张燕新,张学文,杨 娟,等. 油茶花蜜期不同饲喂条件对蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):358 - 360.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2016.06.106

油茶花蜜期不同饲喂条件对蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的影响

张燕新[1,2], 张学文[1], 杨 娟[1], 赵洪木[1], 杨 爽[1], 王艳辉[1]
(1. 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所,云南蒙自 661101;2. 昆明理工大学,云南昆明 650500)

摘要:分析油茶花期不同饲喂条件对蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的影响,以探讨蜜蜂油茶花蜜中毒的原因。采用糖浓度为 35% 的糖水饲喂西方蜜蜂蜂群,试验组采用柠檬酸分别将糖水的 pH 值调整为 3.5、4.5,对照组不添加柠檬酸。观察并记录不同饲喂条件下的蜂群群势和烂子情况,测定蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的活性。结果表明,当 pH 值为 3.5 时,蜜蜂烂子情况轻微,蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力随喂食时间的增长呈明显升高趋势,比活力差异显著($P<0.05$);当 pH 值为 7.0 时,乙酰胆碱酯酶的比活力随喂食时间的增长呈缓慢升高趋势甚至有所下降,饲喂 1 周后比活力差异不显著($P>0.05$),烂子情况比其他 2 组严重。饲料中添加柠檬酸喂食蜜蜂后,柠檬酸与蜜蜂采食的油茶花蜜中的生物碱结合,从而释放乙酰胆碱酯酶,使乙酰胆碱酯酶活性升高。

关键词:油茶花蜜;蜜蜂烂子;乙酰胆碱酯酶
中图分类号: S896.1 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2016)06 - 0358 - 03

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)别称茶籽树、茶油树、白花树等,属山茶科山茶属,为常绿灌木或小乔木,是我国重要的木本油料植物,与油橄榄、油棕、椰子并称为世界四大木本油料植物,被誉为“东方橄榄油”[1]。油茶花花期长、流蜜量大,是很好的蜜源植物。但油茶具有自花不育性,虽然树大花多但结果很少,有“千花一果”之称,亟需传粉蜜蜂授粉。开发利用油茶蜜源[2]不仅可增加养蜂户的收入,还能大幅提高茶籽的产量和出油率[3]。由于油茶花蜜中含有对蜜蜂具有毒性的物质,蜜蜂采食后出现腹部膨胀、丧失飞翔能力等症状,成蜂在地面上爬行,幼虫中毒后死亡腐烂,出现蜂群群势下降等现象[4]。对于蜜蜂油茶花蜜中毒现象,康雪冬等研究认为,油茶花蜜中含半乳糖的寡糖成分,棉子糖和水苏糖是引起蜜蜂中毒的主要因素,可能是蜜蜂不能利用寡糖中的半乳糖而造成消化、代谢上的障碍所致[5]。棉子糖和水苏糖中均结合有半乳糖成分,因此认为半乳糖是油茶花蜜中导致蜜蜂中毒的物质。黄坚研究认为,茶花引起蜜蜂中毒是由于茶树花蜜、油茶花蜜中均含有较高浓度生物碱等不易消化的物质[6]。蜜蜂幼虫食后不易消化,后肠阻塞造成营养不良而死亡。生物碱不仅会造成蜜蜂消化障碍,还是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂[7-9]。乙酰胆碱酯酶是昆虫神经系统中最重要的酶系之一[10],在中枢及外周神经系统中与乙酰胆碱受体共同参与完成神经 - 神经、神经 - 肌肉突触之间动作电位的传递。乙酰胆碱酯酶的主要生理功能是催化水解阳离子性神经递质乙酰胆碱,维持神经冲动正常传递[11]。油茶花蜜中的生物碱可能影响了蜜蜂神经系统中的乙酰胆碱酯酶,导致神经信号传递阻断而致使昆虫死亡。根据蜂农多年的养蜂经验,酸饲料可中和茶花蜜中的生物碱,并能促进蜜蜂消化,是其常用的方法,包括柠檬酸、醋酸等。本试验采用喂食柠檬酸的方法,测定蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的活性,以探讨蜜蜂油茶花蜜中毒的现象,以期为油茶花蜜生物碱的进一步开发提供依据,并有望将其作为新型乙酰胆碱酯酶抑制剂。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

采用浓度为 35% 且 pH 值分别为 3.5、4.5、7.0 的糖水喂食西方蜜蜂,每个梯度 3 群,共 9 群。白天蜜蜂正常采集油茶花蜜粉,隔天晚上饲喂 1 次,饲喂量为每群 800 mL,连续饲喂 4 周。第 1 次测定蜂群群势后,每周记录蜂群的成蜂量(脾)、封盖子数(包括健康和不健康封盖子)、烂子数。每群蜜蜂取样 3 只进行试验。

1.2 试验地点

试验于西双版纳地区普文蜂场进行,普文镇位于东经 101°23′、北纬 22°33′,地处云南省西双版纳地区景洪市最北部。该地区最高海拔 1 797.3 m、最低海拔 772 m、年平均气温 20.2 ℃、年平均降水量 1 675.6 mm、全年日照时数 1 990 h,属于北亚热带高原季风气候,适宜茶叶、咖啡、水果等植物的生长。

1.3 主要试剂和仪器

主要试剂为 1 mg/mL 牛血清白蛋白标准品(Albumin bovine serum,云科生物工程公司),考马斯亮蓝 G - 250(北京索莱宝科技有限公司),1.6 mmol/L 碘化硫代乙酰胆碱(Acetylthiocholine iodide, ATChI, ACROS ORGANICS 公司),

收稿日期:2015 - 05 - 11
基金项目:云南省科技厅重点新产品开发计划(编号:2011BB012);国家蜂产业技术体系专项(编号:CARS - 45 - SYZ 17);云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金(编号:QC2015005)。
作者简介:张燕新(1987—),女,云南曲靖人,硕士研究生,主要从事蜂产品质量与安全研究。E - mail:dreamfly0517@hotmail.com。
通信作者:王艳辉,副研究员,主要从事蚕桑蜜蜂资源利用研究。E - mail:wyh686686@sina.com。

5,5′－二硫代双硝基苯甲酸[5,5′－dithio－bis(2－nitrobenzoicacid)](DTNB,Damas－beta 公司)。主要仪器为高速冷冻离心机、xMark 型酶标仪、玻璃匀浆器。

1.4　活体抑制粗酶液制备

采用 0.9% NaCl 溶液清洗蜜蜂样品,以 1 g∶5 mL 的比例于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(1 mmol/L EDTA、1% TritonX－100、1 mol/L NaCl,pH 值 8.0)中冰浴,研磨成匀浆,匀浆液于 4 ℃、15 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为待测酶液。

1.5　蛋白质及 AChE 活性测定

参照考马斯亮蓝 G－250 法[12]测定酶源蛋白质含量,以牛血清蛋白为标准蛋白。参照张莹等的酶活性测定方法[13]测定 AChE 活性,以 0.8 mmol/L 碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)为反应底物,以 0.125 mmol/L 5,5′－二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)为显色剂。取 50 μL 待测酶液、100 μL ATChI 底物,混匀后置于 40 ℃酶标仪中保温 10 min,加入 100 μL DTNB 显色剂显色并终止反应。于 412 nm 处测定吸光度(D 值),按以下公式计算 AChE 的比活力[14－15]。

$$AChE\ 比活力 = \frac{\Delta D \times V}{e \times L \times V_1 \times t \times m}。\qquad (1)$$

式中:V 表示反应体系的总体积,mL;V_1 表示反应体系中所加酶液的体积,mL;m 表示反应体系中 AChE 的实际蛋白质含量,mg;消光系数(e)为 13.6,光程(L)为 1 cm。

1.6　数据处理分析

所有测定均重复 3 次,采用 Origin 8.5、SPSS 软件对试验数据进行处理和分析。

2　结果与分析

2.1　蜜蜂中毒症状

经过 1 个月的观察,采食了油茶花蜜的蜜蜂陆续出现幼虫中毒后死亡腐烂、蜂群群势下降等现象。在饲料中添加柠檬酸的蜂群,其烂子数低于未喂食柠檬酸的蜂群,饲料 pH 值为 3.5 的蜂群其烂子情况最为轻微。

2.2　蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的变化

当 pH 值为 3.5 时,乙酰胆碱酯酶的比活力随着柠檬酸饲喂时间的增长呈明显增加趋势(图 1)。当 pH 值为 4.5 时,乙酰胆碱酯酶的比活力随着柠檬酸饲喂时间的增长而增加,但有逐渐变缓的趋势(图 2)。当 pH 值为 7.0 时,即糖水中未添加柠檬酸的 3 个蜂群,乙酰胆碱酯酶的比活力开始时随着饲喂时间的增长而增加,但趋势更加缓慢,甚至有下降的趋势(图 3)。

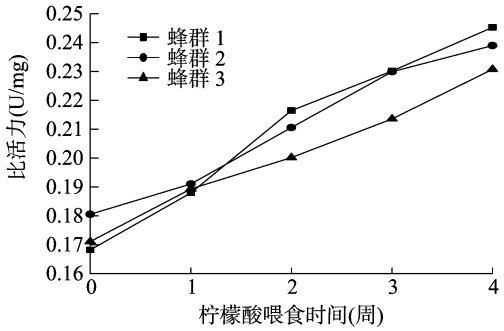

图1　pH 值为 3.5 时乙酰胆碱酯酶比活力的变化

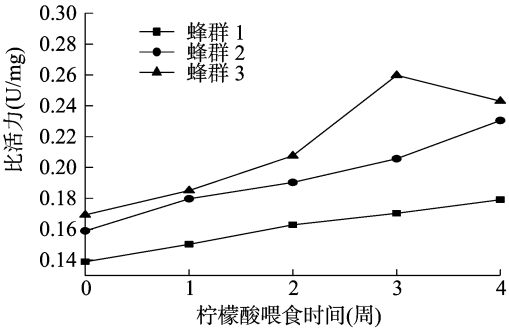

图2　pH 值为 4.5 时乙酰胆碱酯酶比活力的变化

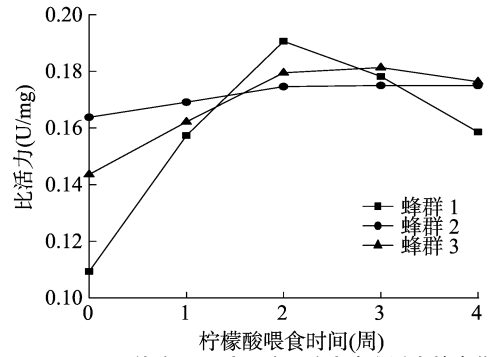

图3　pH 值为 7.0 时乙酰胆碱酯酶比活力的变化

2.3　喂食柠檬酸对蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的影响

由表 1 可知,针对 3 个梯度中的第 2 个蜂群,喂食之前蜂群之间蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力为 0.16～0.18 U/mg。饲喂柠檬酸 1 个月之后,在 pH 值为 3.5、4.5 的 2 个组中,其蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力均升高至 0.23 U/mg,与饲喂柠檬酸前相比差异显著;饲料中未添加柠檬酸的蜂群中,其蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力仍在 0.17 U/mg 左右,与饲喂柠檬酸前相比差异不显著(表 1)。从整体来看,pH 值为 3.5 的 3 个蜂群中,其蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的活性高于另外 2 个组(图 4、图 5)。

表 1　第 2 群蜜蜂中不同饲喂时间下乙酰胆碱酯酶的比活力

饲喂时间(周)	比活力(U/mg)		
	pH 值为 3.5	pH 值为 4.5	pH 值为 7.0
0	0.180 6 ±0.009 38c	0.158 9 ±0.009 68c	0.163 8 ±0.003 96b
1	0.191 0 ±0.002 78c	0.179 8 ±0.017 82bc	0.169 1 ±0.004 34ab
2	0.210 6 ±0.008 66b	0.190 4 ±0.017 44abc	0.174 6 ±0.004 98a
3	0.229 9 ±0.009 66a	0.205 7 ±0.026 55ab	0.175 0 ±0.004 02a
4	0.239 0 ±0.006 81a	0.230 5 ±0.033 97a	0.175 0 ±0.004 90a

注:表中数据为“平均值±标准偏差”,$n=3$。同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

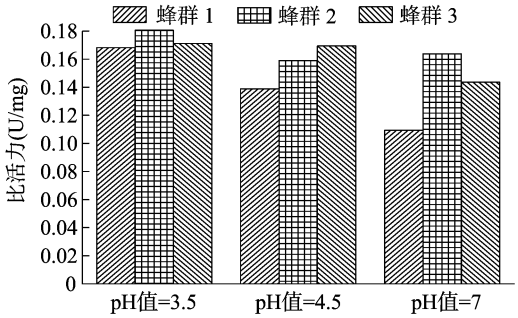

图4　饲喂柠檬酸前蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力

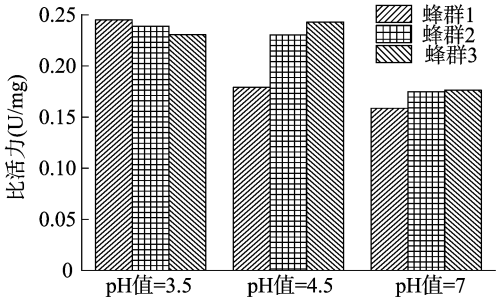

图5　饲喂柠檬酸 4 周后蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶的比活力

3　结论与讨论

蜜蜂自然中毒是指蜜蜂采食某种天然植物的花粉、花蜜、甘露蜜(蚜虫、介壳虫等昆虫分泌的甜汁经蜜蜂采集酿成)后出现的中毒现象。在养蜂生产中,多见于有毒植物中毒、枣花中毒、茶花中毒、油茶中毒、甘露蜜中毒[16]。对于蜜蜂枣花期中毒的原因,目前多认为是由于花粉和花蜜中的生物碱、游离钾离子浓度不当所引起[17-18]。对于蜜蜂油茶中毒现象,目前认为是蜜蜂不能消化棉子糖和水苏糖等,并未探讨油茶期蜜蜂体酶的变化。

本研究从乙酰胆碱酯酶活性变化的角度探讨蜜蜂油茶花蜜中毒现象。结果表明,在饲料中添加柠檬酸并喂食 4 周后,蜂群蜜蜂体内的乙酰胆碱酯酶活性升高,与喂食柠檬酸前呈显著性差异,烂子情况减弱;在空白组即未喂食柠檬酸的蜂群中,蜜蜂体内乙酰胆碱酯酶活性的升高趋势缓慢,与喂食前酶活性的差异不显著,烂子情况比其他 2 组严重。本研究证实,喂食柠檬酸可改善蜜蜂采食油茶花蜜后的烂子情况和蜂群群势。油茶花蜜中含有生物碱,生物碱是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,会与蜜蜂神经系统中的乙酰胆碱酯酶结合,导致神经信号传递阻断而致使蜜蜂死亡。在饲料中添加柠檬酸,蜜蜂食用后,柠檬酸与蜜蜂采食的油茶花蜜中的生物碱结合,从而释放乙酰胆碱酯酶,使乙酰胆碱酯酶活性升高。

对于蜜蜂油茶花蜜中毒现象,不仅要关注棉子糖、水苏糖等蜜蜂不能消化的糖,还要重视生物碱的作用[19-21]。明确蜜蜂油茶花蜜中毒的真正原因,深入探讨蜜蜂油茶花蜜中毒的作用机理,进而找到更好的解毒剂,使蜜蜂安全有效地采集油茶蜜粉,对油茶进行授粉并提高油茶籽产量。本研究为进一步定量分析油茶花蜜中生物碱对乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用奠定了基础,并有望开发油茶花蜜生物碱作为新型乙酰胆碱酯酶抑制剂。

参考文献:

[1]潘　捷. 湖南省现有油茶林低产原因分析[J]. 湖南林业科技,2010,37(3):46-47,50.

[2]郭冬生. 蜜蜂采集油茶蜜粉时蜂群的状况分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(12):125-126.

[3]邓园艺,喻勋林,罗毅波. 传粉昆虫对我国中南地区油茶结实和结籽的作用[J]. 生态学报,2010,30(16):4427-4436.

[4]张丽珠,陈稳宏. 蜜蜂油茶花蜜中毒的预防与救治[J]. 中国蜂业中旬刊:学术,2013,64(3):36-37.

[5]康雪冬,范正友. 蜜蜂油茶蜜中毒物质的分析研究[J]. 蜜蜂杂志,1991(1):8-10.

[6]黄　坚. 浅谈茶花烂子的防治[J]. 蜜蜂杂志,1994(8):27.

[7]Cardoso-Lopes E M, Maier J A, Da-Silva M R, et al. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for alzheimer disease [J]. Molecules, 2010, 15 (12): 9205-9213.

[8]罗万春,李云寿,慕立义,等. 苦豆子生物碱对萝卜蚜的毒力及其对几种酯酶的影响[J]. 昆虫学报,1997(4):358-365.

[9]黄　华,丁伯平. 钩藤生物碱对中枢神经系统的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床,2013,28(5):806-810.

[10]Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1994, 108(1): 19-31.

[11]Li F H Z. Characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2002, 51(1): 37-45.

[12]Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.

[13]张　莹,黄　建,高希武. 两种蜜蜂头部乙酰胆碱酯酶对杀虫药剂敏感度比较[J]. 农药学学报,2005,7(3):221-226.

[14]黄　晓,滕　云,陶　科,等. 天然产物对家蚕乙酰胆碱酯酶抑制作用研究[J]. 四川动物,2008,27(3):327-330.

[15]彭　霞,陶　科,滕　云,等. 农药靶标乙酰胆碱酯酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报:自然科学版,2008,45(1):189-193.

[16]余海波. 蜜蜂自然中毒的病因与诊治[J]. 贵州畜牧兽医,2015,65(1):24-27.

[17]金　丰. 枣花期蜜蜂中毒的防治[J]. 中国养蜂,1994(2):22.

[18]李晓立,范正友. 蜜蜂枣花病病因的探讨[J]. 中国养蜂,1991(2):5-8.

[19]刘海青,刘富平,胡文婷. 壮实鹿角珊瑚生物碱的体外抗菌活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):250-251.

[20]贤景春,陈小滨. 鸡屎藤总生物碱提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):209-211.

[21]贾书红,李效振,张东升,等. 宫炎净提取物中生物碱对子宫内膜炎家兔的抗炎作用机理[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):209-211.