

中草药精油对蜜蜂狄斯瓦螨的熏杀效果^{*}

苏晓玲 郑火青 费中华 胡福良^{**}

(浙江大学动物科学学院 杭州 310058)

摘 要 在实验室条件下测定 10 种中草药精油对蜜蜂狄斯瓦螨 *Varroa destructor* Anderson & Trueman 的熏蒸效果,通过测定中草药精油对蜜蜂和螨的毒性,筛选出具有杀螨活性而对蜜蜂较安全的中草药精油。结果表明:中草药精油对蜜蜂都有一定的毒害;而在对蜜蜂无毒性的剂量下,48 h 时茴香油、丁香油、肉桂油分别能引起 92.5%、54% 和 12% 的螨死亡,显著高于对照组 ($P < 0.05$);根据初步筛选结果,选择茴香油和丁香油进行进一步毒力测定,结果表明 48 h 时茴香油对螨的 LD_{50} 为 0.949 μL ,蜜蜂的 LD_{50} 为 4.033 μL ;丁香油对螨的 LD_{50} 为 0.795 μL ,蜜蜂的 LD_{50} 为 1.965 μL 。茴香油在 48 h 时有着较高的选择比(蜜蜂的 LD_{50} /螨的 LD_{50} = 4.250);GC-MS 鉴定茴香油最主要成分是茴香脑(占总成分的 88.72%),丁香油的主要成分是丁香酚(68.28%)和石竹烯(20.79%)。可见,茴香油和丁香油在控制狄斯瓦螨的应用上具有很大潜力。

关键词 蜜蜂,狄斯瓦螨,中草药精油,杀螨活性

Effectiveness of herbal essential oils as fumigants to control *Varroa destructor* in laboratory assays

SU Xiao-Ling ZHENG Huo-Qing FEI Zhong-Hua HU Fu-Liang^{**}

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The effects of using herbal essential oils as fumigants to control *Varroa destructor* Anderson & Trueman, and the toxicity of these compounds to honeybees, were assayed under laboratory conditions. The results showed that all the oils tested were, to some extent, toxic to honeybees but anise oil, clove oil and cinnamon oil caused 92.5%, 54% and 12% mite mortality respectively with no toxicity to bees after 48 h. There were significant differences in toxicity between the three oils and the control ($P < 0.05$). The acute toxicity of anise oil and clove oil to mites was further evaluated by estimating LD_{50} values. The LD_{50} values of anise oil for *V. destructor* and *A. mellifera* were 0.949 μL and 4.033 μL , respectively, and those of clove oil were 0.795 μL and 1.965 μL , respectively. Anise oil had a higher selective ratio after 48h (LD_{50} to honeybees / LD_{50} to mites = 4.250). The chemical composition of anise oil and clove oil were analyzed and identified by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). The most abundant compound in anise oil was (E) – anethole (88.72%). The main components of clove oil were Eugenol (68.28%) and Caryophyllene (20.79%). These results show that anise oil and clove oil are promising acaricides that could be used for controlling *Varroa* mites in beehives.

Key words honeybee, *Varroa destructor*, herbal essential oils, acaricidal activity

狄斯瓦螨 *Varroa destructor* Anderson & Trueman 是对世界养蜂业威胁最大的蜜蜂病虫害之一(De Jong, 1997)。它的原始寄主是东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricus,在瓦螨与东方蜜蜂长期协同进化过程中,它与东方蜜蜂形成了近似共生的相

互适应关系(Rath *et al.*, 1990)。狄斯瓦螨引起人们注意是在它成为西方蜜蜂 *A. mellifera* 的寄生虫。由于地理扩散和引种不慎等原因,狄斯瓦螨由亚洲传到欧洲、美洲、非洲,除了澳大利亚没有发现瓦螨外,狄斯瓦螨危害全世界的西方蜜蜂

^{*} 资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-45)。

^{**}通讯作者, E-mail: flhu@zju.edu.cn

收稿日期:2011-12-19,接受日期:2012-03-25

(Rosenkranz *et al.*, 2010)。狄斯瓦螨以成蜂、幼虫或蛹的血淋巴为食,造成幼蜂不能孵化或孵化出的幼蜂发育不良,翅足残缺;成蜂体质衰弱,寿命缩短等(De Jong *et al.*, 1982; 王星等, 2007)。狄斯瓦螨还是很多病原的携带者和传播者,瓦螨与病毒的交叉感染比任何一种单一病毒感染更具危害性,能造成蜂群毁灭性的伤害(Genersch *et al.*, 2010)。

施用化学合成药物是防治蜂螨最主要的方法,但随着化学药物的广泛使用,药物残留和蜂螨抗性问题日益凸显(Milani, 1999; Wallner, 1999)。因此,寻求一种低残留、不易产生抗性的药物已势在必行。植物精油具有来源广泛、一药多效、低残留和不易产生抗药性等优点(李旭涛和王鹏涛, 2003; 徐河山等, 2006)。目前,我国养蜂生产上已有一些中草药精油用于防治蜂螨的零星应用,但至今为止缺少对中草药精油的抗螨效果和对蜜蜂毒性的科学评价。本项研究根据中草药药性初步筛选中草药种类,通过实验室手段筛选出具有抗螨效果且对蜜蜂具有较高安全性的中草药精油,为寻求新的抗螨活性物质或先导物,开发具有市场前景的植物源杀螨剂奠定基础。同时本研究有助于减少蜂产品中有害化学物质的残留,为生产安全、优质蜂产品提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中草药精油 花椒、松针、辛夷、肉桂、白豆蔻、山柰、茴香、姜黄、陈皮和丁香 10 种中草药精油由浙江中医药研究院提供。按《中华人民共和国药典》2010 年版第一部附录(国家药典委员会, 2010) X D 挥发油测定法甲法提取挥发油:取药材 500 g,粉碎成粗粉,置圆底烧瓶中,加水 5 L,缓缓加热至沸,并保持微沸 5 h,至测定器中油量不再增加,停止加热,放置片刻,开启测定器下端的活塞,将水缓缓放出后,得到挥发油。

1.1.2 意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 和狄斯瓦螨 意大利蜜蜂由浙江大学实验蜂场提供,分成健康群 6 群和供螨群 5 群。蜜蜂从健康蜂群的巢脾上直接吸入实验装置中。供螨群 12 ~ 24 个月不治螨,成年母螨在其已封盖的幼虫巢房中逐个搜集,在找螨过程中将螨放在蜜蜂身上防止螨失去活力。

1.1.3 实验装置 装置由蜜蜂活动区和精油放置区组成,蜜蜂活动区和精油放置区通过固定在蜜蜂活动区底部的纱网分隔,蜜蜂活动区顶部一侧装有一个带盖且底部开小口的离心管,用于装饲喂蜜蜂的食物(质量比 50% 的糖水),蜜蜂活动区顶部另一侧设有一用网封住的通气口,精油放置区底部平铺一张滤纸,用于装载香精油,并促进挥发(图 1)。蜜蜂活动区与精油放置区契合,可自由拆卸。另外,通过在蜜蜂活动区顶部开口处连接吸管可以直接吸入蜜蜂。

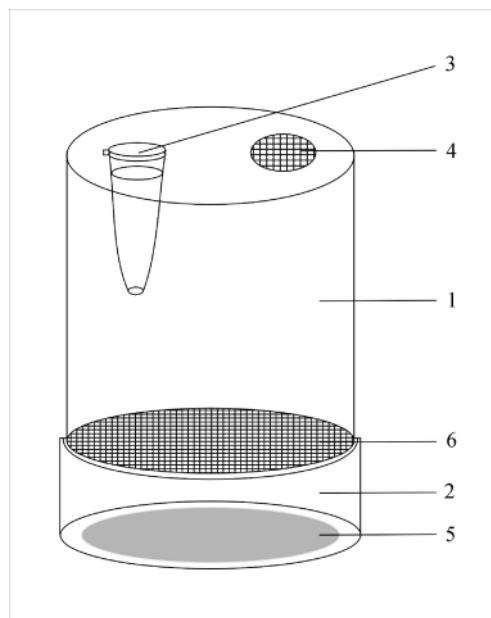


图 1 实验装置

Fig.1 Experimental apparatus

1:蜜蜂活动区;2:精油放置区;3:离心管;
4:通气口;5:滤纸;6:纱网。

1: bee area; 2: essential oil area; 3: centrifuge tube;
4: ventage; 5: filter paper; 6: yarn.

1.2 试验方法

1.2.1 中草药精油对蜜蜂的毒力评价 在健康蜂群中,用上述实验装置随机吸取 20 只成年蜜蜂。离心管中加入 50% 的糖水供蜜蜂任意采食,放入 28℃、60% RH 的培养箱中。选取 5 个剂量的香精油,直接加在精油放置区的滤纸上,立即盖上盖子。观察 1 h 内蜜蜂的中毒反应,并记录 12、24、36、48、60、72 h 蜜蜂的死亡率。每个浓度 6 个重复。根据 1 h 内蜜蜂的中毒反应和 72 h 内蜜蜂的死亡率计算香精油对蜜蜂没有影响的剂量 V_{max} 。

和对蜜蜂的 LD_{50} 。

1.2.2 抗螨中草药精油筛选 在健康群中吸取 20 只蜜蜂,将 10 只螨放在蜜蜂身上。在容器底部加入对应剂量 (V_{max}) 的香精油,立即盖好底部盖子。观察 1 h 内蜜蜂和螨的中毒反应,并记录 4、12、24、36 和 48 h 蜜蜂和螨的死亡率,筛选在 V_{max} 剂量下有显著抗螨效果的香精油。

1.2.3 中草药精油对狄斯瓦螨的熏蒸毒力 选择有显著杀螨效果且对蜜蜂低毒的 2 种香精油进行对螨的熏蒸毒力测定。选取 5 个剂量的香精油,直接加入精油放置区,方法同 1.2.2。根据蜜蜂和螨的死亡率计算相应的 LD_{50} ,并计算香精油在 48 h 的选择比(蜜蜂的 LD_{50} / 螨的 LD_{50})。

1.2.4 中草药精油成分分析 对有显著杀螨效果的茴香油和丁香油进行 GC-MS 成分鉴定,探讨与杀螨活性最有可能相关的成分。

GC 条件:色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);载气为氢气,1 mL/min。进样口温度 250℃;分流进样量 1.0 μ L;分流比 10

:1;柱温升温程序:初始 50℃,保持 3 min,以 20℃/min 速度升温至 110℃,以 5℃/min 速度升至 200℃,再以 20℃/min 升至 275℃,保持 2 min。

MS 条件:电离方式为 EI,离子源温度 230℃;四级杆温度 150℃;接口温度 280℃;电子能量 70 eV;质量扫描范围为 30 ~ 500 amu。

1.2.5 数据分析与处理 试验数据采用 EXECL 2007 和 SPSS16.0 for Windows 数据处理软件进行统计,计算均值、标准误、 LD_{50} 及方差分析。

2 结果与分析

2.1 中草药精油对蜜蜂的毒力评价

中草药精油对蜜蜂没有影响的剂量 (V_{max}) 及 48 h 时蜜蜂的 LD_{50} 值见表 1。由表 1 可知,香精油对蜜蜂都有一定的毒性,本实验条件下,白豆蔻对蜜蜂的毒力最大 ($LD_{50} = 2.93 \mu$ L),山柰对蜜蜂的毒力最小 ($LD_{50} = 16.043 \mu$ L);而白豆蔻对蜜蜂没有影响的剂量也相应地最小 ($V_{max} = 0.5 \mu$ L),山柰对蜜蜂没有影响的剂量相应最大 ($V_{max} = 6 \mu$ L)。

表 1 香精油对蜜蜂没有影响的剂量 V_{max} 及 48 h 时对蜜蜂的 LD_{50} 值

Table 1 The doses of essential oils without toxicity to honeybees and LD_{50} values for honeybees at 48 h

中草药名 Chinese herbal medicine	学名 Scientific name	对蜜蜂没有影响 的剂量 V_{max} (μ L) No-toxic-effect dose level	48 h 蜜蜂的 LD_{50} (μ L) LD_{50} values for honeybees at 48 h
花椒 Bunge pricklyash	<i>Pericarpium zanthoxyli</i>	2	3.389
松针 Chinese pine	<i>Folium pini</i>	3	9.905
辛夷 Lily magnolia	<i>Flos magnoliae</i>	1	4.376
肉桂 Cassia bark	<i>Cortex cinnamomi</i>	2	9.786
白豆蔻 Round cardamom	<i>Fructus rotundus amomi</i>	0.5	2.930
山柰 Galange resurrectionlily	<i>Rhizoma kaempferiae</i>	6	16.043
八角茴香 Truestar anisetree	<i>Fructus anisi stellati</i>	2	4.768
姜黄 Common turmeric	<i>Rhizoma curcumae longae</i>	2	7.718
陈皮 Tangerine peel	<i>Pericarpium Citri Reticulatae</i>	2	10.022
丁香 Clove	<i>Flos caryophylli</i>	1	3.034

2.2 中草药精油对狄斯瓦螨的熏蒸活性

在对蜜蜂没有影响的剂量 $V_{\max}$ 下测定香精油

对螨的熏杀效果,在 48 h 时螨的死亡率见图 2。

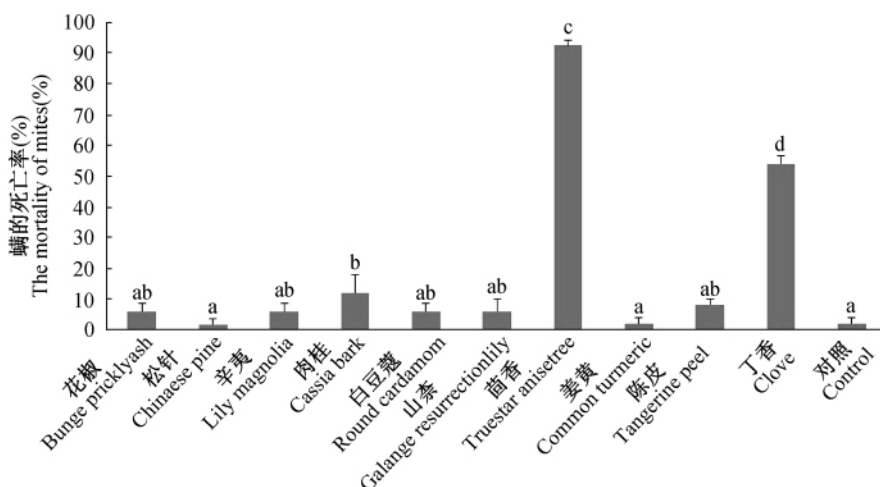


图 2 48 h 时香精油在相应 $V_{\max}$ 剂量下的螨的死亡率 ($n = 5$, mean $\pm$ SE)

Fig. 2 Mean percent mortality ($\pm$ SE) of *Varroa destructor* after 48 h at the corresponding doses ($V_{\max}$)

柱上的字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Histograms with different letters indicate significantly different at 0.05 level based on ANOVA and vice versa.

从图 2 看出,茴香油、丁香油、肉桂油的杀螨效果显著高于对照组,且两两差异显著,48 h 时茴香油、丁香油、肉桂油分别能引起 92.5%、54% 和 12% 的螨的死亡;其余 7 种香精油的杀螨率与对照组无显著差异,螨的死亡率都在 10% 以下;而 48 h 时对照组螨的死亡率仅为 2%。由此可见,茴香油和丁香油杀螨效果显著且对蜜蜂毒性较小,有很大的应用潜力。

2.3 中草药精油对狄斯瓦螨的熏蒸毒性

根据香精油对狄斯瓦螨的筛选结果,选择具

有显著杀螨效果的茴香油和丁香油进行进一步的毒力测定,茴香油和丁香油在不同浓度下的杀螨效果如图 3 (b) 和图 4 (b),对蜜蜂的相应毒力见图 3 (a) 和图 4 (a)。由图 3, 4 可知,香精油的杀螨效果随着浓度的增加而增加,但同时也会对蜜蜂的毒性也相应地增加。茴香油在 1.5 μL 和 2 μL 时的杀螨效果都达到 90% 以上,而蜜蜂的死亡率在 10% 左右;在 1 μL 和 0.5 μL 时的杀螨效果分别为 36% 和 16%,而蜜蜂的死亡率分别为 6% 和 4%。丁香油在 1 μL 和 0.5 μL 时的杀螨效果达到

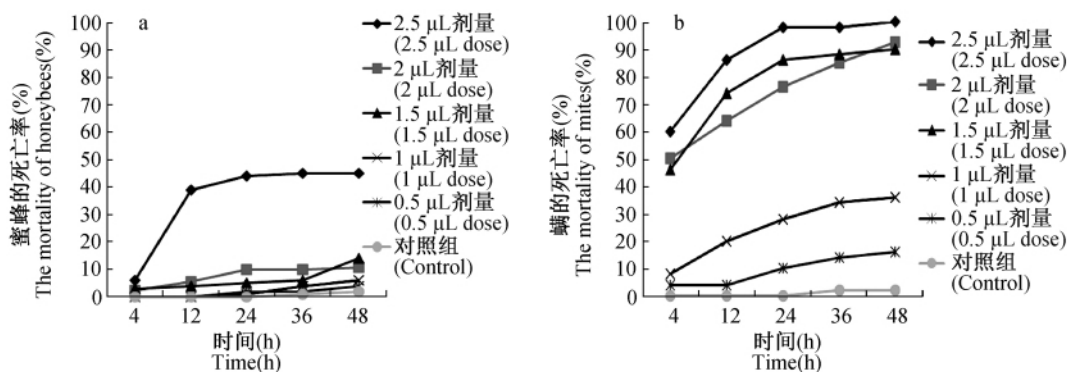


图 3 茴香精油在不同剂量下对蜜蜂的毒力 (a) 和杀螨效果 (b)

Fig. 3 The toxicity of anise oil against honeybees (a) and *Varroa destructor* (b) at different doses

64.44% 和 24%, 蜜蜂的死亡率仅为 8.33% 和 1%; 而在 2 μL 时虽然有 100% 的杀螨效果, 但同

时能导致 50% 的蜜蜂死亡。

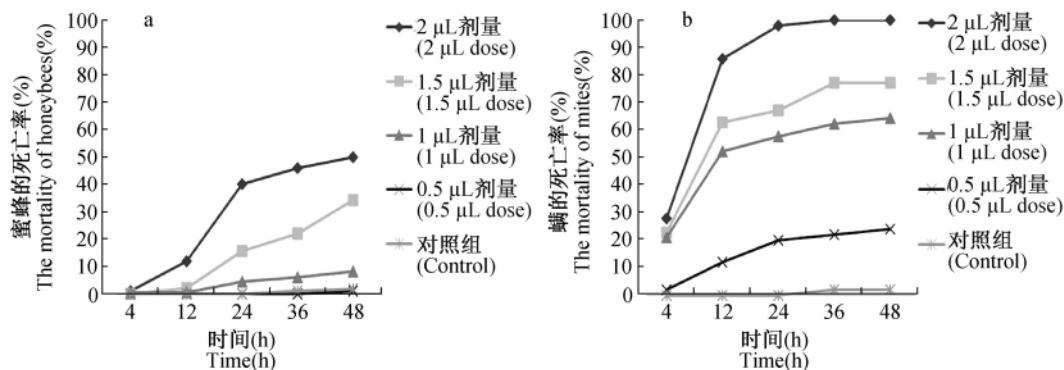


图 4 丁香精油在不同剂量下对蜜蜂的毒力 (a) 和杀螨效果 (b)

Fig. 4 The toxicity of clove oil against honeybees (a) and *Varroa destructor* (b) at different doses

表 2 香精油对蜜蜂和螨的 LD_{50} 值及 48 h 的选择比

Table 2 LD_{50} values for *Varroa destructor* and *Apis mellifera*, and 48 h selectivity ratio for anise oil and clove oil

编号 Group	螨的 LD ₅₀ (μL)					蜜蜂的 LD ₅₀ (μL)					选择比 Selectivity ratio 48 h
	V. destructor LD ₅₀ (μL)					A. mellifera LD ₅₀ (μL)					
	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h	4 h	12 h	24 h	36 h	48 h	
茴香油 Anise oil	1.978	1.384	1.116	1.011	0.949	9.485	2.811	3.364	3.533	4.033	4.250
丁香油 Clove oil	3.531	1.056	0.895	0.819	0.795	>25	3.392	2.282	2.107	1.965	2.472

各观察时间的 LD_{50} 值和 48 h 时的选择比见表 2。4 h 时茴香油对螨的 $\text{LD}_{50} = 1.978 \mu\text{L}$, 蜜蜂的 $\text{LD}_{50} = 9.485 \mu\text{L}$; 丁香油对螨的 $\text{LD}_{50} = 3.531 \mu\text{L}$, 蜜蜂的 $\text{LD}_{50} > 25 \mu\text{L}$ 。而 48 h 时茴香油对螨的 $\text{LD}_{50} = 0.949 \mu\text{L}$, 蜜蜂的 $\text{LD}_{50} = 4.033 \mu\text{L}$; 丁香油对螨的 $\text{LD}_{50} = 0.795 \mu\text{L}$, 蜜蜂的 $\text{LD}_{50} = 1.965 \mu\text{L}$ 。同时茴香油在 48 h 时有着较高的选择比 (蜜蜂的 LD_{50} / 螨的 $\text{LD}_{50} = 4.250$)。

2.4 中草药精油成分分析

茴香油和丁香油的主要成分 (>1%) 分析见表 3。由表 3 可知, 茴香精油的主要成分为反式茴香脑, 占总含量的 88.72%; 丁香精油的主要成分为丁香酚 (68.28%) 和石竹烯 (20.79%), 两者占到总成分的 89% 以上。

3 讨论

本研究基于中草药精油对蜜蜂和蜂螨的毒性, 在实验室条件下筛选了具有抗螨效果且对蜜

蜂低毒或无毒的中草药香精油。我们在本研究中设计了一种用于实验室条件下筛选抗螨香精油的装置 (专利申请号: 201110395444.6), 能同时测定中草药精油对蜜蜂和螨的毒性。蜜蜂能自由取食, 存活一周以上; 螨附在蜜蜂身上, 以蜜蜂血淋巴为食, 更接近螨在蜂箱中的生活状态。结果表明 10 种香精油对蜜蜂都有一定的毒性, 中毒蜜蜂表现为: 在底部翻转、打滚、身子不停地抽搐, 最后痉挛而死, 死后两翅张开, 腹部弯曲, 吻伸出。其中毒症状与神经毒性中毒症状类似 (Rattan, 2010)。尽管香精油对蜜蜂成蜂和幼虫都有毒性 (Ruffinengo *et al.*, 2005; Gashout *et al.*, 2009), 但百里香、香薄荷和绿薄荷等一些香精油可以在不引起蜜蜂死亡的剂量下杀死螨 (Ariana *et al.*, 2002)。

本实验条件下对 10 种中草药精油进行筛选, 茴香油和丁香油能在不影响蜜蜂的同时引起蜂螨较高的死亡率。进一步的毒力实验也表明, 茴香

表 3 茴香油和丁香油的主要化学成分 (>1%)
Table 3 Main compounds (>1%) of anise oil and clove oil identified by GC-MS

主要成分 Main compounds	八角茴香 (%) Anise oil	丁香 (%) Clove oil
柠檬烯 D-Limonene	2.113	
草蒿脑 Estragole	2.907	
茴香醛 Anisaldehyde	1.370	
反式茴香脑 ((E) - anethole	88.715	
对丙烯基-1-(3-甲基-2-丁烯氧基) 苯	1.364	
1-(3-Methyl-2-butenyloxy)-4-(1-propenyl) benzene		
丁香酚 Eugenol		68.284
石竹烯 Caryophyllene		20.791
α-石竹烯 α-Caryophyllene		2.478
乙酸丁香酚酯 Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-acetate		6.034

油在 1 μL 时对蜜蜂基本没有影响,其杀螨效果达到 36%,而在 1.5 μL 和 2 μL 时的杀螨效果都达到 90% 以上,蜜蜂的死亡率在 10% 左右。丁香油在 1 μL 和 0.5 μL 时的杀螨效果达到 64.44% 和 24%,蜜蜂的死亡率仅为 8.33% 和 1%。Gashout 等(2009)研究了丁香精油对蜂螨的触杀效果,结果表明施药 4 h 后的蜂螨触杀死亡率达到 87%,与本实验结果相似。而到目前为止还没有针对八角茴香精油抗螨效果的实验研究。

香精油的抗螨活性主要是由其成分及含量决定的,而植物的种类、采摘时间、环境条件、提取方法等都影响着香精油的组分及含量,这也可以解释为什么不同的研究者获得的结果不完全相同(胡福良等, 2005)。因此,对香精油的成分鉴定是很必要的。而且可以对一些重要的单体进行生物测定,筛选出有抗螨效果而对蜜蜂无害的香精油单体,进行人工合成或修饰,开发出可商业化的杀螨新品种。GC-MS 鉴定分析出茴香油的主要成分是反式茴香脑((E) -anethole),丁香油的主要成分是丁香酚(eugenol)和石竹烯(caryophyllene)。

本研究表明,茴香精油和丁香精油在防治蜂螨方面具有很高的潜力。进一步的蜂群实验将对这 2 种油的抗螨效果有一个更全面的评价。此外,进一步确定香精油中对蜂螨或蜜蜂有毒性的成分,将为植物精油抗螨药物的深度开发提供依据。

参考文献(References)

Ariana A, Ebadi R, Tahmasebi G, 2002. Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari:Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 27 (4) : 319—327.

De Jong D, 1997. *Varroa* and other parasites of brood // Morse R, Flottum K (eds.). *Honey Bee Pest, Predators, and Diseases*. Third edn. A. I. Root Company, Ohio, USA. 280—327.

De Jong D, De Jong PH, Goncalves LS, 1982. Weight loss and other damage to developing worker honey bees (*Apis mellifera*) due to infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apicultl. Res.*, 21 :165—167.

Genersch E, Evans JD, Fries I, 2010. Honey bee disease overview. *J. Invertebr. Pathol.*, 103 :2—4.

Gashout HA, Guzmán-Novoa E, 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Apicultl. Res.*, 48 (4) : 263—269.

Milani N, 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30 (2/3) :229—234.

Rath W, Drescher W, 1990. Response of *Apis cerana* Fabr. colonies toward brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, 21 (4) :311—321.

Rattan RS, 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.*, 29 (9) : 913—920.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.*, 103 (Suppl. 1) :96—119.

Ruffinengo S, Eguaras M, Floris I, Faverin C, Bailac P,

- Ponzi M, 2005. LD₅₀ and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.*, 98 (3) :651—655.
- Wallner K, 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30 (2/3) :235—248.
- 国家药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典 (一部). 北京:化学工业出版社. 1—1490.
- 胡福良, 朱威, 李英华, 2005. 香精油的抗蜂螨作用及其在蜂群中的应用. 昆虫知识, 42 (4) :375—378.
- 李旭涛, 王鹏涛, 2003. 中草药在养蜂业中的应用现状及展望. 中国养蜂, 54 (1) :31—33.
- 王星, 王强, 代平礼, 刘锋, 周婷, 2007. 蜜蜂幼虫血淋巴游离氨基酸和微量元素含量的差异对其抗螨特性的影响. 昆虫知识, 44 (6) :859—862.
- 徐河山, 马雅军, 2006. 植物源杀虫剂作用方式和机理的研究进展. 热带医学杂志, 6 (6) :743—747.