



东方蜜蜂和西方蜜蜂的 毒理学特性比较研究



刁青云 著



东方蜜蜂和西方蜜蜂的 毒理学特性比较研究

Comparative research on toxicological characters
between *Apis cerana* and *Apis mellifera*

刁青云 著



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

东方蜜蜂和西方蜜蜂的毒理学特性比较研究/刁青云著. —北京: 中国农业出版社, 2017. 11
ISBN 978-7-109-23361-4

I. ①东… II. ①刁… III. ①东方蜜蜂—蜂毒—毒理学—研究②意大利蜂—蜂毒—毒理学—研究 IV.
①S896.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 227550 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 黄宇李蕊

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2017 年 11 月第 1 版 2017 年 11 月北京第 1 次印刷

开本: 880mm×1230mm 1/32 印张: 4

字数: 100 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

本书得到国家蜂产业技术体系
首席科学家经费资助

作者简介

刁青云

女 中共党员

中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂病虫害生物学创新团队首席科学家

出生年月：1971年7月

教育背景：2003—2006 中国农业大学农学与生物技术学院 农业昆虫与害虫防治专业/昆虫毒理学/农学博士

1995—1998 中国农业大学昆虫系 昆虫学专业/理学硕士

1990—1994 北京农业大学植物保护系

发表论文 140 篇，其中第一作者（通讯作者）132 篇，SCI 论文 13 篇，核心期刊论文 26 篇，国际会议论文 11 篇，报刊文章 3 篇。

制定标准 2 个。获得软件著作权 4 项，专利 14 个。

取得成果 5 项，其中获奖成果 4 项。

出版著作 23 部，其中主编书籍 9 部。

摘 要

本书从羧酸酯酶 (CarE) 测定方法、解毒酶体躯和亚细胞分布、发育期变化规律、化学农药毒力测定及亚致死剂量化学农药对东方蜜蜂 (*Apis cerana*) 和西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 解毒酶影响等方面进行了系统的比较研究, 以期为蜜蜂保护, 尤其是中蜂保护提供依据。实验结果如下:

1. 以 α -乙酸萘酯为底物, 采用正交方法确定了西方蜜蜂 CarE 活性测定最佳条件为酶终浓度 0.3 个腹部/mL、底物终浓度 4×10^{-4} mmol/L、pH 7.0、温度 35°C、时间 10min。

2. 比较研究了两种蜜蜂成年工蜂解毒酶体躯和亚细胞分布。头部是蜜蜂乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性最高部位, 在细胞内活性主要集中在线粒体层。CarE 主要集中在腹部, 在细胞内主要存在于细胞液中。谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 活性主要集中于中肠, 在细胞中主要位于细胞液中。但不同蜂种不同组织的不同亚细胞层比例不同。东、西方蜜蜂各躯段 CarE 与底物亲和力不同。

3. 从幼虫到成虫, GST 和 CarE 活性存在显著差异, AChE 活性差异不显著。东方蜜蜂 AChE 和 GST 活性随着发育呈增加趋势, 西方蜜蜂工蜂体内 AChE 活性呈减少趋势。

东方蜜蜂除蛹期 AChE 活性显著高于西方蜜蜂外, 其他发育期 AChE 和 GST 活性低于西方蜜蜂, CarE 活性则高于西方蜜蜂 (α -NA 为底物)。不同发育阶段东、西方蜜蜂 CarE 底

物特异性不同。西方蜜蜂雄蜂幼虫和蛹解毒酶活性高于工蜂。

4. 西方蜜蜂成年工蜂解毒酶活性随日龄变化。21日龄时 GST 活性显著升高。

5. 解毒酶活性在蜂种间存在显著差异。意大利蜂 AchE 活性最高,高加索蜂 GST 活性最高。以 α -NA 为底物时,蜂种间 CarE 差异不显著。以 β -NA 为底物时,卡尼鄂拉蜂 CarE 活性最高。不同蜂种以 β -NA 为底物时 CarE 活性均高于以 α -NA 为底物活性。

6. 对于 5 种化学药剂,东方蜜蜂比西方蜜蜂更敏感。亚致死剂量 5 种化学药剂在 24h 内对东、西方蜜蜂解毒酶作用不同。农药对东方蜜蜂 CarE、AchE(马拉硫磷除外)的影响大于西方蜜蜂,而对 GST 的影响则是西方蜜蜂大于东方蜜蜂(双甲脒除外)。

7. 甲氰菊酯、灭多威和马拉硫磷能诱导东方蜜蜂 AchE 活性增加,降低西方蜜蜂 AchE 活性。氟胺氰菊酯诱导西方蜜蜂 AchE 活性增加,抑制东方蜜蜂 AchE 活性增加。双甲脒能诱导东方蜜蜂 AchE,对西方蜜蜂影响不大。5 种农药均可以诱导东方蜜蜂腹部 CarE 增加,其中氟胺氰菊酯是先诱导再抑制。5 种化学农药均抑制西方蜜蜂体内 CarE 生成。除灭多威外的 4 种化学药剂均抑制西方蜜蜂 GST 活性,灭多威在使用中期(4~8h, 16h)诱导 GST 活性增加,其他时间 GST 活性均受到抑制。对东方蜜蜂而言,甲氰菊酯、灭多威能抑制 GST 活性;双甲脒诱导 GST;马拉硫磷和氟胺氰菊酯先抑制再诱导。

关键词: 东方蜜蜂 西方蜜蜂 农药 解毒酶 亚致死剂量

Abstracts

Apis cerana and *Apis mellifera* were two main honey bee species in China. The measurable system of carboxylesterase, tissue and subcelluar distributions of detoxical enzymes, developmental characteristic of three detoxical enzymes were comparatively determined in the two honey bee species. The toxicity of five pesticides to two honey bee species were comparatively studied too. The effects of sublethal dose of five pesticides to the detoxical enzymes in two honeybee species were determined.

The results were as followed:

1. The most fit measurement system of CarE in *A. mellifera* with concentration of enzymes, substrate, action time, action temperature and pH as five factors was determined to using α -NA as substrate. The best action system was as followed: the final concentration of enzyme was 0.3 abdomen/mL, the final concentration of substrate was 4×10^{-4} mmol/L, the value of pH of buffer was 7.0, the action temperature was 35 °C, and the action time was 10 min .

2. The tissue and subcelluar distributions of detoxical enzymes in adult worker bee between *A. mellifera* and *A. cerana* were examined. Highest activity of AchE was found in the head of two honeybee species, significantly higher than that

in the thorax and abdomen. The AchE activity was focused in the mitochondrion in the cell. Abdomen was the main tissue that had the highest CarE activity. Highest activity was measured in the supernatant. The percentage of supernatant activity in the whole subcellular activity was 63.79% and 75.06% in *A. cerana* and *A. mellifera*. Highest activity of GST was measured in the midgut in two honey bee species. The supernatant had the highest activity in the cell. The percentage of every detoxical enzyme in different tissue and subcellular distribution was different in two honeybee species. The affinity of different tissue to substrates was different in the two species.

3. The change of detoxical enzymes activity was measured in the developmental stages. From larval to adult, the significant difference was found in the activities of GST and CarE in *A. cerana* and *A. mellifera*. No significant changes were found of AchE. The activity of AchE and GST increased with the development of *A. cerana*, while the activity of AchE in *A. mellifera* decreased.

The activity of AchE and GST in the different developmental stage of *A. cerana* was higher than that in *A. mellifera*, except that the activity in the pupae of *A. cerana* was higher than that in *A. mellifera*. The affinity of CarE to substrates was different in different stage of *A. cerana* and *A. mellifera*. The specific activity of AchE, CarE and GST in the drone was higher than that in workerbee.

4. The results of activity of detoxical enzymes in *A. mellifera* showed that age affected the activity. The activity

of detoxical enzymes fluctuated during the span of adult workerbee. The activity of AchE had more changes than CarE. The apex of activity of GST was found in 21 old-day of adult workerbee.

5. The significant difference of activity was measured in the different species. *A. mellifera* from Australia had the highest AchE of $51.227 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$. The highest GST activity was found in *A. mellifera caucasica*.

No significant difference was found in the activity of CarE among six species when α -NA as substrate. When β -NA as substrate, *A. mellifera caucasica* had the highest CarE and significant difference was found in different species. The activity of CarE was higher when β -NA as substrate than that of α -NA.

6. *A. cerana* was more susceptible than *A. mellifera* to five pesticides. The functions and effects of sublethal dose of five pesticides to *A. cerana* and *A. mellifera* were different during 24 hours. There were more changes of CarE and AchE activity that were effected by five pesticides (except malathion) in *A. cerana* than in *A. mellifera*. More changes of GST were measured in *A. mellifera* than in *A. cerana* (except amitraz).

7. Fenpropathrin, methomyl and malathion induced AchE in *A. cerana* and inhibited AchE in *A. mellifera*. Tau-fluvalinate could induce AchE in *A. mellifera* and inhibited AchE *A. cerana*. Amitraz induced more AchE in *A. cerana* and had little function to *A. mellifera*.

Five pesticides could induce more CarE production in *A. cerana*, among five pesticides, tau-fluvalinate inhibited CarE

after inducing. CarE activities were inhibited by five pesticides in *A. mellifera*.

Five pesticides except methomyl could inhibit GST in *A. mellifera*. Methomyl induced GST higher at 16h and from 4h to 8h.

For *A. cerana*, fenpropathrin and methomyl could inhibit GST of the abdomen. Amitraz could induce GST activity. Malathion and tau-fluvalinate induced GST after inhibition.

Key words: *Apis cerana*, *Apis mellifera*, pesticide, detoxical enzyme, sublethal dose

目 录

第一章 引言	1
1 蜜蜂在农业中的地位	1
1.1 蜜蜂在农业增产中的重要作用	1
1.2 蜜蜂在农业可持续发展中的作用	2
1.3 我国养蜂业在世界的地位	3
2 化学农药与蜜蜂	4
2.1 农药对蜜蜂毒性的生物测定	5
2.2 亚致死剂量杀虫剂对蜜蜂的影响	10
3 东方蜜蜂和西方蜜蜂的比较研究	18
4 蜜蜂的解毒酶研究进展	19
4.1 蜜蜂乙酰胆碱酯酶研究	20
4.2 蜜蜂羧酸酯酶研究	22
4.3 蜜蜂谷胱甘肽硫转移酶研究	23
4.4 蜜蜂多功能氧化酶研究	26
5 研究目的和意义	30
5.1 研究目的	30
5.2 研究意义	30
第二章 蜜蜂羧酸酯酶的最适反应条件的测定	31
1 材料与方法	31
1.1 试剂	31
1.2 试虫来源	31

1.3	酶源制备	32
1.4	CarE 活性测定方法	32
1.5	蛋白质含量测定	32
1.6	实验设计	32
2	结果与分析	33
2.1	正交试验结果的极差分析	33
2.2	正交试验结果的方差分析	34
2.3	试验因子各水平间的差异显著性比较	35
3	讨论	36
第三章 蜜蜂解毒酶系的体躯与亚细胞分布研究		38
1	材料与amp;方法	39
1.1	试虫	39
1.2	试剂及仪器	39
1.3	AchE、CarE 和 GST 在蜜蜂体躯的分布	39
1.4	AchE、CarE 和 GST 的亚细胞分布	39
1.5	AchE 活性测定	40
1.6	CarE 活性测定	41
1.7	GST 活性测定	41
1.8	可溶性蛋白质含量测定	42
2	结果与分析	42
2.1	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同组织 AchE 活性	42
2.2	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同组织 CarE 活性	44
2.3	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同组织 GST 活性	45
2.4	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同亚细胞层 AchE 活性	47
2.5	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同亚细胞层 CarE 活性	48
2.6	东方蜜蜂和西方蜜蜂不同亚细胞层 GST 活性	48
3	讨论	49

第四章 蜜蜂发育期解毒酶系变化的研究	55
1 材料与方法	55
1.1 试虫	55
1.2 试剂及仪器	56
1.3 酶源提取与制备	56
1.4 AchE 活性测定	56
1.5 CarE 活性测定	57
1.6 GST 活性测定	57
1.7 可溶性蛋白质含量测定	57
2 结果与分析	57
2.1 东方蜜蜂和西方蜜蜂不同虫态 AchE 活性	57
2.2 东方蜜蜂和西方蜜蜂不同发育期 CarE 活性	58
2.3 东方蜜蜂和西方蜜蜂不同发育期 羧酸酯酶 K_m 测定	59
2.4 东方蜜蜂和西方蜜蜂不同发育期 GST 活性测定	60
2.5 西方蜜蜂成年工蜂不同日龄的 AchE 活性变化	61
2.6 西方蜜蜂成年工蜂不同日龄的羧酸酯酶 活性变化	62
2.7 西方蜜蜂成年工蜂不同日龄的谷胱甘肽硫 转移酶活性变化	63
2.8 不同蜂种 AchE 活性比较	63
2.9 不同蜂种 CarE 活性比较	64
2.10 不同蜂种 GST 活性比较	65
3 讨论	66
第五章 化学农药对蜜蜂解毒酶系的影响研究	71
1 材料与方法	72

1.1	试虫	72
1.2	试剂、化学药剂及仪器	72
1.3	农药对蜜蜂的毒性测定	73
1.4	亚致死剂量化学药剂对蜜蜂的影响样品取样	73
1.5	酶源提取与制备	74
1.6	AchE 活性测定	74
1.7	CarE 活性测定	74
1.8	GST 活性测定	74
1.9	化学农药对蜜蜂 CarE 的离体抑制测定	74
1.10	可溶性蛋白质含量测定	75
2	结果与分析	75
2.1	东方蜜蜂和西方蜜蜂对 5 种化学药剂的 敏感性比较	75
2.2	5 种亚致死剂量的化学药剂对东方蜜蜂和 西方蜜蜂的 AchE 活性影响	76
2.3	5 种亚致死剂量的化学药剂对东方蜜蜂和 西方蜜蜂的 CarE 活性影响	80
2.4	5 种亚致死剂量的化学药剂对东方蜜蜂和 西方蜜蜂的 GST 活性影响	83
2.5	5 种化学药剂对东方蜜蜂和西方蜜蜂的 CarE 离体抑制作用	87
3	讨论	89
第六章 总结		93
1	总结	93
2	本研究的创新之处	95
3	讨论	95
参考文献		97

第一章 引言

1 蜜蜂在农业中的地位

蜜蜂在农业生产中扮演了重要的角色，一方面为人类提供保健功能极佳的蜂产品；另一方面，蜜蜂作为自然界最主要的授粉昆虫，通过对农作物的授粉作用，使得农作物的产量增加，品质改善，不但是生物链上不可缺少的重要环节，而且在现代农业中仍是不可替代的作物授粉者。蜜蜂也是研究昆虫学习行为的模式昆虫。

1.1 蜜蜂在农业增产中的重要作用

世界上与人类食品密切相关的作物超过 1/3 属虫媒植物，需要进行授粉才能繁殖和发展。

蜜蜂分布广泛，自赤道扩展至极圈，遍及全世界的每一个农业区。蜜蜂形态结构特殊，如全身密布绒毛便于花粉的携带，具有食料贮存性、群居性与授粉的专一性，并且可以迁移到任何一个需要授粉的地方。经过人类长期的驯化和饲养管理，蜜蜂已具有高效的授粉作用，加之数量众多，人类还可以训练蜜蜂为特定农作物授粉，而其他昆虫望尘莫及，因此，蜜蜂是人类唯一可以控制的为农作物进行授粉的最理想的授粉者。

世界农业生产实践证明,通过蜜蜂授粉,可使农作物的产量得到不同程度的提高。例如,通过蜜蜂授粉可使荔枝增产 313%~417% (吴杰等,2004),温室桃增产 41.5%~64.6% (历延芳等,2005),西瓜增产 29.3%~32.8% (历延芳等,2006) 等。另外,经蜜蜂授粉可以提高牧草及种子蛋白质含量,提高作物种子发芽率等。更为重要的是,蜜蜂授粉可以改善果实和种子品质,提高后代的生活力,因而成为农业增产的有力措施。据美国农业部的统计,由于蜜蜂授粉而增加的产值是养蜂业自身产值的 143 倍,每年有 20 亿美元的农作物收入来自蜜蜂授粉 (Southwick 等,1992)。我国由于疆域广阔,农业集约化和机械化程度低,因而养蜂业为农业增产增收创造的产值还要高于美国。

1.2 蜜蜂在农业可持续发展中的作用

近年来,人口和环境已成为限制我国农业发展的重要因素。养蜂业的发展必然会缓解和改善我国正日趋遭到严重破坏的生态环境,增加农业可持续发展的后劲。首先,我国绝大部分地区处于季风气候区,昼夜温差大,植物品种众多,尤其是存在大量野生的植物(包括农作物)资源。据初步调查,现被蜜蜂采集利用的蜜粉源植物有 14 317 种,分属于 864 属,141 科,分别占全国被子植物的 58.77%、29.32% 和 48.45%。其中能够生产大宗商品蜜的全国性和区域性主要蜜源植物 50 多种,主要辅助蜜源植物 466 种,主要粉源植物 24 种 (徐万林,1992)。

近几十年来,随着近代农业生产的发展,杀虫剂的广泛使用,消灭了大量野生授粉昆虫,许多有利于植物授粉的昆虫连同植物害虫一起被杀虫剂杀死;机械化水平不断提高,除草剂广泛使用,在荒山上开垦农田,土地大面积平整,从而毁灭了大量野生授粉昆虫的巢穴,并改变了其原有的生态环境,一些授粉昆虫数量减少或从此灭绝;农业产业结构的调整,大规模地种植单一