

中草藥對蜜蜂球囊菌抑菌評估

黃健覃¹ 吳輝虎² 吳登楨² 盧美君*²

¹金門縣政府金沙鎮公所

²行政院農業委員會苗栗區農業改良場

摘 要

蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)導致蜜蜂幼蟲感染白垩病(chalk brood)，本研究利用 4 種中草藥萃取液對蜜蜂球囊菌病原菌抑制作用進行試驗，測試中草藥萃取液抑制菌絲生長情形，評估其防治白垩病之可行性，以發展天然資材與安全防治方法，比較萃取液單方(黃芩或丁香)與複方(黃芩+丁香)之抑菌效果，試驗結果顯示：以複方(7.5~10%)對菌絲抑菌率達 100%，初步證實添加黃芩或丁香萃取液其抑菌作用最顯著。利用 PDB 添加複方濃度 0~5%，測試最大抑菌濃度為 3% 時，即可完全抑制菌絲鮮重及乾重增加，且菌絲球(mycelia pellet)無法形成，顯示出黃芩與丁香複方抑制菌絲生長具協同作用。

關鍵詞：蜜蜂球囊菌、中草藥萃取液、複方、抑菌

前 言

蜜蜂白垩病(chalk brood)由蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)所引起，臺灣最早在 1983 年臺北三峽發現，一年四季皆可發生，主要好發在 4~6 月及 9~11 月兩

時期(朱，1988)。蜜蜂球囊菌主要感染蜜蜂幼蟲，經接種幼蟲 1~3 天後，孢子在中腸萌發膨大為球型，然後伸出發芽管形成菌絲；2~3 天後菌絲由腸道內壁穿透圍食膜侵入真皮細胞；4~5 天後，中腸受到破壞，菌絲自馬氏管穿出

*論文聯繫人
e-mail: lumj@mdais.gov.tw

體壁長出菌絲，體表充滿菌絲，雌雄菌絲在體外交配產生孢囊，為典型白垩病病徵(朱，1988；鄭，2010；李等，2012)。而感染後幼蟲經過 27°C、24 小時低溫處理則增加白垩病罹病數(Vojvodic *et al.*, 2011)。罹病蜂群之蜂勢較弱，將影響蜂產品產量及授粉能力(蘇，1999)。過去為防治白垩病發生，農民利用己二烯酸己及抗生素來防治，造成蜂產品的藥劑殘留(吳與吳，2006)。近年來國家對食品安全極為重視，然蜂產品生產較其他農產品特殊，採收後直接濃縮或乾燥販售，與一般農產品可經清洗或加熱降低農藥殘留濃度有別；國內目前為止除了蜜蜂蜂蟹(*Varroa destructor*)可合法使用福化利(flualinate)外，病害防治仍無任何推薦藥劑。為解決蜜蜂真菌性白垩病之發生，主要在控制病原菌菌絲雜合，進而抑制產生球囊孢子傳播(Christensen and Gilliam, 1983)，自然條件下寄主與病原菌兩者關係相互影響，在不利寄主條件下，重視改善飼養環境，可控制病原菌危害水平(Aronstein and Murray, 2010)。因此；強化蜜蜂健康管理，藉以限制病原菌、寄主與環境(溫度、溼度及食物)等影響條件，進而控制白垩病發生(黃，2013)，長遠之計仍需研發安全防治資材。參考目前有機農業防治真菌病害在目前已研發出多種植物性防治藥劑，如 Milsana® (虎杖 *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai)，葵無露(乳化葵花油)，活力能(五倍子、薑黃、仙草、大蒜等複方組成)等(謝等，2013)。植物萃取物含抑菌二次代謝物，舉凡配糖體(glucosides)、生物鹼

(alkaoids)、帖類(terpenoids)、酚類(phenols)、類黃鹼素(flavonoids)、皂素(saponins)、香豆素(coumarin)等，對菌絲或孢子萌發直接產生殺菌或抑制作用，達到病害防治效果(謝等，2005)。

植物萃取液對蜜蜂球囊菌生長抑制研究亦有相當效果，如利用肉桂、老藤、肉桂、丁香、水菖蒲、玫瑰、百里香等或蜂膠抑制蜜蜂球囊菌菌絲生長(Chantawannakul *et al.*, 2005, Abou *et al.*, 2009)。徐等(2011)利用 11 種中草藥萃取物進行球囊菌抑菌試驗，同樣發現丁香與黃柏組合對蜜蜂球囊菌抑菌效果顯著；吳與吳(2005)利用 14 種中草藥抑菌篩選，發現板藍根與丁香具有抑菌作用，但中藥劑量及濃度在田間使用不當容易造成幼蟲死亡或產生蜜蜂取食忌避情況。本試驗以篩選出對人體及蜜蜂無毒之中草藥，克服中草藥對蜜蜂取食忌避情況，達到穩定有效之抑菌效果，希望提供未來白垩病之防治應用。

材料與方法

一、材料

蜜蜂球囊菌採自臺南鹽水地區蜂場自然發病之蜜蜂幼蟲罹病體，以高溫高壓滅菌(121°C，1.2 kg / cm²，15 分鐘)之馬鈴薯洋菜(Potato Dextrose Agar, PDA, BD Difco™)製成平板(底盤 8.5*1.5 cm)分離純化，培養條件 30 ± 1°C 暗培養(Chantawannakul *et al.*, 2005)，並經柯霍式法則(Koch's rules)病原餵食蜜蜂幼蟲證實白垩病感病力；其純化培養之菌株以PDA保存於 5°C 冰箱備用。

試驗藥材黃芩(*Scutellaria*

aicalensis)、丁香 (*Eugenia aryophylata*)、大黃 (*Rheum tanguticum*)、板藍根 (*Baphicacanthus cusia*) 4 種，以乾重與水 (1:8 w/v) 定量，並利用高溫高壓 (121°C，1.2 kg / cm²，15 分鐘) 水萃取，過濾並收集冷藏於 5°C 備用，試驗藥材除板藍根產地為臺灣，其餘皆為中國大陸進口。

二、方法

(一) 蜜蜂球囊菌分離與純化

蜜蜂球囊菌採集後沾染於 PDA 平板，菌絲生長產生子囊以顯微鏡鑑定，行繼代分離培養，重複 2~3 次。菌株純化培養一週所形成蜜蜂子囊球，加入調配好 1:1 (v/v) 果糖水餵食蜜蜂幼蟲，以確定菌株具白堊病感病力。抑菌試驗利用活化培養一週菌絲為材料，利用圓周直徑 0.5 cm 鑽孔器切取菌塊，培養於中草藥抑菌培養基。

(二) 球囊菌抑菌試驗

1. 抑菌中草藥種類篩選及濃度試驗

四種中草藥 (黃芩、丁香、大黃及板藍根) 經高溫萃取過濾，分別添加 10% 萃取液到 PDA 培養基，經高溫高壓滅菌後倒入平板，篩選出效果最佳中草藥，並以未添加中草藥萃取液 PDA 為對照組。每處理 8 重複，每重複放一圓周直徑 0.5 cm 菌塊，

培養 4 天及 7 天後觀察菌絲增殖平均生長直徑 (cm)。

2. 中草藥單方與複方抑菌效果比較

黃芩及丁香經水萃取過濾後分別以濃度 10% 添加於 PDA 配方或兩中藥以 1:1 混合為複方母液，分別以濃度 10%、7.5%、5.0%、2.5% 添加於 PDA 配方，配置完成再經高溫高壓滅菌後倒入平板，作抑菌效果比較試驗。每處理 8 重複，每重複放一圓周直徑 0.5 cm 菌塊，培養 4、7 和 14 天後觀察菌絲平均生長區直徑 (cm)，比較抑菌效果。

3. 中草藥複方最低抑菌濃度試驗

以試驗 2 中藥複方為基礎，分別添加濃度 0、1、2、3、4 及 5% 於馬鈴薯液體培養基 (Potato Dextrose Broth, PDB, BD Difco™)，每試驗濃度以 50 mL 離心管裝入 20 mL，每處理 5 重複，每重複放入一個平均 0.07 g 菌塊，培養於 30°C 無照光生長箱，以旋轉式轉盤仰角 45°，80 rpm 培養 8 天再觀察菌絲團之形成狀況，菌塊並以衛生紙吸乾水分後秤其鮮重，再以烘箱調至 45°C 持續 48 小時

乾燥秤取乾重。

4. 統計分析

數據結果以excel變方分析(ANOVA)檢定達差異顯著性，再利用Fisher最小顯著差異性 (Fisher's Least Significance Difference, LSD)多重比較檢定 ($P < 0.01$)(呂等，2006、2011)。

結 果

一、中草藥種類篩選與濃度試驗

四種中草藥抗菌篩選，在本試驗中以對照組比較，培養 7 天菌絲平均生長區直徑為 6.7 cm。添加黃芩與丁香培養 4 到 7 天菌絲平均生長區直徑為 0~1.7 cm，平均抑菌效果為 74.6~100%，最為顯著（表一）；其次為添加大黃菌絲平均生長區直徑為 2.3~4.6 cm，平均抑菌效果為 30%；添加板藍根菌絲平均生長區直徑與對照組相較略為增加 4.2~7.8 cm，未達顯著抑菌效果。以LSD多重比較分析抑菌效果，顯示黃芩及丁香與其他處理之間有顯著性之差異。

表一 10%中草藥萃液對蜜蜂球囊菌菌絲生長抑菌活性
Table 1. Antifungal activity of 10% of the tested herbal extracts against the mycelium growth of *Ascosphaera apis*

Herbal water extracts	Mean diameter of growth zone (cm) ^x		Average growth inhibition (%) ^y
	4(Day)	7(Day)	7(Day)
<i>Scutellaria aicalensis</i>	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	100.0
<i>Eugenia aryophylata</i>	0.00 ± 0.0 a	1.70 ± 0.4 b	74.67
<i>Rheum tanguticum</i>	2.31 ± 0.5 b	4.68 ± 0.4 c	30.35
<i>Baphicacanthos cusia</i>	4.21 ± 0.3 d	7.89 ± 0.4 e	-17.50
Control	3.13 ± 0.2 c	6.71 ± 0.3 d	0.000

^x Means ± standard error(n=8). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at $P > 0.01$ by Fisher's protected LSD test.

^y Average growth inhibition (%) = $100 \times (\text{Control} - \text{Treatment}) / \text{Control}$

二、中草藥單方與複方抑菌效果比較

取黃芩或丁香單方及其複方(0、2.5、5.0、7.5和10%)分別配置成抑菌PDA培養基，並觀察蜜蜂球囊菌培養 4

天、7天及 14 天菌絲生長狀況，發現對照組菌絲於培養第 4~7 天絲平均生長區直徑 4.56~7.79 cm；而添加單方培養 4 天菌絲無生長現象，7 天及 14 天絲生長絲平均生長區直徑在 0.09~2.84 cm；添

加複方菌絲生長皆顯著達到抑制作用。試驗培養 7 天觀察，隨複方添加濃度增加，抑菌效果越為明顯(圖一)，比較菌絲平均生長區直徑，濃度 2.5%培養為 2 cm；濃度 5.0%為 1.15 cm，相較黃芩及丁香單方抑菌效果無差異，抑菌率皆為

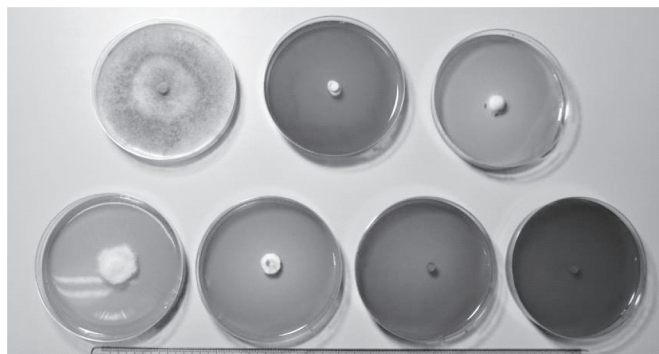
84~87%；濃度 7.5~10%培養可完全抑制菌絲生長，平均生長抑制率可達 100%，持續觀察培養14 天菌絲平均生長區直徑僅 0~0.76 cm，幾乎完全抑制菌絲生長(表二)。

表二、黃芩與丁香萃取液對蜜蜂球囊菌菌絲生長抑菌效果
Table 2. Antifungal activity of combination of *Scutellaria aicalensis* and *Eugenia aryophylata* of extracts on mycelium growth of *Ascosphaera apis*.

Antifungal treatment	Mean diameter of growth zone (cm) ^x			Average growth inhibition (%) ^y	
	4(Day)	7(Day)	14(Day)	4(Day)	7(Day)
Control	4.59 ± 0.7 d	7.79 ± 0.0 e	8.5 ± 0.0 e	0.00	0.00
<i>Scutellaria aicalensis</i> 10%	0.00 ± 0.0 a	1.18 ± 0.1 c	2.84 ± 0.7 c	100	84.9
<i>Eugenia aryophylata</i> 10%	0.00 ± 0.0 a	0.99 ± 0.2 c	2.76 ± 0.4 c	100	87.3
Combination 2.5%	1.23 ± 0.1 b	2.00 ± 0.0 d	4.35 ± 0.7 d	73.2	74.3
Combination 5.0%	0.61 ± 0.3 c	1.15 ± 0.0 c	2.63 ± 0.1 c	86.6	85.2
Combination 7.5%	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.76 ± 0.1 b	100	100
Combination 10%	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 a	100	100

^x Means ± standard error(n=4). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at $P > 0.01$ by Fisher's protected LSD test.

^y Average growth inhibition (%) = 100X (Control - Treatment)/Control



圖一 中草藥組合對蜜蜂球囊菌抑菌效果

Fig 1. Antifungal activity of combined herbal extracts against *Ascosphaera apis*. A. Untreated plates, B. *Scutellaria baicalensis* 10%, C. *Eugenia aryophylata*10%, D. combination 2.5%, E. combination 5%, F. combination 7.5%, G. combination 10%.

三、中草藥複方（黃芩+丁香）最低抑菌濃度試驗

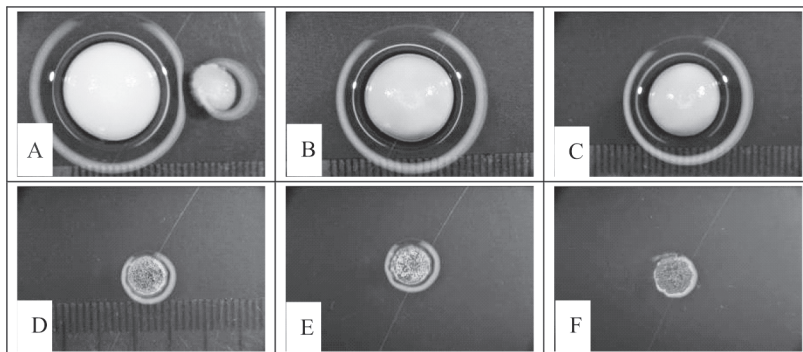
PDB培養基添加複方 0、1、2、3、4及5%觀察菌絲生長抑制，培養 8 天後調查對照組菌絲鮮重及乾重分別為 0.19 及 0.032 g；添加複方濃度 2%為 0.12 及

0.012 g，菌絲鮮重及乾重顯著受到抑制，但仍可形成菌絲球；添加濃度在 3~5%，菌絲生長鮮重(0.04~0.06 g)及乾重(0.03 g)完全抑制(表三)，菌絲球更無法形成(圖二)。

表三 複方(黃芩+丁香)萃取濃度對蜜蜂球囊菌菌絲乾重及絲重抑制影響
Table 3. Effect antifungal of different concentrations of herbal extracts combination on the mycelia dry weight and fresh weight in PDB

Compound Concentration (%)	Fresh weight(g) ^x	Dry weight(g) ^x
0	0.19 ± 0.03 c	0.032 ± 0.013 d
1	0.15 ± 0.03 bc	0.023 ± 0.001 c
2	0.12 ± 0.05 b	0.012 ± 0.006 b
3	0.06 ± 0.02 a	0.003 ± 0.001 a
4	0.04 ± 0.00 a	0.003 ± 0.000 a
5	0.04 ± 0.00 a	0.003 ± 0.000 a

^x Means of five replicates ± standard error(n=5). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at $P > 0.01$ by Fisher's protected LSD test.



圖二 中草藥複方濃度(A) 0 (B) 1% (C) 2% (D) 3% (E) 4%及(F) 5%對蜜蜂球囊菌菌絲球抑制。
Fig 2. Effect of different herbal combination antifungal concentrations (A) 0%, (B) 1%, (C) 2%, (D) 3%, (E) 4% and (F) 5% on the mycelial pellet inhibition of *Ascospheara apis*.

討 論

植物富含多種抑菌二次代謝物，其萃取物對真菌菌絲生長或孢子萌發，可直接達到殺菌功能(謝等，2013)。本試驗萃取液黃芩、丁香和黃芩+丁香複方抑制效果顯著，有助於未來白堊病防治替代資材研製。黃芩含有黃芩素(scutellarein)、黃酮類(flavones)及黃芩苷(baicalin)等成分，藥理作用具有廣泛抗菌譜及抗病毒作用(曾，2012)。丁香含丁香油及丁香酚，對於真菌病害具有抑制作用(林等，2010)。在蜜蜂球囊菌抑菌研究中，Abou等(2009)利用18種精油抑菌試驗，發現肉桂、丁香等對蜜蜂球囊菌抑菌效果較佳。Chantawannakul等(2005)利用丁香、老藤葉、八角、肉桂、水菖蒲有機溶劑萃取抑菌試驗，發現老藤葉與肉桂抑菌效果顯著。徐等(2011)利用11種中草藥萃取液抑菌試驗，發現丁香及黃柏對蜜蜂球囊菌菌絲生長抑制效果最佳。由前人研究顯示無論有機溶劑萃取或水萃取之丁香皆有抑菌作用，但以有機溶劑萃取可能產生殘留問題。黃芩以熱水萃取亦有抑菌效果(吳與吳，2006)，與板藍根及丁香相較下抑菌效果較差，可能市售黃芩在不同栽培環境及成長期影響有效成分黃芩苷與黃芩素而產生差異。本試驗藥材除板藍根為臺灣栽培，其餘皆為中國大陸進口，並以乾重與水定量後利用高溫高壓滅菌釜萃取，每次水萃取量較固定，藥效也較開放鍋爐萃取穩定。

植物真菌病害防治多以單一中草藥為主，如以2% Milsana®(虎杖)噴施植物葉，進而誘導寄主植物抵抗白粉病菌的

入侵，而達到防治白粉病的目的。利用葵花油經過乳化後製成「葵無露」乳劑，噴佈於番茄植株上，可在植物體表面形成一層薄膜，能阻隔病原菌孢子發芽與菌絲生長，以防治白粉病、銹病、露菌病。林等(2010)利用丁香油抑制十字花科炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)分生孢子萌發，觀察發現丁香油可導致菌絲膨大變形及附著器原生質滲漏，進而利用丁香油水溶液添加N、P、K、Ca及Mg等鹽類複方，提高了丁香油抑菌協同作用。本試驗中黃芩及丁香複方對蜜蜂球囊菌菌絲生長達顯著抑制作用，可能黃芩與丁香兩種中草主成分不同，以造成蜜蜂球囊菌菌絲生長抑制達到協同作用。

將蜜蜂球囊菌菌塊添加複方培養於PDB液體培養基，觀察菌絲鮮重及乾重增加狀況，發現3%複方(黃芩+丁香)可完全抑制菌絲生長，對菌絲球更無法形成。初步田間試驗觀察，利用複方與果糖水(1:1 v/v)混合餵食蜂群，對蜂群不會產生取食忌避或幼蟲死亡現象，未來將進一步田間試驗，以評估作為白堊病非農藥防治應用與推廣。

引用文獻

- 呂秀英、魏夢麗、呂椿棠。2006。用Excel解決農業研究資料統計分析的方法(五)－變方分析及LSD。農業試驗所技術服務 68: 31-34。
- 呂秀英。2011。正確使用統計圖表呈現處理間比較。台灣農業研究 60(1) 61-71。
- 林秋琮、林宗俊、黃振文。2010。丁香

- 油與植物營養防治十字花科蔬菜炭疽病之效果評估。植物病理學會刊 19: 167-176
- 李江紅、鄭志陽、陳大福、梁勤。2012。影響蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼蟲的因素及侵染過程觀察。昆蟲學報 55(7)：790-797。
- 黃健覃。2013。蜜蜂白垩病與健康管理。苗栗區農業專訊 63：17-18。
- 徐國鈞、梁勤、畢泗偉、李善飛、溫健、柳健元、董強、李釗。2011。丁香等 11 種中草藥水浸提液對蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)的抑制作用研究。中國蜂業 66：33-36。
- 朱亮光。1988。台灣蜜蜂白垩病之研究。國立臺灣大學植物病蟲害學研究所博士論文。臺灣。
- 蘇新元。1999。蜜蜂病蟲害之防治。台灣養蜂業展望研討會 P83-91。
- 吳輝虎、吳登楨。2005。丁香、板藍根防治蜜蜂白垩病之研究。苗栗區農業專訊 30：6-7。
- 吳輝虎、吳登楨。2006。草本植物防治蜜蜂白垩病之開發研究。台灣昆蟲特刊 8: 103-110。
- 謝廷芳、黃振文、黃鴻章。2013。有機可用資材防治作物病害之研究現況與展望。植物保護通 28：10-28。
- 曾樹城。2012。認識中藥。中榮醫訊 170:26。
- 鄭志陽。2010。蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼蟲的生物學與病理學研究。農林大學碩士學位論文。中國福建。
- Abou El-Enain, H. T., M. F. Abdel-Rahman and K. A. M. Abo-Elyousr.** 2009. Inhibitory activity of certain natural products on the growth of *Ascosphaera apis*. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 12(2):99-106.
- Aronstein, K. A. and K. D. Murray.** 2010. Chalkbrood disease in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103:20-29.
- C h a n t a w a n n a k u l , P . , T . P u c h a n i c h a n t h r a n o n a n d S . W o n g s i r i .** 2005. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the growth of *Ascosphaera apis*. ISHS Acta Horticulturae 678(4):183-189.
- Christensen, M. and Gilliam M.** 1983. Notes on the *Ascosphaera* species inciting chalkbrood in honey bees. Apidologie 14:291-297.
- Vojvodic, S., A. B. Jensen., R. R. James., J. J. Boomsma and J. Eilenberg.** 2011. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. Vet. Microbiol. 149:200-205.

Inhibitory effect of herbal extracts on the growth of *Ascosphaera apis*

Chien-Tan Huang¹, Huei-Hu Wu², Den-Jin Wu², and Mei-Chun Lu*²

¹Jinsha Township Office, Kinmen County Government, Taiwan, R. O. C.

²Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli County 363, Taiwan

ABSTRACT

Ascosphaera apis is a main fungal pathogen causing Chalk brood disease in honey bee larvae, seriously effect the beekeeping industry. To develop a safe controlling method, effect of four water herbal extracts on inhibitory of *Ascosphaera apis* and the growth of the fungi were evaluated. The results showed that the water extract of clove and skullcap have the strongest inhibiting effect on growth of *Ascosphaera apis*. Comparison of unilateral (skullcap or clove) and combinations (skullcap and cloves) herbal water extract, the later one showed higher antifungal inhibitory activity effect than the former one. The maximum inhibitory concentration of combinations was determined within 3%(v/v). Test confirmed that skullcap and cloves compound with synergistic inhibition of mycelial growth.

Key words: *Ascosphaera apis*, herbal extracts, combinations, inhibitory