:山东农业大学,2019.
WANG X X. The function of *Apis cerana cerana* MKK6-mediated MAPK cascades in the oxidative stress response [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019.
- [48] AMDAM G V, AASE A L T O, SEEHUUS S C, et al. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers[J]. Experimental gerontology, 2005, 40(12): 939-947.
- [49] SEEHUUS SC, NORBERG K, GIMSA U, et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 962-7.
- [50] 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.
- [51] FERRANDON D, 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.
- [52] 杨晨,潘新琦,李子璇,等.中草药在蜜蜂养殖中的应用探讨[J].中国蜂业,2023,74(4):32-34.
YANG C, PAN X Q, LI Z X, et al. Discussion on the application of Chinese herbs in bee breeding[J]. Apiculture of China, 2023, 74(4): 32-34
- [53] 高先沛.中草药防治蜜蜂病虫害药方举例[J].蜜蜂杂志,2005(10):29-30
GAO X P. Examples of herbal remedies against honey bee pests and diseases[J]. Journal of bee, 2005(10): 29-30
- [54] 李绚,龙敏仪.蜜蜂白垩病的草药防治研究[J].家畜生态学报,2015,36(4):57-64.
LI X, LONG M Y. Research on herbal control of chalk disease in honey bees[J]. Journal of domestic animal ecology, 2015, 36(4): 57-64.
- [55] ÖZKIRIM A, KUCUKOZMEN B. Application of herbal essential oil extract mixture for honey bees (*Apis mellifera* L.) against *Nosema ceranae* and *Nosema apis* [J]. Journal of apicultural science, 2021, 65(1) 163-175.
- [56] 胡佑志.中草药防治蜜蜂蛹病[J].中国蜂业,2017,68(1):38.
HU Y Z. Control of honey bee pupal disease by Chinese herbs[J]. Apiculture of China, 2017, 68(1): 38.
- [57] 刘倩,赵德辉,杨雪,等.中草药渣发酵工艺及其在动物生产中的应用[J].中国饲料,2023(7):115-120.
LIU Q, ZHAO D H, YANG X, et al. Fermentation technology of Chinese medicine residue and its application in animal production[J]. China feed, 2023(7): 115-120.