

2018 蜜蜂與蜂產品研討會 論文集

2018 年 9 月 7 日

國立虎尾科技大學

第二教學區 綜三館 地下一樓國際會議廳

杜武俊 吳明城 林峻賢
吳姿嫻 陳本翰

主編

鄭采玄 美編

主辦單位

台灣蜜蜂與蜂產品學會

台灣養蜂協會

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

協辦單位

國立中興大學昆蟲學系

國立虎尾科技大學生物科技系

台灣蜜蜂與蜂產品學會

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

編印

2018 年 09 月出版

2018 蜜蜂與蜂產品研討會

時間	議程	題目	主持人
09:00-09:30	報到		
09:30-09:50	開幕及致詞	致開幕詞	吳明城 秘書長
		來賓致詞	
09:50-10:00	大會合照		
10:10-11:00	專題演講	台灣東方蜂囊狀幼蟲病監測調查及研究 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 乃育昕 助理教授	杜武俊 理事長
11:00-11:20	報告一	台灣地區蜜蜂急性中毒樣態分析 行政院農業委員會苗栗區農業改良場 吳姿嫻 課長	彭及忠 副教授
11:20-11:40	報告二	淺談蜜蜂與友善環境 台灣養蜂協會 鄭金崑 理事長	
11:40-12:00	報告三	1977「全國蜂蜜品嚐展示會」回顧 台灣蜜蜂與蜂產品學會 安奎 榮譽顧問	
12:00-13:40	午餐休息時間/會員大會		
13:40-14:00	報告四	利用丁酸鈉誘導西方蜂免疫與解毒基因表現 進而增加對環境逆境的抵抗能力 國立臺灣大學昆蟲學系 吳岳隆 助理教授	陳裕文 教授
14:00-14:20	報告五	低劑量益達胺對不同齡期蜜蜂基因表現之影響 國立臺灣大學昆蟲學系 陳韻如 博士	
14:20-14:40	報告六	義蜂育王之實務分享 台灣養蜂協會 陳威年 副理事長	
14:40-15:00	報告七	台灣西洋蜜蜂潛伏感染蜜蜂病毒區域性調查分析 行政院農業委員會苗栗區農業改良場 陳本翰 助理研究員	宋一鑫 助理教授
15:00-15:20	報告八	應用無人航空載具追蹤蜜源植物 特有生物研究保育中心 呂明倫 博士	
15:20-15:40	報告九	東方蜂囊狀幼蟲病毒對西洋蜂幼蟲影響評估 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 張紫婷	
15:40-16:00	蜂界交流座談		

一、活動時間與地點：

時間：2018 年 9 月 7 日(星期五)上午九時至下午四時。

地點：國立虎尾科技大學 第二教學區 綜三館 地下一樓國際會議廳。

二、主辦單位：

台灣蜜蜂與蜂產品學會 /台灣養蜂協會 /行政院農業委員會苗栗區農業改良場

序 一

蜜蜂藉由採集花蜜與花粉繁衍族群，但同時也完成許多植物的授粉工作；在農業上其為農作物授粉所產生的收益往往遠超過蜂產品本身的價值，因此蜜蜂扮演農業生態上不可或缺的角色。台灣的蜂產品年產值已突破 30 億新台幣，而估計蜜蜂授粉間接年產值更是高達 200 億至 300 億新台幣之間，是台灣重要農產業，蜜蜂更是農業上重要的經濟動物之一。然近年受到環境變遷之影響，如農藥誤用傷害蜂群、蜂群衰竭失調症(Colony Collapse Disorder, CCD)、細菌性、真菌性、病毒性等病害之發生、蜂蟹蝨危害、營養失調等諸多因素造成全球養蜂業受到嚴重危害。台灣近年更發生東方蜂大規模感染囊狀幼蟲病，造成飼養野蜂蜂農之損失。凡此種種，除了造成蜂產業產值衰退，更甚者，將影響台灣農業之永續發展。

台灣蜜蜂與蜂產品學會基於台灣蜂產業之永續經營，以及身為台灣蜂產業唯一之專業學術性社團，在面對蜜蜂相關議題，更應責無旁貸於產、官、學扮演重要角色。學會成員包含蜂產業、政府機關、學術單位與檢驗機構等四大領域，學會作為一個溝通交流的絕佳平台，可以即時反映蜂產業所面臨的問題，集思廣益尋求解決問題的方法或因應之道。以期台灣在蜜蜂生物學之相關研究、蜂群管理技術、蜂產品質量檢測以及相關法規之執行能與國際接軌，進而提升台灣蜂產業之生產力與競爭力，讓甜蜜產業再次升級，再創嶄新局面。

延續去年合辦的成功模式，今年再次由本會、台灣養蜂協會、行政院農業委員會苗栗區農業改良場三方共同主辦 2018 蜜蜂與蜂產品研討會。本次由環境、農藥與疾病等三大面相切入，報告內容包含台灣東方蜂囊狀幼蟲病毒監測調查及其對西洋蜂幼蟲之影響、環境農藥對蜜蜂棲群及生理之影響、西洋蜂育王經驗分享以及利用無人機調查蜜源植物花期狀況之應用。在在體現對於蜜蜂相關議題之重視，期望藉由此次研討會的成果分享、經驗交流與意見交換，讓台灣不僅在蜂學研究和養蜂技術上，甚至未來在蜂產品之研發，得以更加精進。

台灣蜜蜂與蜂產品學會 理事長
杜武俊 謹識

中華民國 107 年 9 月 7 日

序 二

金崑從小伴著蜜蜂長大。有記憶以來，幾乎天天都跟著父母親在蜂場裡度過。回想上小學之後，課餘時間總要到蜂場幫忙父母親整理蜂群、清除臘片或搖蜜、收花粉等，雖然一路被蜜蜂叮到大，但也因此與蜜蜂結下難解的情緣。

1991 年金崑正式接下家裡的養蜂事業，憑藉著父執輩傳承的蜜蜂管理技術，在台中外埔一隅展開養蜂生活。之後，在家人支持下，走出外埔，到嘉義阿里山採收茶花粉，到高雄大樹採收玉荷包蜂蜜，開始接觸來自台灣各地的養蜂先進。這段期間，先進前輩們不吝分享他們的養蜂經驗，言談中或蜂場實際觀摩中，漸而解開金崑在養蜂上的許多疑惑與瓶頸，受益良多。

金崑一直認為，「養蜂的學問，一輩子都學不完。」只有透過不斷的學習與交流，尤其是學術界與養蜂業界之間成果經驗的相互分享，對於養蜂管理技術的進步成長，助益最大。

本次承蒙台灣蜜蜂與蜂產品學會杜理事長盛情邀約，請本會參與主辦「2018 蜜蜂與蜂產品研討會」，備感榮幸之至，也期待透過研討會的交流，進一步拓展台灣養蜂農民管理視野與技術層次，欣然之餘，特為之序。

台灣養蜂協會 理事長

鄭金崑 謹識

中華民國 107 年 8 月 15 日

序 三

台灣近 10 年專業養蜂戶數發展迅速，從七百戶逐步上升至今年破千戶，且養蜂產業產值也逐年增加，至 2017 年國內蜂產品年產值已突破 30 億，顯示蜂產品越來越受到市場的肯定。加上城市養蜂與林下養蜂議題發燒，『養蜂』似乎已成為國人熱衷的全民運動，而蜜蜂生存與蜂產品安全不僅受到國人的關注，更是全球糧食生產安全的重要議題。

國內蜂產業發展目前所面臨的最艱困挑戰，始終圍繞在農藥對蜜蜂健康之威脅及新興蜜蜂病害造成本土野蜂族群銳減的問題上打轉，而其造成的影響不僅止於蜂產品之生產，因蜜蜂是最主要的植物授粉媒介昆蟲，更是牽動著國內農糧生產安全與環境生態永續發展的重要關鍵。這兩年國內不論政府機關或學術單位都積極投入調查瞭解這些棘手問題的各種面向，探討其發生原因與過程，以尋求最佳的解決之道。苗栗區農業改良場為全國唯一的養蜂技術之研究、輔導及推廣的政府機關，為了精進國內養蜂技術、促進蜜蜂健康、守護生態永續利用，長期以來不斷投入蜜蜂病蟲害防治相關研究，已發展並推廣蜂蟹蝨整合性防治技術，現階段更積極配合農委會 10 年化學農藥減半政策，參與國土綠色保育生態廊道建置工作，加強有機與友善農耕之研究與推廣，發展天敵量產技術與防治策略於田間害蟲防治，如建立以平腹小蜂防治荔枝椿象之綜合防治策略、開發草蛉智慧化量產系統等，期望透過生物防治的天敵昆蟲釋放能減少田間化學農藥使用，還給蜜蜂安全友善的生存環境。

延續去年，今年由台灣蜜蜂與蜂產品學會、台灣養蜂協會及苗栗區農業改良場共同發起辦理蜂學研討會。本次研討會以蜜蜂健康與友善環境為主軸，從農藥、蜜蜂疾病、蜜粉源植物等外部環境因子之調查分析至蜜蜂育王及特定基因表現等內部因子之探討，提出各領域對本次研討會核心議題的研究與心得。如同蜜蜂這種社會性昆蟲一般，大家堅守自己的崗位，分工合作，藉由知識與經驗的傳遞、分享及交流，能讓與會人員獲得更多的訊息，彼此調整腳步，攜手並進，共同激發出提升蜜蜂健康與解決養蜂困境的最佳策略，綜理出國內蜂產業發展與蜂學研究的嶄新思維與方向。

行政院農業委員會苗栗區農業改良場 場長
呂秀英 謹識

中華民國 107 年 9 月 1 日

目錄

1. 台灣東方蜂囊狀幼蟲病監測調查及研究	1
柯仲宇、張紫婷、徐培修、宋一鑫、蔡文錫、陳裕文*、乃育昕*	
2. 台灣地區蜜蜂急性中毒樣態分析	14
吳姿嫻*、徐培修、陳香君、黃玉如、楊小瑩、鄭鈞元	
3. 淺談蜜蜂與友善環境	22
鄭金崑	
4. 1977「全國蜂蜜品嚐展示會」回顧	24
安奎	
5. 利用丁酸鈉誘導西方蜂免疫與解毒基因表現進而增加對環境逆境的抵抗能力	31
唐政綱、吳岳隆*	
6. 低劑量益達胺對不同齡期蜜蜂基因表現之影響	42
陳韻如、曾德維、丁婕、徐培修、吳姿嫻、鍾思林、楊恩誠	
7. 義蜂育王之實務分享	50
陳威年	
8. 台灣西洋蜜蜂潛伏感染蜜蜂病毒區域性調查分析	52
陳本翰*、徐培修	
9. 應用無人航空載具追蹤蜜源植物	61
呂明倫、黃靜宜、宋一鑫	
10. 東方蜂囊狀幼蟲病毒對西洋蜂幼蟲影響評估	68
張紫婷、乃育昕、陳裕文*	

(編排主要以投稿作者演講時間為順序)

台灣東方蜂囊狀幼蟲病監測調查及研究

柯仲宇¹、張紫婷¹、徐培修²、宋一鑫³、蔡文錫³，陳裕文^{1*}、乃育昕^{1*}

¹ 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系

² 行政院農委會苗栗區農業改良場

³ 國立嘉義大學植物醫學系

*通訊作者:陳裕文;乃育昕

電子郵件: chenyw@niu.edu.tw; ysnai@niu.edu.tw

通訊地址:宜蘭縣宜蘭市神農路一段1號

摘要

台灣的東方蜂(*Apis cerana*)屬本地種，為台灣野外植物重要授粉昆蟲。然而，台灣於2015年首次在東方蜂上記錄到蜜蜂囊狀幼蟲病毒(Sacbrood virus, SBV)之感染症狀。SBV為單股正鏈的蜜蜂類RNA病毒，在東方蜂與西洋蜂(*A. mellifera*)兩種蜜蜂身上皆有感染現象，在西洋蜂族群並無造成明顯的蜂損，但感染東方蜂族群則會造成大量死亡。有鑑於此，本研究由2016年的9月份開始進行東方蜂、西洋蜂 AcSBV長期監測。除記錄蜂群是否出現典型病徵外，同時採樣進行分子檢測 (RT-PCR)。結果顯示，AcSBV於2016年在台灣東方蜂族群迅速蔓延，造成大量蜂群死亡，全台流行率由9月47.1%上升至12月69.6%，部分西洋蜂族群(37.5%)亦可偵測到此病毒。2017年，針對北部及東部地區監測結果顯示，東方蜂蜂群平均感染率高達76.75%，而西洋蜂蜂群的平均感染率則較低(48.18%)。基於東、西方蜂幼蟲對 AcSBV之感受性差異，在2017年4月，蜂場將西洋蜂引入後，蜂群 AcSBV檢出率為 100%。2017後半年的監測結果發現西洋蜂之AcSBV帶原趨勢具有環境病毒監測指標之功能。2018年AcSBV在東方蜂中的感染率接續了2017年的高帶原率(70%)，但至5月，東、西方蜂蜂群檢出率則遽降；此外，以AcSBV人工感染西洋蜂之成蜂與幼蟲，證實對AcSBV對西洋蜂無明顯致病現象，但病毒仍可於西洋蜂體內複製。因此，西洋蜂群雖有潛力成為AcSBV轉移物種，將可為東方蜂群分擔環境病毒壓力，然而，此部分仍是需進一步評估。本研究證實AcSBV在西洋蜂群有帶原但不發病的特性，且可作為環境病毒指標，以利環境監測及好發預測。未來在抗病育種與有益食料添加上仍是針對抗蜜蜂病毒性疾病可努力的方向。

關鍵詞: 東方蜂、西洋蜂、東方蜂囊狀幼蟲病毒、蜜蜂人工飼養、人工感染

囊狀幼蟲病

囊狀幼蟲病或囊雛病(sacbrood disease)是由一種正鏈核糖核酸的單股RNA病毒 (positive-sense ssRNA virus)所引發的蜜蜂疾病，主要造成之病原為囊狀幼蟲病毒 (sacbrood virus; SBV)，屬於傳染性軟化症病毒科(Iflaviridae)、傳染性家蠶軟化症病毒屬(Iflavirus)，病毒外鞘光滑無過度起伏皺褶(Bailey et al., 1964; Baker and Schroeder, 2008; Chen et al., 2006; Zhang et al., 2001)。SBV是最早被發現的蜜蜂病毒之一，感染蜜蜂幼蟲與成蜂，主要造成蜜蜂幼蟲死亡，但成蜂病徵不明顯。病毒藉由田間粉蜜源經蜜蜂取食或由蜜蜂互相餵食傳播，當蜜蜂幼蟲感染病毒後，體內病毒開始複製濃度會逐漸升高，並影響蜜蜂幼蟲開始發病；罹病後的幼蟲頭部和胸部顏色逐漸改變，從白色變至淡黃色，最後變成深褐色或黑色，死亡的幼蟲體壁堅韌，但體內逐漸液化，死亡後形成囊狀結構的完整角質層和液化組織。當蜂群中幼蟲染病後，依罹病程度概分為幼蟲期發病與蛹期發病，前者是幼蟲化蛹前死去，幼蟲死去後不會平躺於蜂室底部，而呈現尖頭狀，體色不鮮明，且體節分節也不明顯，並逐漸囊化並黏附在巢室一側，通常不久後即會被工蜂拖出巢外。蛹期發病是罹病幼蟲進入蛹期，罹病輕微者可能羽化，嚴重者則無法羽化，死亡之蛹體則被工蜂拖出巢外，造成族群縮減(Bailey, 1969; Chen and Siede, 2007; White, 1917)。

關於在西洋蜂及東方蜂所發現之SBV分離株可追溯至早期，1964年，首次發現 SBV是在西洋蜂，因此將此病毒稱為西洋蜂囊狀幼蟲病毒 (*A. mellifera* Sacbrood virus, AmSBV，同時亦可以簡稱其為SBV的命名)；目前SBV已被證實廣泛散佈於全球各地之西洋蜂群(*Apis mellifera*) (Antunez et al., 2006; Dall, 1985; Freiberg et al., 2012; Nielsen et al., 2008; Tentcheva et al., 2004)。然而SBV在西洋蜂體內發病的症狀較為輕微，幾乎等同未發病，因此感染SBV之西洋蜂群鮮少發生巨大損害；但是在東方蜂族群(*A. cerana*)中，SBV可造成嚴重病徵，並且會一直持續直到族群完全崩解(Anderson, 1995; Blanchard et al., 2014)。更進一步證據顯示，由西洋蜂與東方蜂分離之SBV擁有不同血清型(serotypes)及化學特性(Gong et al., 2016; Roberts and Anderson, 2014; Zhang et al., 2001)，且此二病毒不互相感染其寄主(AmSBV對東方蜂不具感染性，反之亦然)，因此在東方蜂中發現的SBV即稱為東方蜂囊狀幼蟲病毒(*A. cerana* sacbrood virus; AcSBV)以區分兩種病毒(Dong et al., 1984; Gong et al., 2016)。

東方蜂囊狀幼蟲病毒之流行與基因體學研探討

從1976年開始，在亞洲地區幾個國家的東方蜂陸續遭受AcSBV嚴重感染與傷害，甚至在中國廣東及韓國造成東方蜂群嚴重損失。泰國於1976年時發現東方蜂上感染此病毒，其後在印度、中國、韓國等地亦發現AcSBV感染，且會導致東

方蜂群極高的死亡率，在1991-92年期間，泰國爆發災難性的囊狀幼蟲病，造成超過90%的蜂群破壞，造成蜂蜜產量大幅下降。越南地區首次偵測到AcSBV (AcSBV-Viets)則是在 1974年，此次AcSBV感染造成90%的東方蜂群損失紀錄。而鄰近大陸之島嶼如日本於蜜蜂科學期刊上報導2009年於東方蜂疑似發生囊狀幼蟲病(Choi et al., 2010; Gong et al., 2016; Kim et al., 2008; Rana et al., 1986; Verma et al., 1990; Zhang and Han, 2008)。如上所述，雖然過去大部分的研究推斷東方蜂囊狀幼蟲病毒(AcSBV) 跟西洋蜂囊狀幼蟲病毒(AmSBV) 之間不存在跨物種感染(Dong et al., 1984; Verma et al., 1990)；近來許多研究透過病毒基因體序列分析及分子演化的證據，提出 AcSBV與AmSBV可能具有交乎感染寄主以及基因體重組之現象發生(Li et al., 2016; Reddy et al., 2017; Reddy et al., 2016)。

韓國在2012年發表在西洋蜂上發現之2株SBV (AmSBV-Kor19, AmSBV-Kor21) 之全基因體序列(Choe et al., 2012)。此二AmSBVs在基因體學上具有不同特徵，包含基因體限制酶片段多型性(*Pst*I Restriction enzyme polymorphism)、基因體全長 (8784 bp 與 8835 bp)、開放譯讀區(Open reading frame, ORF)長度(胺基酸長度2843 與2860)等。而病毒RdRp基因序列演化分析結果顯示AmSBV-Kor19與韓國之 AcSBV分離株(AcSBV-Kor)相近且與其他西洋蜂分離株的基因組不同，進而成為早期SBV於不同宿主交互感染的證據(Choe et al., 2012)。此外，Reddy等人將4株韓國 SBV分離株(AmSBV-Kor1, AmSBV-Kor2, AcSBV-Kor3及AcSBV-Kor4)進一步解序，分析比較後也發現類似AmSBV與AcSBV序列相似而被分入AcSBV之現象(Reddy et al., 2016)。在1974年，越南地區首次偵測到AcSBV(AcSBV-Viets)，在2006年，亦於西洋蜂體內亦測得AmSBV-Viets。分析比較9個越南SBV分離株(分別為 AcSBV-Viet1-3,5,7-9及AmSBV-Viet4, 6)與其他各國發現的7種SBV分離株(包含韓國分離株:AmSBV-Kor19, AmSBV-Kor21, AcSBV-Kor；及中國分離株: AcSBV-China；印度分離株: AcSBV-India；越南分離株: AcSBV-VietSBM2；英國分離株: AmSBV-UK)之基因體，結果顯示9個越南SBV分離株之序列相似度高達為 91-99%而與其他7個分離株之相似度為89-94%。而越南SBV分離株在ORF與其他7 個分離株具有較高差異，又以VP1片段差異最高，且AmSBV-Viet6跟AcSBV-Viet9 之VP1具有額外且連續的51核苷酸序列(17胺基酸序列)區域。比較VP1區域的基因可以發現除了AmSBV-Viet6跟AcSBV-Viet9以外的其他越南SBV分離彼此十分相似，且都缺少17個連續的氨基酸。由全基因體序列的演化樹分析結果可知AcSBV-Viet2, 3、AmSBV-Viet4在親緣關係上與AmSBV-UK、AmSBV-Kor21、AmSBV-Kor19相近；AcSBV-Viet8跟AcSBV-India相近；AcSBV-Viet7跟AcSBV-Kor相近；AcSBV-Viet SBM2跟AmSBV-Viet6相近，AcSBV-Viet1、AcSBV-Viet5及AcSBV-Viet9則跟AcSBV-China相近。比較越南各地區東方蜂與西洋蜂體內之SBVs基因組分析的遺傳變異，發現感染東方蜂的AcSBV-VN與感染西洋蜂的AmSBV-VN的基因組非常相似，相較於AmSBV，VN-SBVs與AcSBV在親緣關係上更接近。

由上述的證據顯示，目前研究正導向AcSBV跨物種傳遞或感染之現象之可能性；AcSBV普遍發生於亞洲大陸，經由亞洲不同國家的AcSBV分子演化分析，可推測 AcSBV之基因體變異及多樣性與其寄主特异性(東方蜂或西洋蜂)、地理區域多樣性和病毒交叉感染有長期的演化關係(Li et al., 2016; Reddy et al., 2017)。

台灣東方蜂囊狀幼蟲病之爆發

原生種東方蜂是台灣的農作物中極為重要的授粉昆蟲，當蜜蜂消失時會造成森林、農作物等的授粉不良(mal-pollination)，嚴重時可能引起物種消失、產業失衡甚至糧食危機等問題，而台灣早期並無囊狀幼蟲病正式紀錄，但在 2015 年首次在東方蜂上完整記錄到此病毒，且台灣 AcSBV 分離株的親緣關係與中國分離株最為相似 (Huang et al., 2017)。根據我們先前的監測結果，在 2015 年首次發現 AcSBV 後，此病毒於 2016 年在台灣東方蜂族群迅速蔓延，造成大量蜂群死亡，疫情在北部及東部地區更嚴重，這些數據顯示台灣已成為 AcSBV 高風險區，此病毒儼然對台灣東方蜂族群造成嚴重衝擊(Nai et al., 2018)。因此為更了解此病毒未來流行病學走向，以及找到減緩 AcSBV 對於台灣東方蜂造成的高死亡率導致蜂群崩解問題。本研究團隊進行(1)AcSBV 全台監測並統計流行率，持續監測台灣地區 AcSBV 於東方蜂及西洋蜂族群帶原狀況，目的在於有效掌握疫情資訊並進一步釐清野外 AcSBV 在東方蜂與西洋蜂交互帶原之關係；(2)比對東方蜂與西洋蜂之 SBV 親緣關係以判斷兩者間是否存在交叉感染或帶原的可能性；(3)AcSBV 人工感染西洋蜂幼蟲進一步探討 AcSBV 台灣分離株是否對西洋蜂造成影響；(4)田間守衛西洋蜂試驗，在有疫情之東方蜂場放置西洋蜂，並監測 AcSBV 之帶原情況，評估守衛西洋蜂之可行性。期望本研究可為後續東方蜂囊狀幼蟲病之防治等相關議題提供資訊，以有建立病毒發生預測系統，讓蜂農進行前置規畫管理。此外也希望藉由本研究能開啟蜜蜂疾病治療的新契機。以下分別闡述我們的研究成果與發現。

2016 年台灣囊狀幼蟲病毒監測及演化分析

據資料顯示，2015 年以前在台灣並未檢測到關於 SBV 的陽性樣本；於 2015 年中，本地蜂農開始反映台灣地區東方蜜蜂發生疑似囊狀幼蟲病案例，2015 年之後獲得樣本分析後發現結果呈陽性。2016 年中通報案例逐漸增多。比對分離株的親緣關係發現與中國、越南、韓國的 AcSBV 分離株最為相似(Huang et al., 2017)，推測在一開始時，被 AcSBV 所感染的蜜蜂大多為野生東方蜂蜂群，所以在 2015 年前在台灣沒有人發現也沒有引起在地養蜂業者關注；然在 2016 年的報告中發現 AcSBV 正在台灣中部流行，且直至 2016 年底 AcSBV 感染情況嚴重已迅速蔓延全台(Huang et al., 2017; Nai et al., 2018)。目前該病在台灣已確定全面擴散，由於死亡率過高造成許多地方的蜂群崩潰。全台東方蜂養殖戶超過 9 成已

經滅場，使得台灣養蜂業損失重大。由 2016 年的 9 月份開始進行監測至 12 月。監測範圍遍及全台東方蜂場、西洋蜂場，及混合飼養蜂場及野外東方蜂群等共計 15 縣市 55 個蜂場(48 個東方蜂場，7 個西洋蜂場)。檢驗方式為逐箱檢視、記錄其蜂群是否出現典型的中囊病病徵並同時進行採樣(挑選 3-5 群，50 隻外勤蜂)進行分子檢測(分子檢測方法流程如圖一所示)。疫情爆發初期(2016 年 9 月份)，全台檢出率為 41.7%(圖二)，而後疫情開始逐月攀升、蔓延至南部的野生蜂群，時至 2016 年 12 月，全台檢出率已達近 7 成(圖二)。疫情爆發初期以南部區域的檢出率最為高，北部區域則尚未受到影響，但直至 12 月，北部地區 AcSBV 總平均帶原率已攀升至 91.3%(圖二)；AcSBV 在西洋蜂場也檢測出 37.5% 之帶原率。

以病毒 VP1 基因進行演化分析結果顯示，大部分台灣 AcSBV 分離株形成一分類群，且親緣關係接近中國 AcSBV 分離株。而在台灣 AcSBV 分離株中，亦存在有一株由台灣南部的西洋蜂群找到之 SBV 離株 (Am, S6-NB20-1)，由此可見 AcSBV 雖然在台灣屬初次嚴重爆發，而病毒之間寄主交互感染現象及基因體交互作用可從演化樹的證據上得知；而依照演化進程，南部或許為 AcSBV 發生的起始點。有鑑於 2016 年之監測結果，本研究在 2017 年繼續以北部地區為主要監測點。AcSBV 對東方蜂幼蟲可造成嚴重中囊病徵，西洋蜂雖可帶原 AcSBV，但不易造成嚴重病徵，因此我們於 2017 年 4 月，透過檢測西洋蜂引入的北部地區特定罹病東方蜂飼養場域是否帶有 AcSBV，評估其做為環境病毒監測指標之依據。

2017 年台灣囊狀幼蟲病毒監測及演化分析

監測時間由 2017 年 1 月至 12 月，逐月於北台灣的基隆(七堵)、台北(陽明山)、新北(石碇、坪林、貓空)、宜蘭(宜蘭大學、大進、三星、福山植物園、五結、太平山)與非北台灣的花蓮(吉安、玉里)、新竹(關西)、南投(清境農場)共計 7 縣市 18 個採集點(包含 10 個私人蜂場，8 個野外採集點)進行採樣及蜂群病毒監測(挑選 3-5 個西洋蜂蜂群進行外勤蜂的採樣，每箱採集 50-100 隻的蜜蜂，進行分子檢測)(圖四)。AcSBV 監測持續至 2017 年 4 月，並於 4 月將西洋蜂引入東方蜂場，共計有 4 個原東方蜂養殖戶配合陸續引進西洋蜂做為哨兵蜂群，地點則分布於基隆的七堵、五堵以及瑪陵，在這些試驗樣點中我們進一步針對 2 個樣點進行東方蜂與西洋蜂 AcSBV 監測並加入分子演化分析。2017 年監測結果顯示，東方蜂群平均感染率高達 76.75%，而西洋蜂群的平均感染率則較低(48.18%)(圖四)。在西洋蜂引入東方蜂場的時間點後，西洋蜂群檢出 100%帶原率。2017 年 5 月後的監測結果發現，基本上，西洋蜂的 AcSBV 帶原率及趨勢與東方蜂雖類似，但兩者 AcSBV 帶原率在時間點上似有交叉的趨勢，例如 4 月引入西洋蜂當月測得 100%帶原而東方蜂之 AcSBV 檢出率則於次月升高(由 4 月 53.33%至 5 月 100%)；8-9 月 AcSBV 在西洋蜂中測得帶原率為 57.78%降至 9 月

21.67%，而東方蜂之 AcSBV 檢出率則於次月降低(由 9 月 91.67%至 10 月 83.33%)；也證實西洋蜂群具有潛力當作環境病毒監測指標。

演化分析方面，2017 年採集北台灣 AcSBV 分離株，並以病毒 VP1 基因進行演化分析。結果仍與 2016 互相符合，顯示台灣 AcSBV 分離株形成一分類群，且親緣關係接近中國 AcSBV 分離株(圖五)；引入西方蜂群後，其亦可檢測出 AcSBV(樣本採集為 6~9 月)，經定序及演化分析結果顯示與 AcSBV 分離株形成一分類群(圖五)。由此我們更可確定病毒在不同寄主間交互感染現象及基因體交互作用現象。

AcSBV 人工感染實驗

為進一步證實 AcSBV 於不同寄主間交互感染現象，本研究團隊進行 AcSBV 人工感染西洋蜂成蜂及幼蟲實驗，測試是否 AcSBV 會對西洋蜂生長發育產生影響。實驗利用田間收集感染 AcSBV 的東方蜂幼蟲，進行病毒初步離心，進行病毒定量(即時定量 PCR 方式)後，再以定量 AcSBV (1.25×10^6 copies/per bee)感染成蜂與幼蟲。結果顯示 AcSBV 之感染並未對西洋蜂成蜂及幼蟲之存活率造成影響(圖六)，且亦對幼蟲羽化率無顯著影響(張等，未發表)。感染 AcSBV 之西洋蜂成蜂及幼蟲樣本經檢測發現 AcSBV 均有複製現象且病毒量隨感染天數增加，此結果顯示 AcSBV 可感染西洋蜂群(圖七)。在本實驗中，控制組在實驗前監測並無帶原病毒，而再經過檢測後則出現病毒之訊號，推測西洋蜂群中可能帶有潛伏感染之 SBV，而其屬於 AcSBV 或 AmSBV 仍需進一步證實。綜觀上述結果，雖然 AcSBV 在西洋蜂群的流行率低，亦不會對西洋蜜蜂的蜂群造成太大的影響，但卻會導致東洋蜜蜂的蜂群大量死亡，然而西洋蜂飼養數量遠高於東方蜂，因此感染 AcSBV 之西洋蜂對東方蜂的影響仍不容忽視。

未來方向

1. 目前台灣已確定為 AcSBV 疫區，因此對於台灣地區 AcSBV 帶原率仍需持續監測。詳細了解西洋蜂及東方蜂的 AcSBV 帶原率趨勢關係將有助於建立預測病毒發生之系統。而西洋蜂具有潛力能成為環境病毒指標，然而在西洋蜂群中之 AcSBV 是否會影響東方蜂，仍需進一步實驗評估，故感染 AcSBV 之西洋蜂對東方蜂的影響仍不容忽視。
2. AcSBV 及 AmSBV 之基因體多樣性隨寄主專一性及各不同地理區域而演化。因此未來本研究團隊將針對個不同地區東方蜂及西洋蜂之 SBV 進行解序工作，以釐清此二病毒在台灣地區之親緣關係。此數據完成將更有助於精確地檢測兩病毒在兩中寄主上之帶原關係。
3. 對台灣囊狀幼蟲病方案因應措施：對於蜜蜂病毒性疾病的處理方案，提供下

列幾點供參考，也希望在大會上與會人員能踴躍討論。

- 加強蜂群管理
- 抗病育種
- 有益食料添加:益生菌，或其他天然資材等
- 基因體學方式:雙股 RNA 抑制病毒複製、其他病毒抑制劑

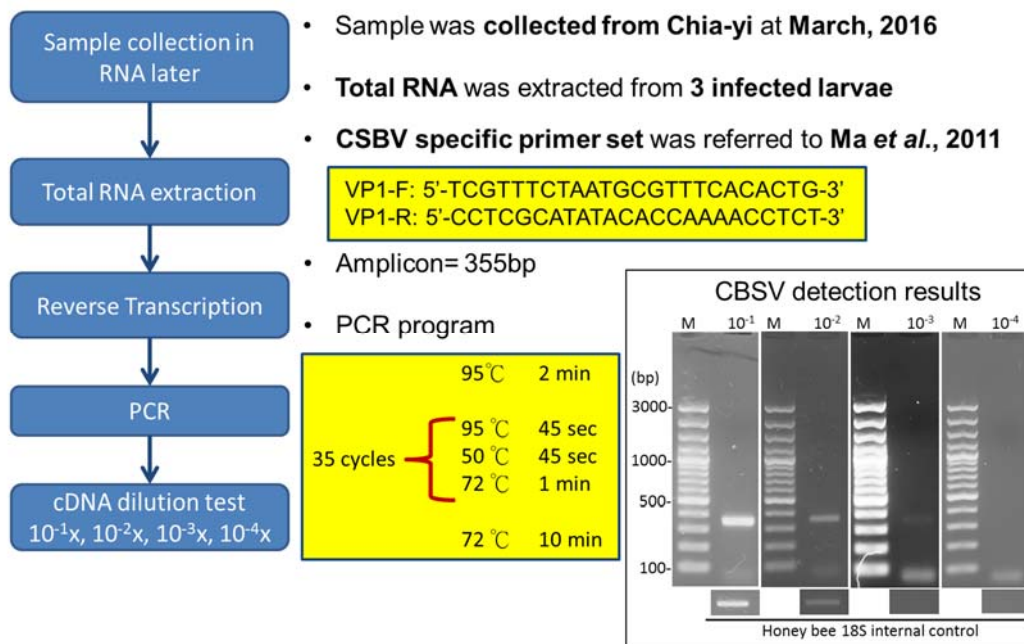
在蜜蜂抗病機制上，本人研究主軸為昆蟲病原病理，在文末，以微生物為出發點提出蜜蜂可能之抗病機制，即昆蟲內共生菌，沃爾巴克氏體(Wolbachia)。Wolbachia 是一種常存在於昆蟲(至少 20%昆蟲種類)的內共生菌，此菌必須在細胞中生長，因此無法培養，因此昆蟲之懷菌體必須依靠垂直或水平傳播至下一代(Jeyaprakash and Hoy, 2000; O'Neill et al., 1997)。關於此菌研究最完整的物種為果蠅，其中 Hedges 等人於 2008 年發現有 Wolbachia 之果蠅，對於幾種 RNA 病毒(如 Drosophila C virus, DCV)具抗性(Hedges et al., 2008)。而進一步搜尋也不難發現，目前已有報告描述 Wolbachia 在不同的膜翅目昆蟲之紀錄，主要以螞蟻居多(Cook and Butcher, 1999; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Shoemaker et al., 2000; Wenseleers et al., 1998)。而在西洋蜂方面，Hoy 等人於 2003 年利用分子檢測方式(Long PCR)在西洋蜂檢測出 Wolbachia (Hoy et al., 2003)；其後在 2011 年也分別在西洋蜂及東方蜂上發現 Wolbachia (Pattabhiramaiah et al., 2011a; Pattabhiramaiah et al., 2011b)。雖然如此，Wolbachia 在西洋蜂群的帶原率並非想像普遍，這或許可對野外罹病蜂群自然選汰現象提供一個解釋，在野外昆蟲中存在之 Wolbachia 使寄主對病毒感染有抵抗作用進而演化生存(Hedges et al., 2008; Yan~ez et al., 2016)。本文所探討之 AcSBV 亦為 RNA 病毒，因此 Wolbachia 是否存在於台灣西洋蜂與東方蜂族群內？其是否具抗病毒之現象是一個有趣且值得探討的研究方向。

參考文獻

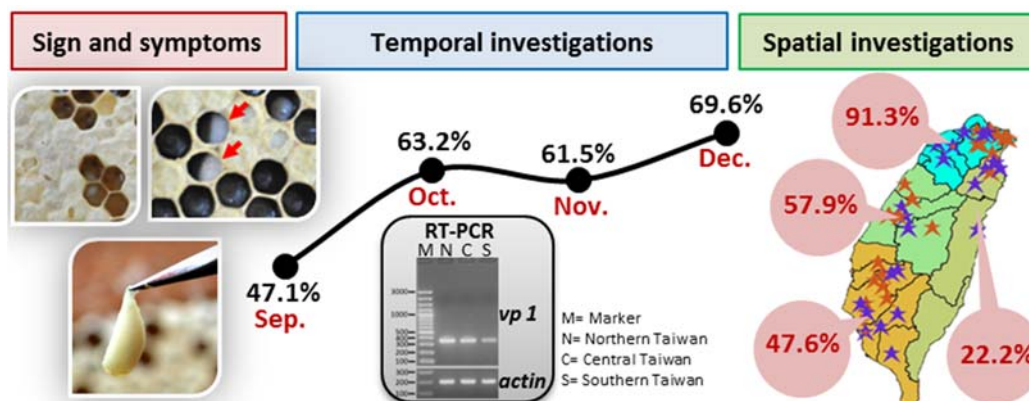
- Anderson, D. L., 1995. Viruses of *Apis cerana* and *Apis mellifera* Enviroquest, Cambridge, Ontario, Canada.
- Antunez, K., et al., 2006. Honeybee viruses in Uruguay. J Invertebr Pathol. 93, 67-70.
- Bailey, L., 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. Ann Appl Biol. 63, 483-91.
- Bailey, L., et al., 1964. Sacbrood Virus of the Larval Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus). Virology. 23, 425-9.
- Baker, A. C., Schroeder, D. C., 2008. The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations. Virol J. 5, 10.
- Blanchard, P., et al., 2014. Development and validation of a real-time two-step RT-

- qPCR TaqMan((R)) assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J Virol Methods*. 197, 7-13.
- Chen, Y. P., et al., 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol*. 72, 606-11.
- Chen, Y. P., Siede, R., 2007. Honey bee viruses. *Adv Virus Res*. 70, 33-80.
- Choe, S. E., et al., 2012. Analysis of the complete genome sequence of two Korean sacbrood viruses in the Honey bee, *Apis mellifera*. *Virology*. 432, 155-61.
- Choi, Y. S., et al., 2010. Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *J. Apicult.* . 25, 187-191.
- Cook, J. M., Butcher, R. J. D., 1999. The transmission and effects of Wolbachia bacteria in parasitoids. *Res. Popul. Ecol*. 41, 15-28.
- Dall, D. J., 1985. Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Ann Appl Biol*. 106, 461-468.
- Dong, C., et al., 1984. Experiments of serum and cross infection between *Apis cerana* sacbrood virus and *Apis meliifera* sacbrood virus. *Apicult China*. 3, 8-9.
- Freiberg, M., et al., 2012. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genet Mol Res*. 11, 3310-4.
- Gong, H. R., et al., 2016. Evidence of *Apis cerana* Sacbrood virus Infection in *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol*. 82, 2256-62.
- Hedges, L. M., et al., 2008. Wolbachia and virus protection in insects. *Science*. 322, 702.
- Hoy, M. A., et al., 2003. Wolbachia is present in *Apis mellifera capensis*, *A. m. scutellata*, and their hybrid in Southern Africa. *Apidologie*. 34, 53-60.
- Huang, W. F., et al., 2017. Phylogenetic analysis and survey of *Apis cerana* strain of Sacbrood virus (AcSBV) in Taiwan suggests a recent introduction. *J Invertebr Pathol*. 146, 36-40.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., 2000. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*. 9, 393-405.
- Kim, H. K., et al., 2008. Detection of sacbrood virus (SBV) from the honeybee in Korea. *Korean J Apic*. 23, 103-109.
- Li, Y., et al., 2016. Phylogenetic analysis of the honey bee sacbrood virus. *J. APIC. SCI*. 60, 31-38.
- Nai, Y. S., et al., 2018. The seasonal detection of AcSBV (*Apis cerana* sacbrood virus) prevalence in Taiwan. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 21, 417-422.
- Nielsen, S., et al., 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood

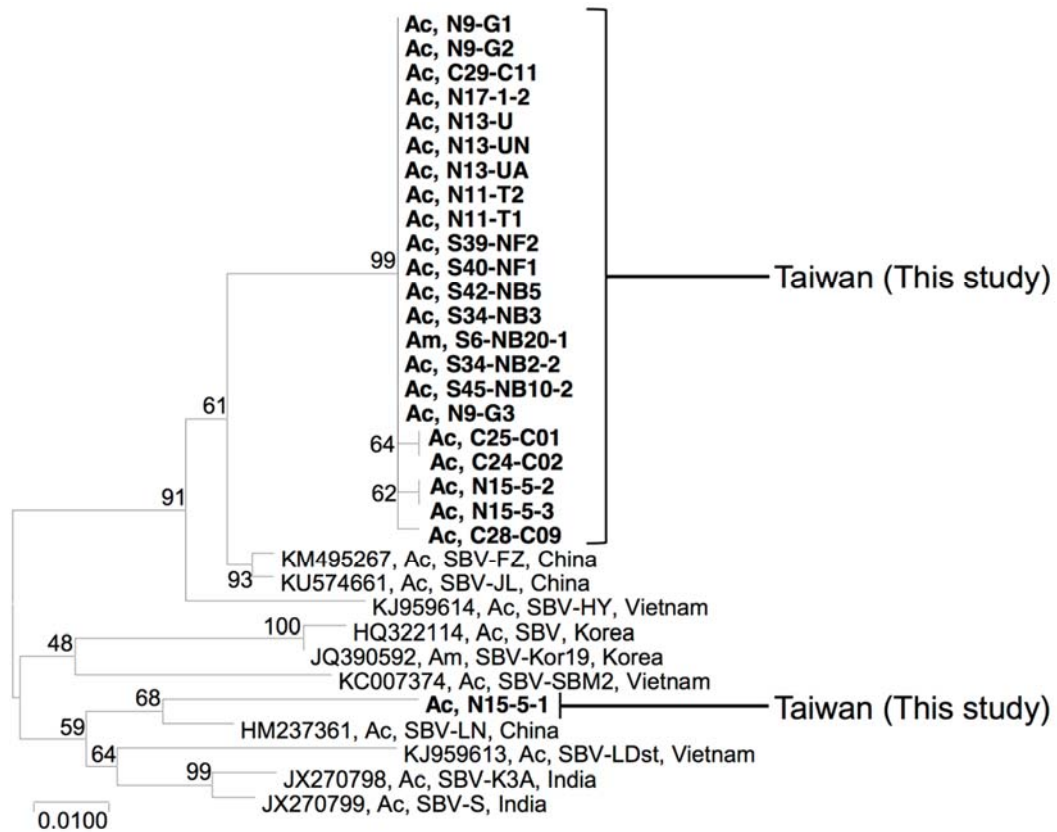
- virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*. 39, 310-314.
- O'Neill, S. L., et al., 1997. *In vitro* cultivation of Wolbachia pipientis in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol*. 6, 33-9.
- Pattabhiramaiah, M., et al., 2011a. Prevalence of Wolbachia in the European Honeybee, *Apis mellifera carnica*. *World Applied Sciences Journal*. 15, 1503-1506.
- Pattabhiramaiah, M., et al., 2011b. Wolbachia Endosymbiont in the Workers of European Honeybee, *Apis mellifera carnica*. *Electronic Journal of Biology*. 7, 81-85.
- Rana, B., et al., 1986. Thai sacbrood virus of honeybees (*Apis cerana indica* F) in north-west Himalayas. *Indian J Virol*. 2, 127-131.
- Reddy, K. E., et al., 2017. Comparative Genomic Analysis for Genetic Variation in Sacbrood Virus of *Apis cerana* and *Apis mellifera* Honeybees From Different Regions of Vietnam. *J Insect Sci*. 17.
- Reddy, K. E., et al., 2016. Homology differences between complete Sacbrood virus genomes from infected *Apis mellifera* and *Apis cerana* honeybees in Korea. *Virus Genes*. 52, 281-9.
- Roberts, J. M., Anderson, D. L., 2014. A novel strain of sacbrood virus of interest to world apiculture. *J Invertebr Pathol*. 118, 71-4.
- Shoemaker, D. D., et al., 2000. Wolbachia infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Mol Biol*. 9, 661-73.
- Tentcheva, D., et al., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and Varroa destructor mite populations in France. *Appl Environ Microbiol*. 70, 7185-91.
- Verma, L. R., et al., 1990. Observations on *Apis cerana* colonies surviving from Thai Sacbrood Virus infestation. *Apidologie*. 21, 169-174.
- Wenseleers, T., et al., 1998. Widespread occurrence of the micro-organism Wolbachia in ants. *Proc Biol Sci*. 265, 1447-52.
- White, G. F., 1917. Sacbrood. *US Dept Agric Bull*. 431, 1-55.
- Yan~ez, O., et al., 2016. Endosymbiotic bacteria in honey bees: *Arsenophonus* spp. are not transmitted transovarially. *FEMS Microbiology Letters*. 363, 1-7.
- Zhang, G., Han, R., 2008. Advances on sacbrood of honeybees. *China J Biol Control*. 24, 130-137.
- Zhang, J., et al., 2001. Three-dimensional structure of the Chinese Sacbrood bee virus. *Sci China C Life Sci*. 44, 443-8.



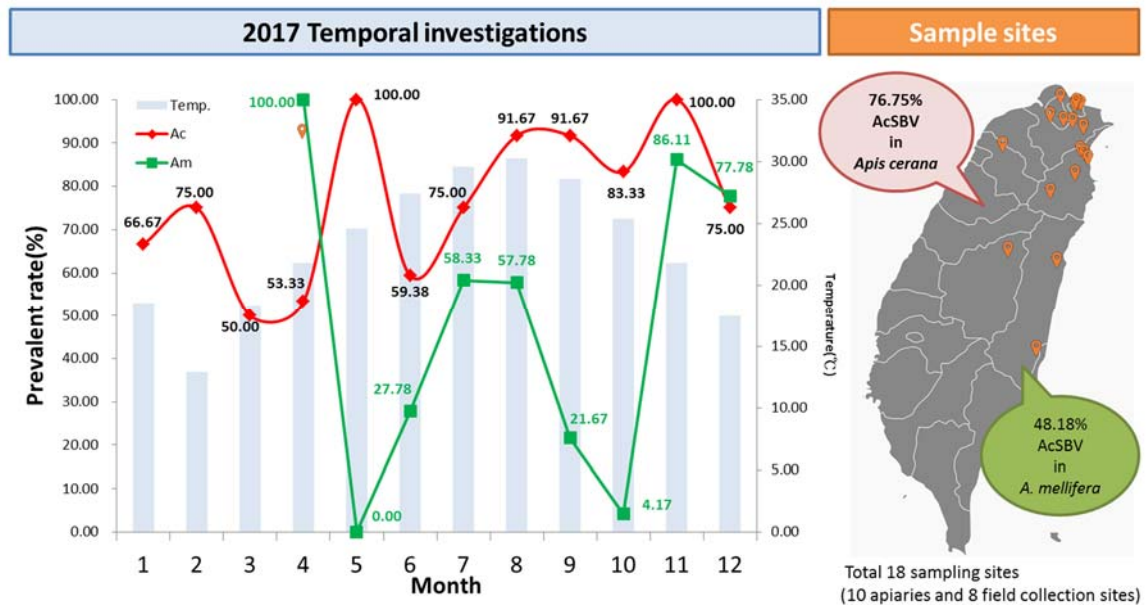
圖一、AcSBV 之分子檢驗技術流程。



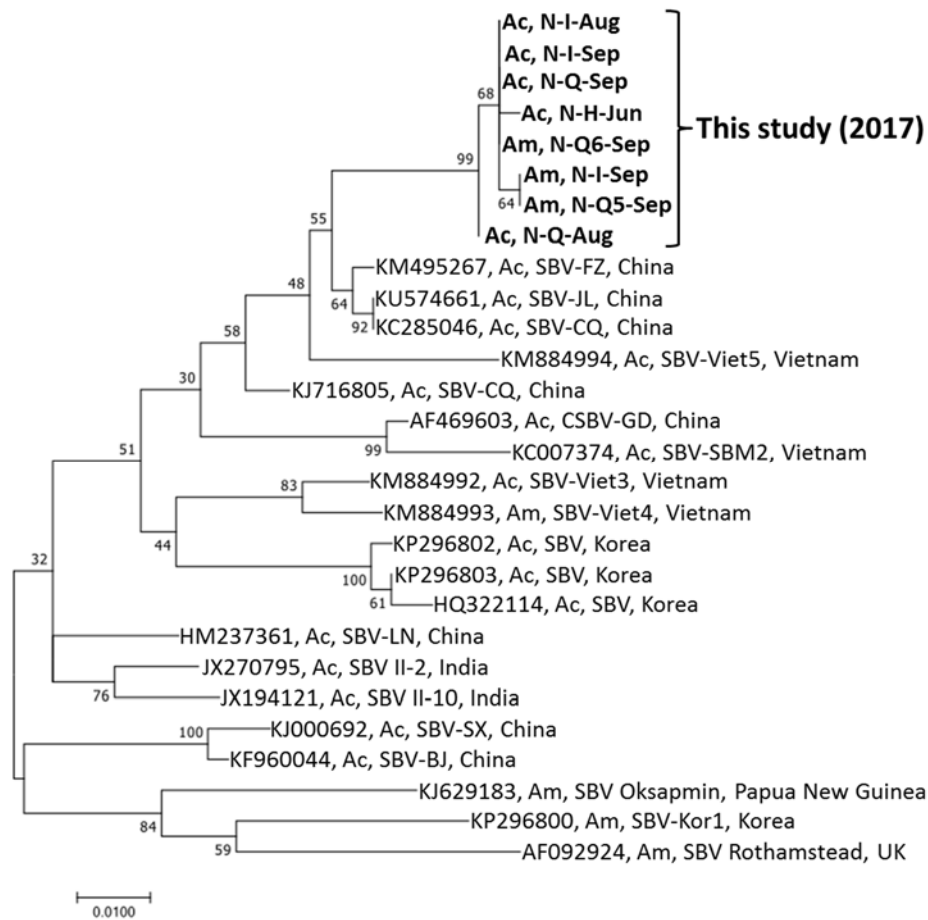
圖二、2016 年 9 月至 12 月全台 AcSBV 之田間普查與分子檢測之結果顯示 AcSBV 已蔓延全台東方蜂族群，其中北台灣疫情最為嚴重。此外，AcSBV 之帶原，亦隨時間上升，由 47.1% 帶原率增至 69.6%。



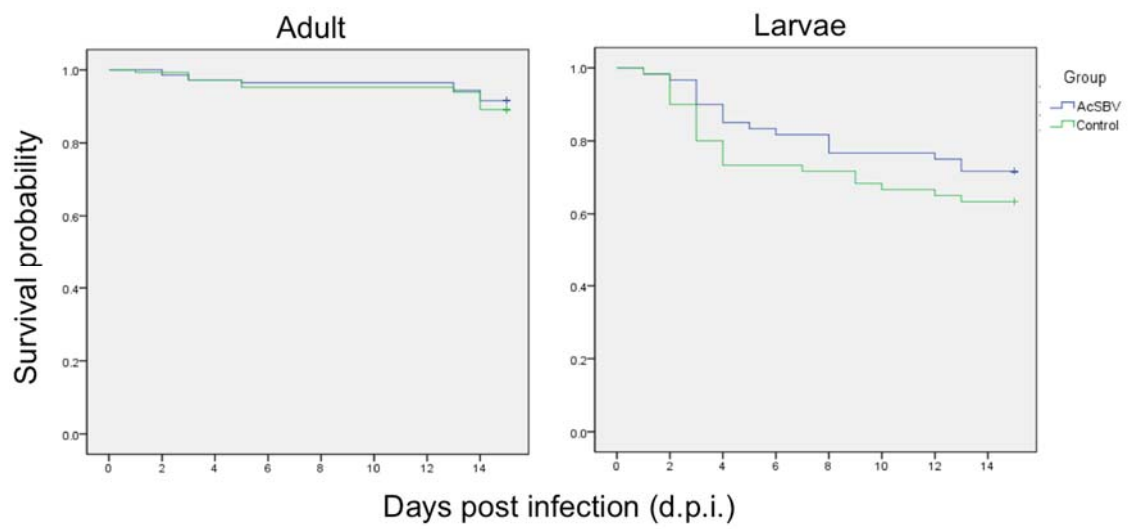
圖三、2016 年採集台灣 AcSBV 分離株，以病毒 vp1 基因建構之親源演化樹。大部分台灣 AcSBV 分離株形成一分類群，且親緣關係接近中國 AcSBV 分離株。



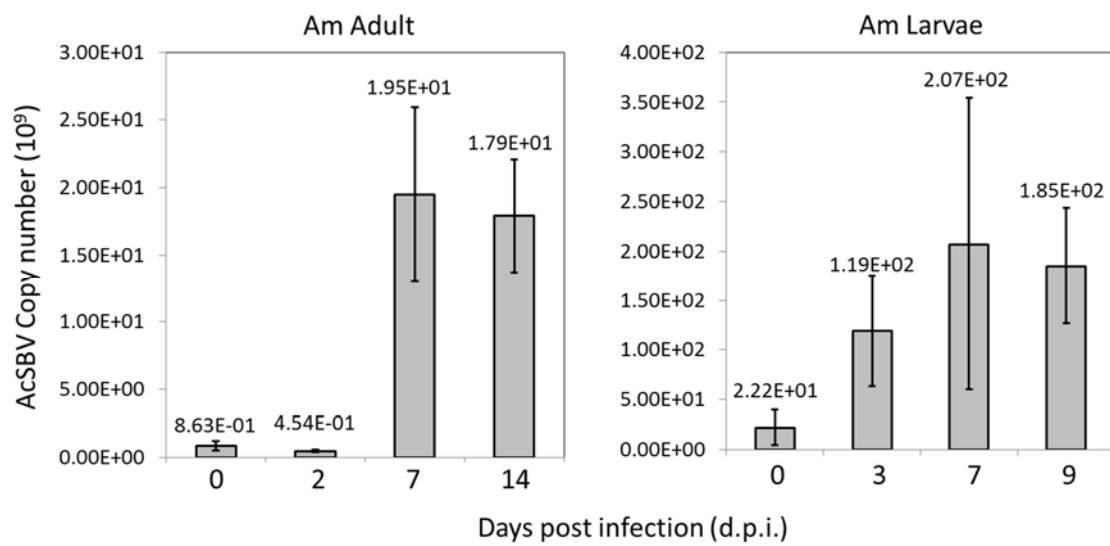
圖四、2017 年全台 AcSBV 之田間採樣地點分佈及分子檢測之結果。AcSBV 之帶原趨勢隨時間上升且與氣溫呈顯著相關；部分西洋蜂體內亦檢測出 AcSBV 之帶原。紅色線=AcSBV 在東方蜂族群帶原率；綠色線=AcSBV 在西洋蜂族群帶原率；藍色柱狀圖= 氣溫紀錄。



圖五、2017 年採集北台灣 AcSBV 分離株，以病毒 vp1 基因建構之親源演化樹。台灣 AcSBV 分離株形成一分類群，且親緣關係接近中國 AcSBV 分離株，引入西方蜂群後，其亦可檢測出 AcSBV (樣本採集為 6~9 月)，經定序及演化分析結果顯示與 AcSBV 分離株形成一分類群。



圖六、以台灣AcSBV分離株感染西洋蜂對其成蜂（圖左）及幼蟲（圖右）存活率之影響。



圖七、AcSBV分離株感染西洋蜂在成蜂（圖左）及幼蟲（圖右）體內病毒複製絕對定量。

臺灣地區蜜蜂急性中毒樣態分析

吳姿嫻^{1*}、徐培修¹、陳香君²、黃玉如³、楊小瑩³、鄭鈞元⁴

¹ 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

² 國立臺灣大學生命科學系

³ 行政院農業委員會茶業改良場

⁴ 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

*通訊作者：吳姿嫻

電子郵件：thwu@mdais.gov.tw

通訊地址：苗栗縣公館鄉館南村 261 號

摘要

本研究於 2016 年至 2017 年間調查臺灣地區蜜蜂急性中毒案件，檢驗中毒死蜂及巢內花粉農藥殘留情形並鑑定巢內花粉種類，另調查中毒蜂場周遭作物。分析調查結果發現蜜蜂中毒蜂場鄰近作物以荔枝、龍眼、水稻、檳榔、玉米及瓜類風險較高，而中毒樣本最常檢出的農藥為福化利，出現機率高達 90%，其次為陶斯松檢出率 65%，再其次為芬普尼檢出率 60%。死亡蜜蜂檢出農藥超過 1/10 SRD 劑量，確認造成蜜蜂中毒最常發生的農藥為芬普尼，其次為福化利，再其次為陶斯松、加保利及第滅寧。因 2016 年起芬普尼水懸劑已禁止使用，但在荔枝花期及檳榔花期多個樣本檢出芬普尼造成蜜蜂急性中毒，顯示田間仍有芬普尼水懸劑違規使用，應清查市面上違規使用情形。另檢出中毒單一樣本最高含 18 種藥劑，多種藥劑殘留或高量殘留，表示有關單位仍應加強教育農民用藥知識。為降低蜜蜂農藥急性中毒風險，農藥管理權責機關防檢局於 2017 年 9 月以法規加以禁止對蜜蜂毒性極高之 4.95% 芬普尼水懸劑輸入、加工製造、販售及使用，另限制新尼古丁類農藥益達胺、賽速安及可尼丁用於防治荔枝與龍眼害蟲兩年，並加強農藥管理人員及農民對農藥施用與農藥對蜜蜂影響相關之訓練，以減緩蜜蜂發生急性中毒情形。

關鍵字：蜜蜂、農藥中毒、農藥管理、類尼古丁、殺蟲劑

前言

臺灣位處熱帶與亞熱帶氣候環境，四季多溫暖潮濕，農作物容易遭病蟲害危害，農民在栽培管理上多施用化學藥劑以達到作物保護的目的，然施用化學藥劑的過程，亦可能會影響其他非防治目標的生物，因此農藥上市之前，需測試農藥對生物之毒性與環境安全之評估。近年來因氣候變遷影響，作物病蟲害防治日益困難，許多新型藥劑逐漸開發上市，這些藥劑除要達到滅除有害生物之目的，又要兼具對環境殘毒量低等特性，較能受到植物保護藥劑市場上之青睞。過去多站在人類的角度，以藥劑對哺乳類動物之毒性作為農藥毒性之判定方式，但生態地位之其他生物，在自然生態循環上亦扮演著相同重要的角色，因此現在的農藥安全性評估，除了以哺乳類之接觸及口服等毒性判定，亦增加對水生動物及蜜蜂等授粉昆蟲判定之方式。這些安全性評估就是要提醒使用者，農藥的施用除了要滅除或預防人類不喜看到的有害生物外，可能會誤傷其他環境中其他生物體。蜜蜂就是其中一類常受害的對象，而蜜蜂對在農業生態系中，卻扮演著為作物授粉的重要角色。

臺灣地區因地狹人稠，土地開發程度高，耕地面積多破碎且作物相單一，養蜂產業多需逐花而居，並仰賴較大面積之農作物開花，以收穫蜂蜜、花粉及生產蜂王漿，但蜂農對以經濟作物作為蜜蜂之蜜粉源，其實又愛又恨，愛其因作物單一且面積大，能計畫性生產特定種類蜂產品，但又恨其常以化學藥劑防治病蟲害而誤傷蜜蜂。兩者權宜拿捏困難，蜜蜂不會自行閃躲藥劑，多是發現蜜蜂大量死亡，蜂勢衰退後，才知蜜蜂農藥中毒，此時移蜂躲避大多為時已晚，因此蜂農非常需要能事前得知農作物用藥時機，在蜜粉源受藥劑污染前，能即時將蜜蜂遷移至安全的地方。另困擾蜂農的還有因蜜蜂採集範圍大，若發生中毒，無法確定是因為何種作物導致中毒，只能消極地移場，但放蜂場所尋覓不易，若能清楚知道何種作物或何種農藥風險較高，就能精確閃避。因此透過蜜蜂急性中毒案件調查，以釐清造成蜜蜂急性中毒之高風險農藥及作物，除了可以提供蜂農放蜂選擇參考，也才能即時提供農藥管理政策上的修正。

蜜蜂急性農藥中毒症狀及處理

正常平箱飼養管理下的蜂群，每日自然死亡個體數不易超過 100 隻，若蜂箱口發現較多死蜂，數量超過 200 隻，該蜂群可判定發生不正常死亡，若非病蟲害引起，就該懷疑是否發生蜜蜂急性農藥中毒。蜜蜂發生急性農藥中毒，初期可發現蜂箱口出現大量死蜂，外勤蜂逐漸減少，巢門口會有部分蜜蜂跳動、打轉、顫抖、爬行、翅脫垂等情形(Vijaykumar and Shivshankar, 2018)，中毒情形嚴重甚至會發現大量蜂群死於箱內，中毒中後期箱內因蜜蜂護脾能力變差幼蟲陸續死亡，開始產生腐臭味，此時若不即時處理，蜂群會迅速滅群。中毒發生之嚴重程度，

可先從蜂群死亡數量做初步判定，正常平箱 6-8 框蜂量，若蜂箱門口死蜂在 200-400 隻可判定為輕度中毒，500-900 隻為中度中毒，若死亡超過 1000 隻則屬高度中毒（高及曾，1994），一般而言輕度中毒，只要加強餵食，蜂群多可迅速恢復，中度中毒則需要採取較積極管理措施，如關閉巢門口，防止蜜蜂持續出勤，更換蜜粉脾，給予乾淨的食物及水，甚至可移場，並檢視蜂王健康狀態，必要時換王，給予蜂群恢復時間。但蜂群若不幸發生高度中毒情形，通常內勤蜂亦受損，蜂群群勢恢復不易，通常除了前述之管理措施外，通常還得靠併群來恢復蜂勢，且需要將受損蜂箱進行清潔及消毒，以去除農藥及為微生物污染。

蜜蜂中毒通報與採樣調查

為釐清蜜蜂急性中毒原因，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局於 2015 年起組成蜜蜂中毒事件調查小組，由苗栗區農業改良場作為通報窗口，協助進行蜜蜂中毒事件現場調查與採樣，並由茶業改良場協助進行農藥殘留分析，國立臺灣大學生命科學系協助進行花粉種類鑑定，透過採樣分析，探討造成蜜蜂急性中毒主要的作物類別及農藥品項，相關的調查結果，除了可以讓蜂農清楚判斷造成蜜蜂中毒的農藥種類與可能造成中毒之植物，作為未來安全放蜂地點選擇的參考。更重要的是透過死亡蜂體殘留之農藥，可得知國內作物用藥之習慣與風險，提供防檢局農藥管理政策擬定之科學證據。

蜜蜂中毒通報與調查之標準流程是蜂農發現蜜蜂出現中毒時，可以電話、郵件或簡訊通報苗栗區農業改良場，苗栗場會派員至發生蜂場取樣並進行周遭作物之調查，取樣原則是採蜂箱前死亡蜜蜂體約 200 克，並檢視中毒蜂箱蜂勢損失與內勤蜂狀態，並盡量挖取花粉脾中新存放之花粉 20 克，或將花粉脾脫蜂後整脾帶回實驗室挖取花粉，取樣之死亡蜜蜂及花粉封妥標示採樣時間地點等資訊 (Brown *et al.*, 1996)。另對蜂農管理操作進行訪查，了解蜂箱移動、防治、蜜粉源及周遭作物等相關資訊，填報「蜜蜂中毒調查紀錄表」並將資料建檔。採樣之死亡蜜蜂與花粉樣品取回實驗室後立即置於 50°C 烘箱烘烤至完全乾燥，另以乾淨夾鍊袋及離心管封存寄送至茶業改良場進行農藥殘留檢驗。另將取部分乾燥花粉樣品寄送國立臺灣大學生命科學系進行花粉種類鑑定。所有檢測結果出爐，會將數據及花粉鑑定結果傳送回苗栗場，苗栗場再依現場蜜蜂病蟲害診斷及樣品農藥殘留量綜合判斷蜜蜂大量死亡之原因，並以農藥對蜜蜂之半致死濃度 (LD₅₀) (Stoner and Eitzer, 2016) 為其 Suggested Reference Dose (SRD)，若計算每隻蜜蜂農藥殘留劑量高於 SRD 之 1/10，則判定為急性農藥中毒死亡，若劑量未達，可能為農藥慢性中毒或複合感染蜜蜂病蟲害等，則視其他病蟲害檢測報告一併判讀。最終將判定結果及數據回覆蜂農及防檢局，讓蜂農清楚知道蜜蜂死亡的原因，以作相關處理及未來預防。

蜜蜂中毒高風險作物及案件分析

從 2015 年起成立調查小組，經過多次調查經驗與修正，2016 年起建立較完整的調查標準流程及判定方式，2016 至 2017 年間，總共通報蜜蜂不明原因死亡件數共 39 件，採樣樣本數 40 件，判定為急性中毒案件為 32 件，疑似人為毒殺為 3 件，複合罹染病蟲害共 12 件。單一樣本檢出農藥種類數最多達 18 種，平均為 5 種，檢出農藥出現次數最多為用於防治蜂蟹蟎之福化利，出現機率高達 90%，其次為陶斯松檢出率 65%，再其次為芬普尼 60%（圖一）。而檢出濃度超出 1/10 SRD 造成蜜蜂中毒最常發生的農藥為芬普尼，其次為福化利，再其次為陶斯松、加保利及第滅寧（表一）。從發生蜜蜂急性中毒的調查資料顯示，最常發生蜜蜂急性中毒的作物有水稻、玉米、荔枝、龍眼、檳榔、瓜類等。從最常造成蜜蜂中毒之芬普尼藥劑而言，調查結果檢出芬普尼案件之主要開花作物以荔枝與檳榔最多，芬普尼依 IRAC 作用機制分類為 2B，屬苯吡唑類氯離子通道拮抗劑的殺蟲劑，對蜜蜂具有高毒性(Li *et al.*, 2010)。

每年荔枝花期是蜂農難以抉擇的時刻，近年來荔枝鮮果價格高，果農為了生產高價荔枝，多於花期積極管理，包含疏花、防治荔枝椿象、荔枝細蛾及膠蟲等，難免需要噴施殺蟲劑，因此入場採收荔枝蜜的蜜蜂，常常因而嚴重折損，甚至會影響後續採收龍眼蜜的蜂勢，使許多蜂農因此卻步，然放棄採收流蜜量高之荔枝花蜜，在天然蜂蜜價格高昂的時代，的確大幅減少收入。調查發現，2017 年荔枝花期，高雄大樹地區發生多起蜜蜂中毒事件，經檢驗死蜂樣品中竟有多達 13 種農藥，內有 7 種殺蟲劑，可見農民用藥習慣及觀念錯誤，是荔枝花期導致蜜蜂受損的主因。且近年來荔枝椿象大量發生，農民為了遏止荔枝小果期遭到吸食危害導致落果，在花期見到越冬後的荔枝椿象雌成蟲開始產卵便希望以藥劑壓抑害蟲族群，而誤傷蜜蜂，從死亡蜜蜂體上驗出高濃度納乃得及芬普尼，可推測應為違規使用非推薦用於荔枝作物上之藥劑。

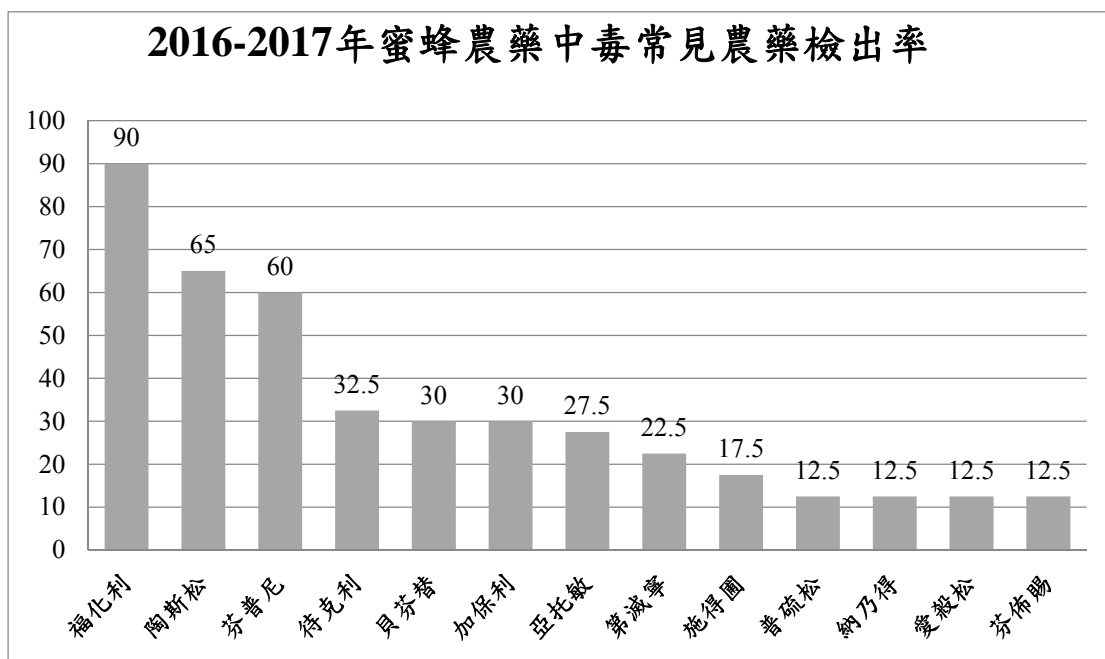
而以施用會污染花朵之芬普尼 4.95%水懸劑自 2016 年 1 月 1 日起已擴大規模禁用，僅剩 250G/L 種子處理用水懸劑（限稻種催芽時使用，未於市面販售）、0.3%粒劑（水稻及玉米害蟲或線蟲防治用）及 0.0143%粒劑（紅火蟻防治用），但多筆案件檢出芬普尼表示市面上仍有違規使用芬普尼水懸劑作為作物防治用藥之情形。以 2017 年 8 月底南投埔里地區發生大規模蜜蜂急性中毒情形分析，死亡蜜蜂及巢內花粉檢出高劑量芬普尼藥劑殘留，進一步鑑定巢內花粉種類，結果顯示巢內花粉多為檳榔及菊科（應為大花咸豐草）花粉，證明應為檳榔違規使用芬普尼藥劑導致。

農藥管理措施與未來展望

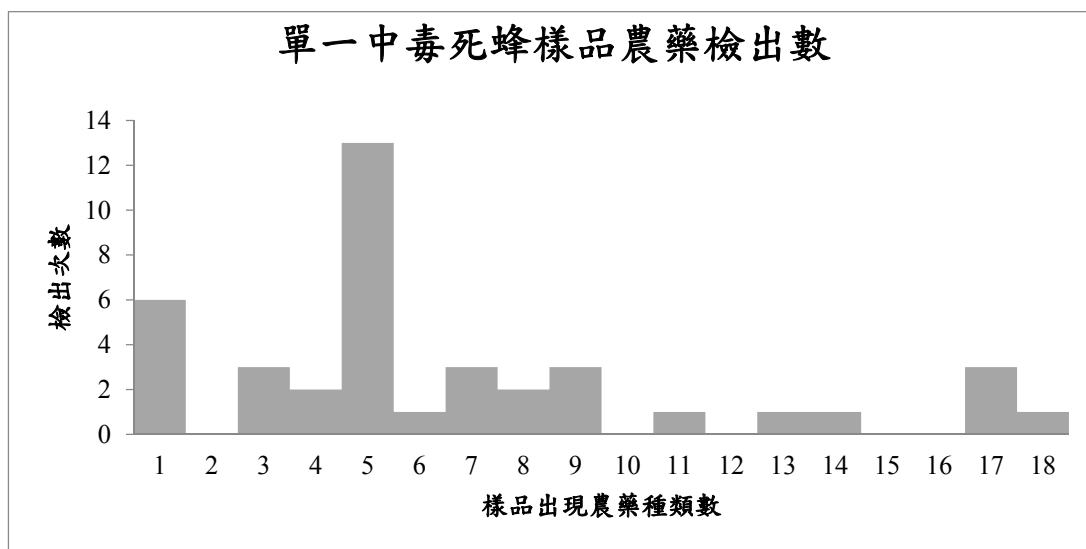
因 2017 年蜜蜂急性中毒事件頻傳，加上全球對蜜蜂健康之關注，防止蜜蜂中毒發生也為農政單位當務之急，經由連續 3 年的調查，透過通報採樣，雖無法偵查新尼古丁類農藥是否導致蜜蜂慢性中毒，但從研究調查結果，顯示芬普尼是臺灣地區主要造成蜜蜂急性中毒的元兇。雖 2016 年起禁止芬普尼水懸劑之使用，但未限制其輸入、加工製造，以致違法販售與使用頻傳，並可由雞蛋檢出芬普尼殘留事件，凸顯出芬普尼藥物遭到濫用情形，加速了防檢局於 2017 年 9 月 6 日公告 4.95% 芬普尼水懸劑為禁用農藥的時程，全面禁止該劑型芬普尼之輸入、加工製造、販售及使用。

至於蜂農關切國內益達胺藥劑使用可能影響蜜蜂健康之問題，在本調查資料中無法提供相關佐證資料，因本調查皆屬急性中毒之通報，所有樣品皆未檢出益達胺、賽速胺、可尼丁等新尼古丁類藥劑，但是否因藥劑濃度低於本團隊檢驗極限，或是因蜜蜂發生慢性中毒無法歸巢，則非本調查方法可證實。國內蜜蜂是否受新尼古丁類藥劑影響，需改由其他調查進行。防檢局原於 2017 年 1 月 1 日開放延伸使用新尼古丁類農藥於荔枝及龍眼樹防治荔枝椿象，但為了解除蜂農對新尼古丁類藥劑之疑慮，於同年 8 月 23 日又改公告限制新尼古丁藥劑用於荔枝樹及龍眼樹防治使用，並仿效歐盟給予 2 年觀察期，2 年後再討論此策略是否能改善蜜蜂中毒情形。

但農藥藥劑使用就如同一把雙利刃，使用得當，可有效控制害蟲族群，並減少藥劑使用，但若操作觀念錯誤，則效果事倍功半。如荔枝椿象的防治若未能於初春雌成蟲產卵前密度低時加以控制，待害蟲大量發生後得靠更多的防治藥劑壓制，反而容易造成對其他生物的毒害。就如同本調查亦顯示，部分中毒蜂群，檢出高劑量之福化利，這表示蜂農在進行蜂蟹蝽防治時，因用藥觀念錯誤，不僅防治效果不彰，反造成對蜜蜂的毒害。因此加強農民與蜂農安全用藥訓練，給予正確且精準用藥觀念，比一味禁止藥劑使用更顯得重要。未來除農藥管理策略上限制對蜜蜂高毒性藥劑之使用，並給予農民安全用藥概念，強調蜜蜂健康與作物授粉之重要，多管齊下望能改善目前農民大量依賴農藥進行病蟲害控制之情形，並提供蜜蜂與其他環境生物更好的生存環境。



圖一、2016-2017 年蜜蜂中毒通報案件農藥檢出率。



圖二、2016-2017 年蜜蜂中毒通報案件單一樣品出現農藥總數。

表一、2016-2017 年蜜蜂農藥中毒通報案件死亡蜜蜂檢出農藥次數與平均殘留量

農藥名稱	種類	1/10 SRD (µg/bee)	LD ₅₀ or LC ₅₀ SRD (µg/bee)	檢出次數	檢出超過 1/10 SRD 次數	死蜂檢出殘留量範圍(µg/bee)		
						最小值	最大值	平均值
福化利	殺蟲劑 殺蟎劑	16.3	163	36	5	0.00075	9486.96	466.74
陶斯松	殺蟲劑	0.036	0.36	26	4	0.0001	23.82	1.72
芬普尼	殺蟲劑	0.0004	0.004	24	24	0.00023	0.95	0.08
待克利	殺菌劑	18.7	187	13	0	0.00004536	0.24	0.05
貝芬替	殺菌劑	5	50	12	1	0.00020064	13.07	1.26
加保利	殺蟲劑	0.018	0.18	12	4	0.00029	12.42	1.44
亞托敏	殺菌劑	2.5	25	11	0	0.0001536	0.43	0.05
第滅寧	殺蟲劑	0.0023	0.023	9	4	0.00007	1.75	0.27
施得圃	殺草劑	4.98	49.8	7	0	0.00009	0.26	0.07

SRD: Suggested Reference Dose

參考文獻

- 高穗生、曾經洲。1994。農藥對蜜蜂的毒性。藥毒所專題報導34：6-20。
- Brown, Charlton, Cuthbert, Barnett, Ross, Green, Gillies, Shaw, Fletcher. (1996). Identification of pesticide poisoning in wildlife. *Journal of Chromatography A*, 754(1), 463-478.
- Li, Xiqing, Bao, Chen, Yang, Daibin, Zheng, Mingqi, Li, Xuefeng, & Tao, Shu. (2010). Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 127-132.
- Stoner, K., & Eitzer, B. (2016). Correction: Using a Hazard Quotient to Evaluate Pesticide Residues Detected in Pollen Trapped from Honey Bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *PLoS ONE*, 11(7), E0159696.
- Pashte Vrushali Vijaykumar, & Patil Chidanand Shivshankar. (2018). Toxicity and poisoning symptoms of selected insecticides to honey bees (*Apis mellifera mellifera* L.). *Archives of Biological Sciences*, 70(1), 5-12.

蜜蜂與友善環境

鄭金崑

台灣養蜂協會 理事長

義大利蜂採蜜能力強，是台灣養蜂農民普遍飼養的品種。筆者從事養蜂 20 多年來，一直認為台灣環境山明水秀，飼養義大利蜂足以養家餬口，獲得不錯的經濟效益。然而，近年來因可知或不可知的因素影響，壓縮蜜蜂的生存空間，連帶使得養蜂的生活也變得不容易。

氣候環境

學者說，「蜜蜂是環境品質的一種指標」，筆者深為認同。在常年與蜜蜂為伍的生活中，筆者覺得蜜蜂對於環境變化很敏感，尤其是氣候的改變，過冷、過熱、濕度高低等等，都會影響蜜蜂的健康、活力或蜂群數量。

以筆者為例，冬季常在家鄉台中外埔放蜂。近幾年來，冬季寒風強勁且潮濕，蜂群繁殖力與活力降低，蜜蜂蟹蟎發生也較為嚴重，再怎麼用心照顧，蜂群都很難達到強勢狀態。這種不利於蜜蜂生存的環境下，只有儘速移往相對溫暖的南部，蜂群才有機會恢復活力與強勢。

蜜粉源供給

養蜂前輩常說，「只要風和日麗，蜜粉源植物充足，蜜蜂一定養得好。」確實，在 20 多年前的台灣東部與西部平原，每到冬末總是一片又一片油菜花爭相怒放的金黃色景觀，非常漂亮，非常壯觀。以養蜂農民觀點來看，在冬天蜜粉源相當匱乏的季節裡，油菜的花蜜與花粉提供了蜜蜂生存的充足養分，蜂群可以健康且活力旺盛地度過冬天。

但是，近 10 年來，黃澄澄的油菜花消失了大半；過去鄉間林間常見的蜜粉源植物，似乎也變少了。環境中蜜粉源不足問題，漸成為養蜂農民管理蜂群上的困擾，養蜂同業不禁感嘆，「養蜂越來越困難。」

農藥中毒的危機

比起氣候不良或蜜粉源缺乏，農藥中毒對蜜蜂的殺傷力更劇烈，更明顯，稱之為環境惡化的最大殺手，並不為過。

平實而言，在養蜂農民東飄西蕩的遷移生活中，很難避免無所不在，無時不在的蜜蜂農藥中毒。輕者，折損三分之一的蜂群；嚴重時，可能兩三天內整場近百群的蜜蜂傷亡殆盡。

筆者這兩年來，親身經歷荔枝採蜜期間，蜜蜂因農藥中毒而大量死亡的窘境。當時，看著滿地蜜蜂屍體，蜂箱內幾乎清空，心情只能以無語問蒼天來形容。

友善環境的期待

氣候環境的惡化與變遷，養蜂農民莫可奈何，只能調整蜂群，盡力適應。值得關切的是，外界蜜粉源植物漸顯不足，以及蜜蜂農藥中毒頻頻發生等環境劣化，讓台灣養蜂產業出現隱憂。

蜜蜂的「友善環境」可期待嗎？筆者認為，只要努力就有機會。以 2017 年為例，當年 3-4 月採收荔枝與龍眼蜂蜜期間，因為農藥中毒嚴重，蜜蜂死傷無數，許多養蜂農民鎩羽而歸。之後，台灣養蜂協會多次聯繫與反映各級農政主管機關協助改善，並且在 2018 年荔枝龍眼採蜜期前，強力宣導果農配合「荔枝龍眼開花期間，不要噴農藥，以保護蜜蜂」措施，2018 年荔枝龍眼採蜜期，蜜蜂農藥中毒情形確實得到改善。

至於其他蜜蜂會親近的蜜粉源植物還有很多，籲請農政機關持續宣導花農果農配合「作物開花期間，不要噴農藥，以保護蜜蜂」措施，或試驗推廣對蜜蜂毒性相對較低的防治藥劑，或落實噴藥前通報蜂農措施，才能改善蜜蜂農藥中毒情形。

除此之外，行政院農業委員會重視蜜粉源不足問題，已經在 2018 年訂定蜜粉源植物佈設計畫，規劃廣植油菜花及紫雲英等蜜粉源植物，提供蜜蜂冬季所需的糧食，期待能夠逐步改善台灣蜜粉源供應不足問題，讓友善環境漸漸回復。

1977「全國蜂蜜品嚐展示會」回顧

安 奎

臺灣蜜蜂與蜂產品學會 榮譽顧問

臺灣養蜂協會於 1977 年主辦「全國蜂蜜品嚐展示會」，是臺灣養蜂業首度辦理的大型展覽會，主要向社會大眾推廣蜂產品。翁文炳先生 1975 年 12 月接任第四屆理事長後，很想有所作為。當時因緣巧合，作者 1976 年受邀擔任執行秘書。接任新職的第一項任務，就是承辦蜂產品展覽會，協助養蜂事業發展。

一、承辦「全國蜂蜜品嚐展示會」

因為即將北上攻讀「養蜂學域」博士學位，平時蒐集不少國內外蜜蜂、蜂產品及蜜蜂展覽的相關資料，有信心能辦好展示會。依據大學期間辦理展覽的經驗，選擇展覽場地是成功關鍵要素，場地適宜才能聚集人潮，達到宣傳效果。確定場地後，再按場地大小決定展覽內容，進而收集展品，規劃展出。臺灣養蜂協會多數理監事建議，依循往例租一個場地，將優良的蜂產品陳列，在媒體上做廣告宣傳即可。但是，作者認為既然投入時間、經費及人力，就要辦得有聲有色。建議到台中市大百貨公司辦理，當時理監事們都認為百貨公司的場地費可能很高，協會經費恐無法支應，不具可行性。

作者應允負責尋找展覽場地，經過評估訪查，決定拜訪台中市人潮最多的「遠東百貨公司」。與負責人柏舜如總經理相約見面，洽談租借場地事宜。大約經過 30 分鐘，說明個人背景及蜂蜜品嚐展示會的基本理念後，總經理慨然應允。不但免費提供展覽場地，還支援會場美工設計及服務人員(圖 1)。沒想到接洽如此順利，讓臺灣養蜂協會理監事們都大感意外。

展示會定名為「全國蜂蜜品嚐展示會」(圖 2)，由臺灣省農林廳及臺灣養蜂協會主辦，國立中興大學昆蟲系協辦，這可能是讓總經理動心的主要原因。總經理對於預定展出的養蜂工具及蜂產品等，均未見過十分好奇。幸好事先設想到這些細節，備妥相關照片及資料說明。對於展示現場中，預定部分時段提供蜂產品，讓參觀者免費品嚐，更是總經理最愛。以往百貨公司從來沒辦過類似的展覽，這項展覽可為百貨公司創造新的推廣策略，吸引更多消費者。

二、展示會開幕

展示會日期定於 1977 年 7 月 2 日至 8 日，展覽地點在台中市自由路遠東百貨公司四樓。展示會前一天，在台中市欣欣餐廳辦理記者招待會，由翁理事長主持，農林廳植物保護科長官們列席。台中市各大報社及電視台記者，都感覺非常新奇踴躍參加。

「全國蜂蜜品嚐展示會」由農復會指導，是臺灣省農林廳及養蜂協會辦理的年度計畫(圖 3)。開幕當天，農林廳張訓舜廳長(圖 4)、謝惠騰股長及李伯符等長官蒞臨指導，協會翁理事長、理監事及會員們踴躍參加。開幕典禮後，作者負責現場解說(圖 5)。消費者參觀展覽，還可免費品嚐蜂產品，每天人潮不斷。平面媒體爭相報導，引起熱烈回響(圖 6)。

三、展示內容

展示會的主要內容，介紹臺灣養蜂協會的組織概況、說明各種蜜蜂產品對人類健康的助益、展出養蜂使用的工具等。養蜂用的工具，包括蜂箱、巢框、巢脾等。管理蜂群用的工具，包括噴煙器、蜂掃、起刮刀及預防蜂螫面罩等。採收蜂蜜的工具，包括搖蜜機(圖 7)及蜂蜜過濾器。生產蜂王乳的工具，包括人工王台框、塑膠王台、移蟲針、取王乳刀等。

展示會特別邀請國立中興大學農藝系楊智為老師參加，是展示會的一項特色。展出自行研發的罐裝蜂花粉，同時也展出花粉研磨機，蜂花粉的製作過程，這也是蜂花粉首次在台灣亮相。蜂花粉提供品嚐，引起觀眾很大興趣。楊老師出版的專書-花粉，是臺灣第一本花粉的專業書籍(圖 8)，同時新書發表，頗為難得。

展示會現場也邀請數家知名養蜂場，販售優良的蜂產品。此外，展示會現場選取部分時段，由養蜂協會提供蜂蜜、蜂王乳及蜂花粉，讓消費者免費品嚐(圖 9)。另外，安排蜂產品九折時段(圖 10)，更受消費者青睞。

四、展示會回響

農林廳主辦人謝惠騰股長(圖 11)對展覽的看法，略述如下：這次展示會是農林廳主持「加速農村建設計劃」項下，養蜂部分的最後一個項目。展示會的成功，超出想像，尤其只以一萬元五千元的補助經費，就辦得這麼出色，真是非常難得。展示會場的選擇、展示會日期的抉擇、現場布置、海報製作、養蜂工具的陳列及一切的籌畫設計等，都是空前水準。

邀請國立中興大學昆蟲系師生現場解說，更是巧思安排，團隊合作表現優異。臺灣省養蜂協會真是人才濟濟，如果按步就班地發展下去，臺灣養蜂事業一定有很好的前程遠景。利用這次展示會，讓社會大眾認識養蜂事業、蜂產品生產過程(圖 12)及多樣性的蜂產品，非常有意義。本省生產蜂王乳總量已經占世界第一位，可惜蜂王乳大多外銷，多數國人不知食用，非常遺憾。藉海報宣傳及專家現場解說，使展示會生色不少，有超出預期的成效。像這樣的展示會，應該到全省各地巡迴展出，或到世界各國舉辦。

五、消費者的心聲

展示會現場由國立中興大學志工們提供解說之外，並且蒐集消費者對蜂產品的疑問。彙整部分，提供往後辦理類似展覽的參考。

*蜂蜜部分

1. 蜂蜜對人體有什麼好處？
2. 各種蜂蜜有不同的味道，為什麼？
3. 蜜蜂如何採集蜂蜜？
4. 我家小孩吃了蜂蜜會長疹子，常吃蜂蜜會不會有副作用？
5. 龍眼蜜是不是用龍眼做出來的？

*蜂王乳部分

1. 蜂王乳是不是用蜂蜜提煉出來的？
2. 蜂王乳含有甚麼成分？效果如何？
3. 蜂王乳為甚麼這麼難吃？
4. 蜂王乳為甚麼要冰凍？
5. 蜂王乳能不能治療青春痘？

*其他蜂蜜產品部分

1. 甚麼是蜂蠟？
2. 蜂蠟有甚麼用途？蜜蜂如何採來的？
3. 蜂花粉怎麼吃法？對人體有甚麼好處？
4. 蜂花粉也能吃？會不會引起花粉熱？
5. 蜂巢蜜與其他蜂蜜有什麼不同？為什麼這麼貴？

從消費者的心聲，可見當年社會大眾對於蜜蜂及蜂產品的了解有限。臺灣的養蜂事業及有益健康功效的蜂產品，應該多辦理展示會，加以推廣宣傳。

六、結語

這次展示會由楊老杰、李錦洲、黃萬全、蘇春木等多位蜂友熱情支援，承蒙國立中興大學農藝系楊智為、植病系毛潤豐、昆蟲系張念台等師生的全力協助，才能如期順利展出。詳列提供展覽及品嚐蜂產品的單位及個人清單(表 1)，特此致謝。

七天的「全國蜂蜜品嚐展示會」，邀約中興大學昆蟲系師生 16 位，包括 4 位碩士、5 位碩士生及 7 位大學生輪流支援，在展示會現場為消費者詳細解說。當年全國任何一次工商展覽中，都沒有如此堅強的服務陣容，是展示會的另一特色。值得一提的是，這次展示會也是臺灣養蜂協會與國立中興大學昆蟲學系合作的開端。

本次展示會的成功，是全體參與人員共同努力的成果，感謝臺灣養蜂協會提供發揮的舞台。首次承辦大型展覽，能夠受到社會認同，又得到上級長官嘉許，非常榮幸。本文是四十多年前的往事，彙整檔案及老舊圖片。補充早年臺灣養蜂事業發展史的片段，與讀者分享。

表 1、提供展覽及品嚐的單位及個人

	展覽及品嚐	提供單位及個人	
一	展示部分		
1	蜜蜂觀察箱一組	國立中興大學昆蟲系	
2	海報 17 張。蜜蜂行為解說 12 張、蜜蜂及蜂王乳採收過程 1 張、梨山養蜂介紹 1 張、蜂王乳海報 1 張、台灣省養蜂協會組織概況 1 大張、宣傳海報 1 大張、蜜蜂漫畫 2 張	國立中興大學昆蟲系張念台製作，部分圖片蜂協監事翁地利提供	
3	養蜂器具 16 件。起刮刀、豐刷、王台框、蜂蠟、風箱、搖蜜機、花粉採收器等	楊老杰常務理事	
4	蜂蠟 1 件	張添福理事	
5	天然花粉(粒狀)	第一屆理事長施學昆	
二	品嚐部分		
1	巢蜜	第三屆理事長王嘉雄	
2	花粉(倍益康)	楊智為蜂友	
3	蜂王乳	中華王乳公司黃萬全、劉錦彬、蘇綱生	
4	蜂蜜	台北：翁地利(蓬萊)、藍玉昇(昊天)	
		苗栗：蘇綱生、劉錦彬	
		台中：施學昆、楊老杰、陳榮、王德法、林倪植(中興班)	
		台南：黃水法(華成)	
		高雄：黃萬全(金牌)、劉要(要城)、賴平西(賴家)	
		屏東：曾金泰(四海)、陳利光(龍山)、陳慧聰(大岡山)	
5	提供記者招待會品嚐(蜂蜜及蜂王乳)	嘉義：蘇春木，高雄：黃萬全	

圖 1 展示會場入口及服務人員



圖 2 三樓通往四樓展場的指標



圖 3 展場展出搖蜜機、噴煙器等



圖 4 楊智為出版的第一本專書-花粉



圖 5 歡迎品嚐標牌



圖 6 展品九折時段



圖 7 品嚐通告

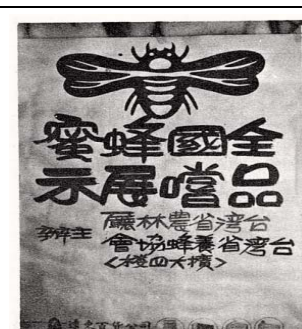


圖 8 農林廳張訓舜廳長(中)現場指導



<p>圖 9 作者現場解說</p>	<p>圖 10 媒體報導</p>
<p>農林廳張廳長光臨參觀指導</p> 	
<p>圖 11 農林廳主辦人謝惠騰股長</p>	<p>圖 12 展出單元</p>
	

利用丁酸鈉誘導西方蜂免疫與解毒基因表現 進而增加對環境逆境的抵抗能力

唐政綱、吳岳隆*

國立臺灣大學昆蟲學系

*通訊作者：吳岳隆

電子郵件：runwu@ntu.edu.tw

通訊地址：台北市羅斯福路四段一號

摘要

西方蜜蜂是全球重要的經濟益蟲，也是生態系中重要的授粉者；蜜蜂負責主要食用作物之授粉工作，對糧食生產的重要性極高。近幾十年來，自從農業藥劑問世後，對於生態系的衝擊受到高度重視，對蜜蜂的衝擊尤甚；近來全球各地皆有蜜蜂大量消失的報告，雖然背後的成因尚未明朗，而蜂群消失也非單一成因，但農藥和病原菌極可能是元兇。許多研究指出受農藥影響的蜜蜂除了免疫功能表現受影響，對病原菌的抵抗變差，具神經毒性的農藥如益達胺對蜜蜂的行為與記憶也具負面影響；本研究使用組蛋白去乙酰化酶抑制劑（丁酸鈉）來探討對蜜蜂基因調控與對抗逆境的影響。去乙酰化酶抑制劑主要參與組蛋白修飾，會抑制去乙酰化酶導致染色體結構較開放，而影響基因表現；研究中使用去乙酰化酶抑制劑-丁酸鈉作為蜜蜂飲食添加劑，利用即時聚合酶鏈鎖反應偵測基因表現，結果顯示丁酸鈉對蜜蜂免疫與解毒基因的表現量有提升效果；生物活性測試結果顯示蜜蜂對益達胺的耐受度獲得提升，並較能抵禦微孢子蟲的入侵與降低病毒的感染；本實驗也初步分析丁酸鈉對蜜蜂記憶基因的調控，提供初步的資訊給往後的研究，並了解蜜蜂如何抵抗逆境，以及去乙酰化酶抑制劑在養蜂資材的可能應用。（已發表於 Scientific Reports (2017), 7, 41255）

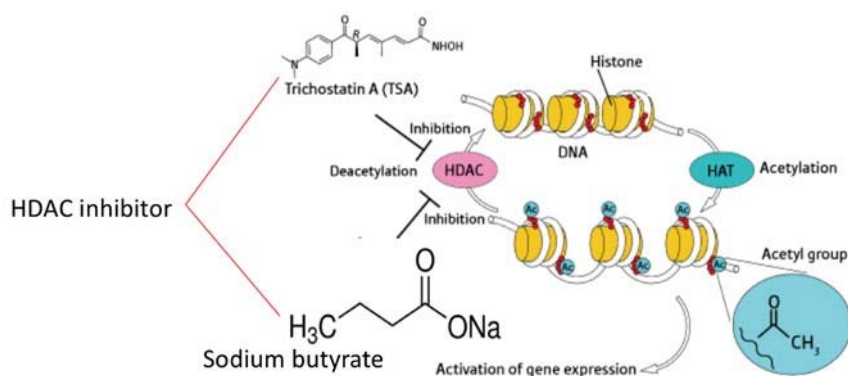
關鍵字：西方蜜蜂、去乙酰化酶抑制劑、免疫基因、解毒基因、記憶基因

前言

Apis mellifera 又稱西方蜜蜂，膜翅目蜜蜂科。西方蜂是一種社會性昆蟲，牠們群居生活，為了團體而犧牲了部分個體的利益，譬如說育幼，牠們有共同育幼的行為。除此之外，社會性昆蟲有著鮮明的分工合作系統，工蜂就分為內勤蜂以及外勤蜂，社會性昆蟲擁有較少的免疫基因，對於病原菌較無免疫力，牠們以團體生活為主，巢內若出現受病原菌感染的個體，其他的同類會將受感染者推出巢外，牠們免疫的機制與大多數昆蟲不一樣，也因此容易被許多病原菌感染，對農藥也較無抵抗力，而影響到個體出現失憶的現象。西方蜜蜂是重要的經濟昆蟲，除了蜂蜜、蜂蠟等蜂產品之外，也替多數開花植物授粉 (Ashman et al., 2004; Potts et al., 2010)。其中包括許多重要的農作物如瓜果、柑橘類、堅果、苜蓿等等。自 2006 年末，美國發生工蜂突然消失、蜂群大量減少的狀況，而這種現象也發生在蜜蜂群落，學者首次以 Colony Collapse Disorder，也就是所稱的蜂群崩潰症候群(CCD)，來描述這個現象。爾後世界各地也陸續傳出有蜂群消失的現象，造成嚴重的經濟損失，而台灣也從 2007 年開始有蜂群崩潰的案例傳出。蜂群崩潰可能是由病原菌所引起 (Cornman et al., 2012; Cox-Foster et al., 2007)，或殺蟲劑 (Cresswell and Thompson, 2012)，或兩者的交互作用造成蜜蜂的環境壓力 (Gonzalez-Varo et al., 2013)。而根據研究，在蜂巢裡被找到大約有 120 種農藥的侵入 (Mullin et al., 2010)，這些農藥可能干擾蜜蜂的神經系統 (Pilling et al., 1995)、發育 (Saber et al., 2005)、免疫 (Delpuech et al., 1996) 以及記憶 (Yang et al., 2008) 等基因層面上的影響。許多研究經過採樣及試驗之後將問題指向菸鹼類的新型農藥如益達胺。這種類尼古丁農藥已被證實在低劑量下，便會對蜜蜂的學習能力及行為造成影響，也會對蜜蜂的記憶造成損害，在記憶行為上影響了短期、長期以及學習的表現，可能是造成工蜂外出採蜜後無法回到蜂巢的元凶 (Williamson and Wright, 2013; Yang et al., 2008)。另外社會性昆蟲如蜜蜂，擁有較少的免疫基因，這代表著對於病原菌較無免疫力，容易受到慢性蜜蜂麻痹病毒(CBPV)、急性蜜蜂麻痹病毒(ABPV)(Bailey, 1971)等病毒性病菌感染。根據統計台灣有一半以上的蜜蜂都存在潛伏性病毒，一旦病毒轉成急性感染便會造成蜂群大量死亡，目前唯一的處理方式只能將感病的蜜蜂移出蜂箱，避免損失擴大。故尋求合適的防治之道便是當務之急。

在真核細胞中，DNA 與組蛋白核心纏繞，而組蛋白由數個次單元組成，包括 H2A、H2B、H3 及 H4。每個次單元包含作為後轉譯調控的活性點位的氨基酸鏈 (Spotswood and Turner, 2002)。組蛋白去乙醯化酶(HDACs)藉由從組蛋白尾端特定的離氨酸，移除乙醯官能基來修飾染色質絲結構。以及在表觀遺傳學(epigenetics)調控扮演重要的角色(Marks et al., 2003)。表觀

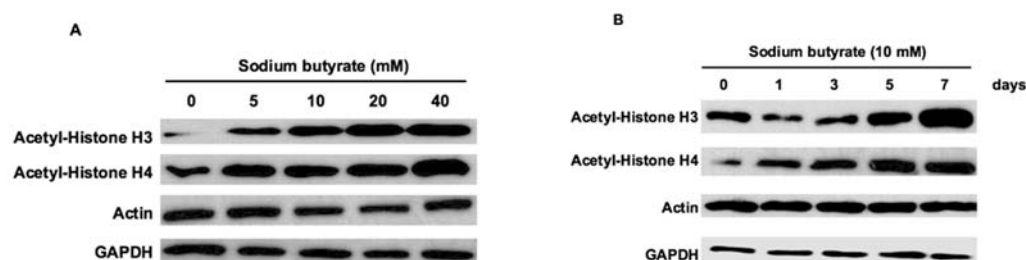
遺傳學調控的步驟包括甲基化離氨酸及精氨酸、磷酸化絲氨酸、泛素化離氨酸、及乙醯化 lysine (Allis, 2002)。組蛋白上的不同修飾造成基因表現的正調控與負調控(Bogdanovic and Veenstra, 2009)。組蛋白去乙醯化酶抑制劑(HDACi)，與組蛋白乙醯轉移酶 (HATs) 相反，是抑制組蛋白乙醯化酶活性的化合物(Mai et al., 2005) (圖一)。他們觸發組蛋白尾端的乙醯化，使基因活性。HDACi 誘導乙醯化的累積，並造成基因表現的改變約 2-10% (Allis, 2002; Mitsiades et al., 2004)。表觀遺傳學調控也可以由環境因子觸發，如重金屬或持久的有機污染，這些環境因子可以調控後基因修飾標記如乙醯化或甲基化(Collotta et al., 2013)。研究同時顯示 HDACi 加速了生長，延長壽命(Zhao et al., 2005) 並幫助昆蟲克服傷病(Mukherjee et al., 2012)，但高劑量可能會抑制細胞生長及誘導細胞凋亡(Shao et al., 2004; Tabuchi et al., 2006)。現今發現了許多物質可以抑制組蛋白構型(HDACi)使得基因得以大量表現，丁酸鈉(sodium butyrate, NaB)就是其中一種，可以選擇性的作用在真核組蛋白上(Gui et al., 2004)，丁酸鈉是一種短鏈脂肪酸，已知具有抑制組蛋白去乙醯化酶的作用(Davie, 2003)，能誘導乙醯化的累積，常被用來使基因大量表現。已經有改變人類與小鼠基因表現程度的研究 (Hinnebusch et al., 2002)。到目前為止，HDACi 在昆蟲身上應用有關的研究目前並不多。在本研究試圖探討 HDACi 在昆蟲中對基因表達的效果。我們想探討將丁酸鈉處理在蜜蜂上，是否會藉由改變其組蛋白構型來增加解毒與記憶學習基因的表現量。另外也探討對於抗病原性的免疫基因與農藥解毒基因是否有調控能力，進而增加抗病源感染的能力與抗農藥污染的能力。



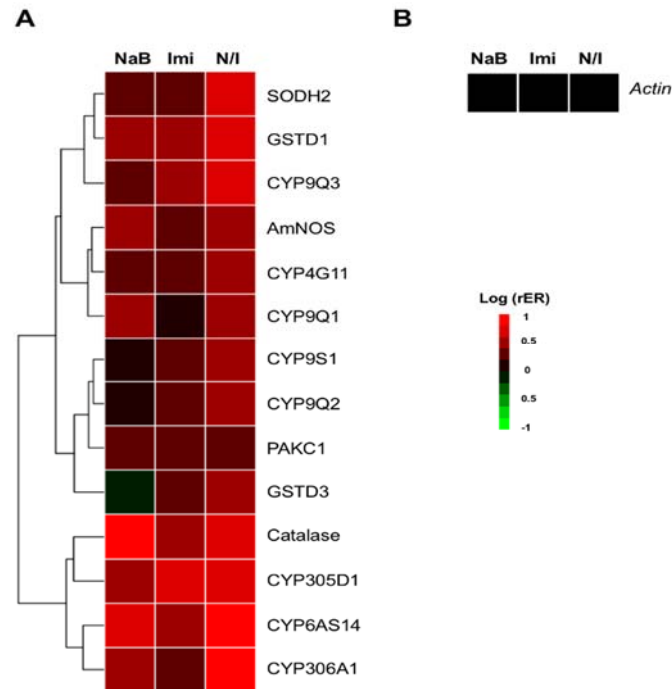
圖一、組蛋白去乙醯化酶抑制劑(HDACi)，與組蛋白乙醯轉移酶(HATs)相反，抑制組蛋白乙醯化酶活性的化合物。組蛋白接上乙醯基後會促使DNA 脫離組蛋白進而促進基因表現。組蛋白去乙醯化酶(HDAC)使乙醯基脫離組蛋白，讓DNA 再度與組蛋白緊密結合使基因表現量下降。

昆蟲的免疫系統有許多機制，除了行為規避之外，生理構造的防禦也是其中一種如表皮與蠟質等，而最後一道防線就是細胞免疫和體液免疫。昆蟲體內沒有T細胞以及B細胞，無免疫球蛋白以及補體系統，缺乏抗體機制，屬於非專一性免疫。體液免疫包括正常蟲體存在的體液免疫因子，如凝集素、氧化酶原、體液

英膜等，以及經過人工或自然誘導後產生的免疫因子，如抗菌蛋白；而細胞免疫則是用大大小小的細胞將病原菌排出體外，包括吞噬、集結、包囊作用等反應；病原菌以及農藥化學物質在通過前幾層防禦進到蟲體內後，觸發蟲體內類似免疫系統的機制，將外來有害物質排出。然而，社會性昆蟲的免疫基因表現量低，依賴更多行為上的免疫機制。類尼古丁殺蟲劑如益達胺已經被證實在低濃度下對蜜蜂的免疫、記憶等生理有影響：餵食益達胺的蜜蜂，受神經毒影響，依劑量不同，在行為上表現出變化(Lambin et al., 2001)。益達胺及其他類尼古丁的殺蟲劑會影響嗅覺學習，及干擾定位和導航，使外勤蜂找不到他們的蜂巢(Yang et al., 2008)。同時，蜜蜂的口吻延伸反應(PER)，在餵食益達胺 30 分鐘後受損(Decourtye et al., 2004)。多巴胺是無脊椎動物的神經系統中一種重要的神經傳導物質，已證實會被類尼古丁殺蟲劑影響，且造成蜜蜂的記憶損害(Williamson and Wright, 2013; Yang et al., 2008)。蜜蜂的基因組內，關於記憶的基因約有三十個，有些控制學習行為，有些幫助記憶。研究裡指出將其中九種包括 Dmmt1、Dmmt2、Dmmt3 等基因做出抑制甲基化的調控，會對蜜蜂的長期記憶有明顯的影響，在 DNA 甲基化後會造成這些基因的表現、記憶的保留與嗅覺行為的長期記憶的建立，而被去甲基化的基因在 24 小時內即會有抑制記憶表現的結果，總而言之，記憶的形成受到短時間內多個基因調控所影響。蜜蜂有許多的行為包括飛行、定位、築巢、育幼與各種感官等等，其中與記憶相關的行為不儘其數，而記憶形成的種類有很多種，例如：長期記憶、短期記憶，甚至是學習都是屬於記憶的一部份，例如飛行時依據太陽的位置跟周圍的物體來標定蜂巢的位置，透過八字舞(Frisch K von et al., 1967) 來傳達花粉來源的距離跟方向等。這些行為的建立跟記憶基因的表現有著密不可分的關係。而受到低濃度益達胺等農藥亞毒力危害的蜜蜂則不能正常建立、表現或是遺忘了某些記憶的行為能力，則會危害到個體甚至是整個族群的生存(Yang et al., 2008)。在我們先前的研究中發現處理丁酸鈉的蜜蜂，經由西方墨點法證實乙醯化的組蛋白會隨著處理的濃度與天數的增加而明顯增加（圖二）。證實餵食丁酸鈉的確會造成組蛋白修飾發現改變。我們進一步利用 qPCR 方式分析目前已經知道蜜蜂解毒基因，結果發現只要處理過丁酸鈉的組別解毒基因都會明顯被誘導（圖三）。

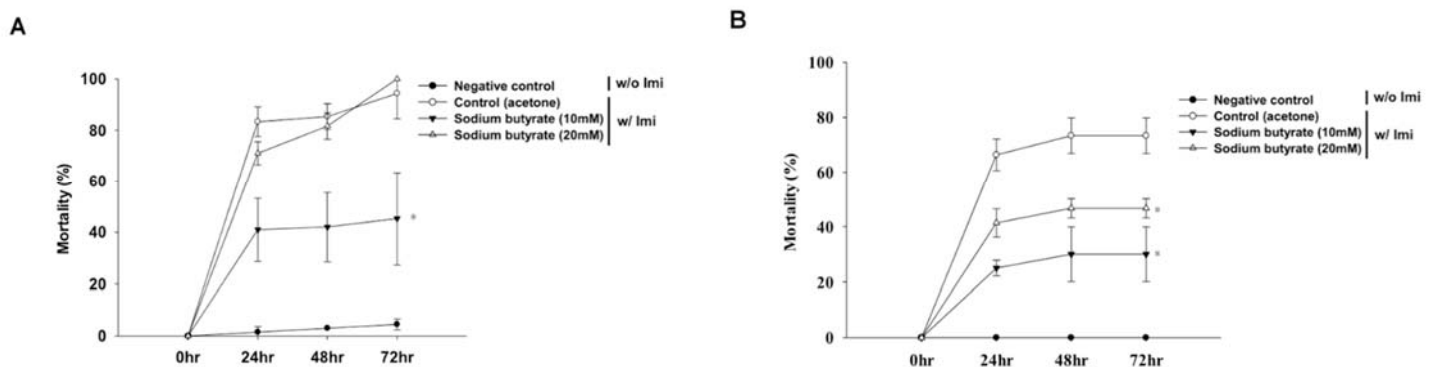


圖二、利用西方墨點法分析受丁酸鈉改變組蛋白構型之表現量



圖三、丁酸鈉大量誘導蜜蜂的解毒基因

進一步進行毒性測驗，我們將內勤蜂與外勤蜂分別處理丁酸鈉後，再加入不同濃度的益達胺，分析蜜蜂存活狀況，結果發現沒有餵食丁酸鈉的蜜蜂在處理益達胺死亡率高達 80%，但是有餵食丁酸鈉的蜜蜂死亡率明顯下降至 30-40%（圖四）。結果顯示餵食後的蜜蜂對於農藥具有高度抗性。

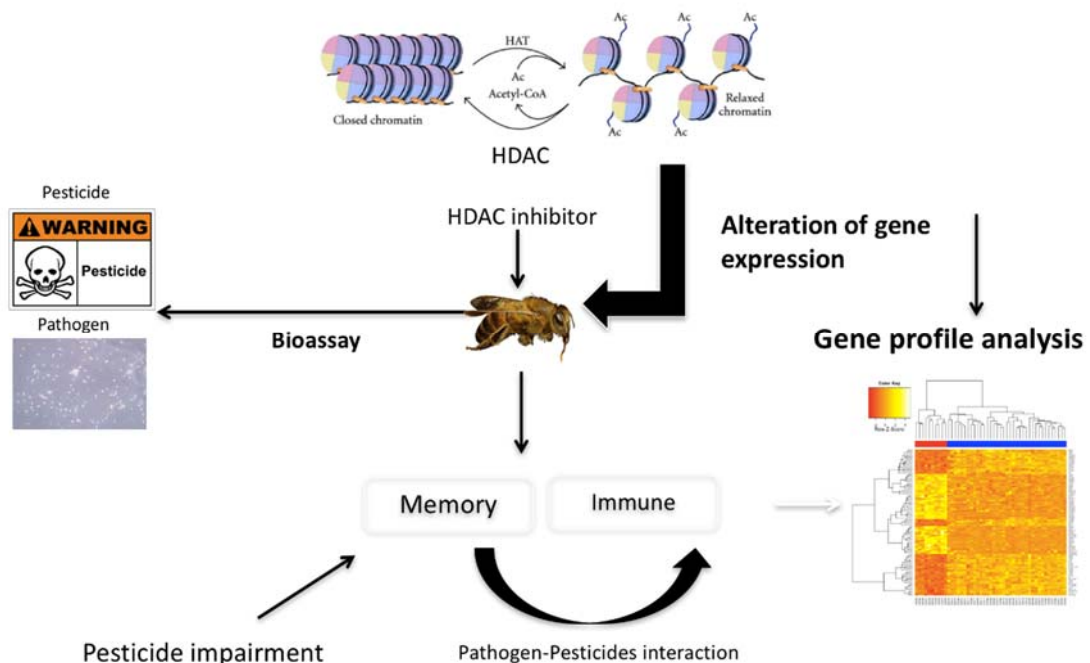


圖四、丁酸鈉增加蜜蜂對益達胺抗性

結論

我們目前的研究使用組蛋白去乙酰化酶抑制劑(HDACi)-丁酸鈉，來探討對蜜蜂基因調控與對抗農藥與病毒的影響。丁酸鈉主要參與組蛋白修飾，會抑制去乙酰化酶導致染色體結構較鬆散，而增加抗藥性與免疫基因表現，而在農藥抗性實驗中發現能使蜜蜂提高對農藥的耐受程度。接續先前的研究模式，進一步利用組蛋白去乙酰化酶抑制劑(HDACi)-丁酸鈉餵食蜜蜂後探討是否可調控蜜蜂的免疫基因與記憶基因，我們的研究結果發現會增強其對於病原菌與環境化學物質所造成的受損具明顯抗性。在未來我們將進一步評估將丁酸鈉應用在養蜂資材上的可行性。

實驗流程



研究方法及步驟：

1. 實驗用蟲的來源與培養：

本實驗所使用的西方蜜蜂(*Apis mellifera*)均來自桃園市的台灣養蜂場，將實驗蜜蜂分為兩組做生物測定及基因分析，外勤蜂及內勤蜂。外勤蜂從蜂巢外採集，而內勤蜂則從 brood comb 採集(Suchail et al., 2001)，兩者皆培養在 BugDorm (30 × 30 × 30 cm)。兩者皆放在恆溫培養箱。蜜蜂以 50% (W/V) 的蔗糖液餵食或配置不同濃度的丁酸鈉溶液的蔗糖溶液(Tokyo chemical industry CO., LTD)，分別包括 5mM/L、10 mM/L、20 mM/L and 40mM/L (Zhao et al., 2005)。同一天羽化的內勤蜂以普通的蔗糖溶液餵食一個星期

以穩定其生理狀態，然後再以不同濃度的丁酸鹽蔗糖液餵食一個禮拜。外勤蜂則以丁酸鈉及普通的糖水直接餵食一個禮拜。在處理結束後，將蜜蜂收集作基因分析或病毒感染等測定。

2. 西方墨點法分析組蛋白表現量

將處理丁酸鈉的蜜蜂利用 ReadyPrep™ Protein Extraction Kit (Bio-Rad) 萃取蛋白質，利用 2 X sample buffer (0.2 M Tris/HCl, 4 % SDS, 18 % glycerol, 2 % β -mercaptoethanol 與 0.004 % bromophenol blue) 加熱十分鐘。冷卻後將樣品注入 SDS-PAGE。在電泳槽注入 running buffer (200 mM glycine, 2.5 mM Tris/HCl, and 20 mM methanol) 中以 40V 的電壓使樣品分離。將含有樣品的膠體轉漬到 PVDF 膜中。轉印後的 PVDF 浸泡在 5 % 脫脂牛奶與 0.05 % Tween-20 室溫反應一小時後加入第一次抗體 acetyl-H3 或 acetyl-H4 (millipore) 以 1:5000 在 4 °C 反應 12 小時後。以 TPBS (PBS, 0.1 % Tween-20) 清洗三次，再加入二次抗體 (1:2500) AP-conjugated anti-mouse antibody (Dako)。最後利用 NBT/BCIP (Kirkegaard & Perry Laboratories) 呈色。

3. RNA 萃取與 RT-PCR

蜜蜂的 RNA 萃取將每四隻蜜蜂為一組，每組將蜜蜂頭與身體分開萃取，蜜蜂組織 RNA 以 TRIzol reagent (ambion, 15596) 萃取。加入 TRIzol 均質後，再加入 chloroform (1mL TRIzol reagent/ 0.2mL chloroform) 置於 1.5mL 離心管混勻後室溫靜置五分鐘。加入 chloroform 每 15 秒混勻一次持續 2-3 分鐘，以 12000 rpm, 4°C 離心二十分鐘。吸取上清液至另一乾淨離心管，再加入 chloroform 輕搖混勻，以 12000 rpm, 4°C 離心二十分鐘。移除上清液後加入 0.5mL 之 isopropanol，快速混勻以 12000 rpm, 4°C 離心十五分鐘，吸除上清液並以 75% EtOH 風乾 RNA 團塊，最後以 DEPC 水回溶 RNA 團塊，儲存於 -80 °C 冰箱。以 NanoDrop 2000 作 RNA 定量 (Thermo Scientific)。以反轉錄試劑做 cDNA 的合成 (SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix, ThermoFisher)。所需的 RNA 模板為 1 μ g。整個反應在 PCR 儀中進行 (Biometra)。RT-PCR (Reverse transcription- PCR) 稱為反轉錄聚合酶連鎖反應，可將微量的 RNA 反轉錄為 cDNA (complementary DNA)。萃取 RNA 之後使用 invitrogen 的 SuperScript® III First-Strand Synthesis System 進行 RT-PCR。

4. Real- Time PCR 定量及引子設計

Real- Time PCR (Real- Time polymerase chain reaction) 為即時聚合酶連鎖反應，藉由聚合酶連鎖反應擴增 DNA，並以螢光物質即時偵測產物總量。本實驗採用常見螢光物質— SYBR Green。SYBR Green 可鑲嵌至雙股 DNA 的 minor groove 上，經激發後產生螢光，其隨雙股 DNA 含量的增加產生的訊號也隨之變強。在這過程中即時偵測螢光訊號，就可達到即時定量的效果。使用 RealTime-

PCR 可以更精準的測量反應物的起始濃度。用來做基因分析的蜜蜂分為四組：沒有做任何處理的、丁酸鈉溶液處理、益達胺處理以及丁酸鈉-益達胺溶液處理。其中丁酸鈉-益達胺溶液處理方式是先由益達胺處理 24 小時，經過 RNA 萃取並進行 RT-PCR，之後再以 GAPDH 或是 ACTIN 當作基準基因。分別利用免疫與記憶專一性引子進行基因表現實驗。

5. 微孢子蟲與病毒感染力測試

試驗的蜜蜂，並置放於培養箱中，蜜蜂以不同的糖水餵食，分成兩個組別，一組沒有添加丁酸鈉，另外一組則是添加丁酸鈉。連續餵食七天後進行病原菌感染試驗。每 30 隻蜜蜂為一組以直接餵食的方式，將 1×10^5 的微孢子讓蜜蜂攝入。在感染微孢子後分別在一天，三天，五天與七天將蜜蜂收集下來，收集蜜蜂中腸組織利用均質機破壞組織，利用差異性離心方式收集蜜蜂腸道中的微孢子，再利用血球計數器計算微孢子含量。並且利用 real-time PCR 檢測微孢子的基因組分析其感染能力的變化。在病毒方面直接利用 real-time PCR 方式測定蜜蜂體內持續性感染的病毒表現量。我們目前檢測的病毒是台灣常見的潛伏性感染的蜜蜂病毒，包含：急性蜜蜂麻痹病毒(acute bee-paralysis virus, ABPV)，蜜蜂黑王台病毒(black queen-cell virus, BQCV)，克什米爾蜜蜂病毒(Kashmir bee virus, KBV)，慢性蜜蜂麻痹病毒(chronic bee-paralysis virus, CBPV)，蜜蜂囊雛病毒(sacbrood bee virus, SBV)，蜜蜂畸翅病毒(deformed wing virus, DWV)，蜂蟹蝨病毒(varroa destructor virus, VDV)，以色列麻痹病毒(israel acute paralysis virus, IAPV)等等。

6. 學習行為測試

試驗的蜜蜂，養殖於一個 15x15x15 cm 的箱網中，並置放於培養箱中。蜜蜂以不同的糖水餵食，分成兩個組別，一組沒有添加丁酸鈉，另外一組則是添加丁酸鈉。連續餵食七天後接著以 micropipette 滴入不同濃度的益達胺溶液(粉末狀益達胺溶於 acetone)或 acetone (對照組) 於蜜蜂胸背板中。放置七天後進行蜜蜂學習行為測試。我們利用制約蜜蜂的口吻延伸反應(proboscis extension reflex, PER) 的方式來評估其學習能力，利用味道作為制約刺激與糖水作為非制約刺激的結合，用來試驗蜜蜂是否產生 PER 並觀察其學習能力。實驗步驟如下：

學習：

1. 給予蜜蜂取食 50% 的蔗糖水溶液
2. 利用 picopump 裝置連接精油給予味道刺激 6 秒，在第三秒同時給予蜜蜂取食糖水。

試驗：

最後只給予味道刺激以測試蜜蜂是否會想到糖水而產生口吻延伸反應。
每隻蜜蜂皆進行 4 次學習試驗，而在每次學習試驗皆須間隔 20 分鐘。

PER 反應比列之計算公式：

$$\text{PER} = (\text{反映隻數} / \text{測試隻數}) \times 100\%$$

7. PCR 陣列圖像與數據分析

PCR 圖像是以 R 統計軟體分析，其倍數變化是運用相對定量理論($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak and Schmittgen, 2001)，各組實驗基因被標準化作為參考基因(GAPDH for immunity)，然後以對照組的倍數變化作為校準；而記憶基因的數據分析則是運用 SPSS 數據運算軟體，將記憶基因 RT-PCR 之 C_t 值以 GAPDH 的 C_t 值為基準，標準化得出 (Dexter, 2013)。

參考文獻

- Allis, D., 2002. Translating the histone code: A tale of tails. *Molecular Biology of the Cell* 13, 278a-278a.
- Ashman, T.L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T., Wilson, W.G., 2004. Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85, 2408-2421.
- Bogdanovic, O., Veenstra, G.J.C., 2009. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549-565.
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V., 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307, 35-41.
- Cornman, R.S., Tarpy, D.R., Chen, Y.P., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Evans, D., 2012. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *Plos One* 7.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J.H., Cui, L.W., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
- Cresswell, J.E., Thompson, H.M., 2012. Comment on "A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees". *Science* 337.
- Davie, J.R., 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133, 2485s-2493s.
- Decourtye, A., Armengaud, C., Renou, M., Devillers, J., Cluzeau, S., Gauthier, M., Pham-Delegue, M.H., 2004. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Phys* 78, 83-92.
- Dexter, F., 2013. Wilcoxon-Mann-Whitney Test Used for Data That Are Not Normally

- Distributed. *Anesth Analg* 117, 537-538.
- Gonzalez-Varo, J.P., Biesmeijer, J.C., Bommarco, R., Potts, S.G., Schweiger, O., Smith, H.G., Steffan-Dewenter, I., Szentgyorgyi, H., Woyciechowski, M., Vila, M., 2013. Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution* 28, 524-530.
- Gui, C.Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M., Marks, P.A., 2004. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21(WAF1) involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1241-1246.
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M., 2001. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 129-134.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402-408.
- Mai, A., Massa, S., Rotili, D., Cerbara, I., Valente, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., 2005. Histone deacetylation in epigenetics: An attractive target for anticancer therapy. *Medicinal Research Reviews* 25, 261-309.
- Marks, P.A., Miller, T., Richon, V.M., 2003. Histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology* 3, 344-351.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Hideshima, T., Akiyama, M., Chauhan, D., Munshi, N., Gu, X.S., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Richon, V.M., Marks, P.A., Anderson, K.C., 2004. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: Biological and clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 540-545.
- Mukherjee, K., Fischer, R., Vilcinskas, A., 2012. Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection. *Frontiers in Zoology* 9.
- Pilling, E.D., Bromleychallenor, K.A.C., Walker, C.H., Jepson, P.C., 1995. Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide Lambda-Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz, in the Honeybee (*Apis mellifera* L). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51, 1-11.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25, 345-353.
- Shao, Y.F., Gao, Z.H., Marks, P.A., Jiang, X.J., 2004. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 101, 18030-18035.
- Spotswood, H.T., Turner, B.M., 2002. An increasingly complex code. *Journal of Clinical Investigation* 110, 577-582.
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2482-2486.
- Tabuchi, Y., Takasaki, I., Doi, T., Ishii, Y., Sakai, H., Kondo, T., 2006. Genetic networks responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Febs Letters* 580, 3035-3041.
- Williamson, S.M., Wright, G.A., 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology* 216, 1799-1807.
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H., 2008. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101, 1743-1748.
- Zhao, Y.M., Sun, H., Lu, J., Li, X.X., Chen, X., Tao, D., Huang, W.F., Huang, B.Q., 2005. Lifespan extension and elevated hsp gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Experimental Biology* 208, 697-705.

低劑量益達胺對不同齡期蜜蜂基因表現之影響

陳韻如¹、曾德維²、丁婕¹、徐培修³、吳姿嫻³、鍾思林²、楊恩誠¹

¹ 國立臺灣大學生物資源暨農學院昆蟲學系

² 香港中文大學生命科學院

³ 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

摘要

蜜蜂衰竭症候群 (colony collapse disorder, CCD) 在近十幾年來成為引起大家的關注，為了釐清亞致死劑量益達胺對蜜蜂幼蟲發育造成的影響，本實驗是利用次世代定序技術檢測蜜蜂幼蟲餵食 1 ppb、10 ppb、與 50 ppb 的亞致死劑量益達胺後，不同日齡蜜蜂基因表現狀態，結果顯示蜜蜂幼蟲連續四天取食到極低劑量益達胺 (約 10 ppb, 10 µg/L) 後，在第九日齡幼蟲即檢測到基因表現改變，且基因表現量改變的數目與餵食的益達胺濃度成線性關係，此線性關係在第 0 日齡成蜂時也有觀察到。但成蜂到了第 7 日齡時，卻僅有幼蟲期給予 10 ppb 益達胺的組別有檢視到差異性表現基因。此外，在幼蟲期所檢測到的差異性表現基因與在成蟲期所檢測到者功能分群有所不同，顯示在幼蟲時期取食到的益達胺造成的影響會隨著蜜蜂齡期改變而有所不同。此研究結果顯示極低劑量益達胺(10 ppb)即可對蜜蜂幼蟲發育造成影響，且此影響會延伸到成蟲時期，更可能影響蜂巢群落的穩定。

關鍵詞：西洋蜂、亞致死劑量、益達胺、差異性表現基因

前言

過去二十年來，歐洲、北美洲等地區出現了蜜蜂消失的現象，此現象包括成蜂突然大量消失，僅留下巢內食物、幼蟲、內勤蜂、與蜂后，推測是蜜蜂外出採集後，因某些因素而無法歸巢，死於野外，此現象稱為蜂群衰竭失調症候群 (colony collapse disorder, CCD) (Brown and Paxton, 2009; Potts et al., 2010; Stokstad, 2007)。一般認為 CCD 是很多因子相互作用所導致，如病原體、病毒、寄生蟲及農業化肥等等 (Blanchard et al., 2008; Higes et al., 2009; Maori et al., 2009; Smith et al., 2013; Goulson et al., 2015)。近年來研究則指出，蜜蜂化學藥劑中毒，特別是殺蟲劑是一個考慮要點。

化學藥劑中，以類尼古丁類 (neonicotinoid) 殺蟲劑 (如益達胺 (Imidacloprid)、可尼丁 (Clothianidin) 和賽速安 (Thiamethoxam)) 之大量使用被普遍認為是造成蜜蜂消失的可能原因 (Henry et al., 2012; Pisa et al., 2017)。類尼古丁殺蟲劑是尼古丁 (nicotine) 的類似物，為一種神經毒殺蟲劑。這類藥劑可溶於水，可從根部吸收並在植物體內移行，是一系統性殺蟲劑 (Schmuck, 1999; Schmuck et al., 2001)。類尼古丁類殺蟲劑進入昆蟲體內後與昆蟲神經系統中的菸鹼酸乙醯膽鹼接受器 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 結合 (Buckingham et al., 1997; Matsuda et al., 2001)，使神經系統過度興奮，最後造成昆蟲麻痺或衰竭而亡 (Matsuda et al., 2005)。

益達胺對蜜蜂工蜂的口服毒性甚高，對單隻蜜蜂的口服半致死劑量 (LD_{50}) 為 3.7 - 102 ng 之間，而口服半致死濃度 (LC_{50}) 為 140 - 1570 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0.14 - 1.57 ppm) (Nauen et al., 2001; Schmuck et al., 2001; Suchail et al., 2001)，接觸半致死劑量為 24 ng (Suchail et al., 2001)，且低劑量的益達胺對蜜蜂成蜂行為生理上均會造成影響。濃度為 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (即 0.5 ppb 和 5 ppb) 的益達胺即會改變蜜蜂採集花粉的頻率並造成封蓋率下降 (Faucon et al., 2005)。本研究室的行為研究發現，當蜜蜂取食 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的益達胺蔗糖溶液後，往返巢房與人工餵食器之間的時間就會延長。若濃度提高至 600 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以上，有 34% 的蜜蜂沒有回巢，此消失現象隨著濃度的提升而更加顯著。由此可知，即使益達胺尚未達到可以直接殺死蜜蜂的程度，但對蜜蜂的採集行為已經造成了顯著的影響 (Yang et al., 2008)。除了對蜜蜂的行為造成影響，低劑量益達胺對蜜蜂的神經系統以及學習能力也會造成影響。Decourtye 等人以 12 - 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的益達胺溶液餵食蜜蜂，會造成蜜蜂的學習記憶能力受損 (Decourtye et al., 2003)；蜜蜂攝入濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的益達胺後，會造成其移動性下降和溝通行為減少，進而危及到蜜蜂社會性行為 (Medrzycki et al., 2003)；每隻蜜蜂攝取到 12 ng 的益達胺時，其中期嗅覺記憶會受到損害 (medium-term olfactory memory) (Decourtye et al., 2004)；近期的研究更是顯示劑量 1.5 ng/bee 的益達胺會造成採集活動顯著減少以及增加飛

行時間 (Schneider et al., 2012)。以上這些研究數據顯示，益達胺的亞致死劑量會造成蜜蜂慢性中毒而影響其行為，進而影響蜂群的健康 (Guez et al., 2001; Bonmatin et al., 2005)。

外勤蜂在外採集到花粉或是花蜜後會將其帶回巢，如花粉與花蜜有益達胺殘留，這些殘留也跟著被帶回蜂巢，污染蜂巢環境甚至個體。Pareja et al. (2011) 的調查顯示，衰弱中的蜂窩 (depopulated beehives) 裡的蜂巢和蜂蠟有相對高的益達胺殘留。因此可推測益達胺會累積於這些物質中，蜂群長期暴露在益達胺污染的環境下造成慢性毒害。而這樣的毒害，除了蜂后、雄蜂、內勤蜂外，幼蟲也持續受到益達胺的慢性危害。Decourtye and Devillers (2010) 報導了餵食含有 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 益達胺溶液的食物會使蜜蜂幼蟲的發育遲滯，而 Wu et al. (2011) 亦發現同樣的現象。另一方面，益達胺對於蜜蜂幼蟲的腦部發育影響之研究，發現在 8.09 $\mu\text{g}/\text{bee}$ 的益達胺劑量處理下會使 Africanized *Apis mellifera* 的葷狀體細胞核產生染色質凝聚 (condensed chromatin)，意即細胞死亡。而同樣劑量餵食幼蟲則造成肯氏細胞 (Kenyon cell, KC) 產生細胞腫脹 (cell swelling) 的現象 (Almeida Rossi et al., 2013)。然而，這些尚未評估幼蟲中毒之後是否造成成蟲個體的傷害或行為異常，因此無法驟下亞致死劑量益達胺在幼蟲中毒層面上的影響程度是否造成蜂群健康的危機。

以餵食幼蟲不同濃度亞致死劑量益達胺的方式首度評估益達胺對幼蟲的封蓋、化蛹及羽化率以及羽化後工蜂的行為，結果顯示幼蟲對益達胺有較高的耐受性，且需直接餵食幼蟲益達胺 500 ppm 以上的劑量才能影響封蓋率、化蛹率及羽化率。低劑量益達胺雖然不會造成幼蟲死亡，但給予幼蟲 0.04 ng/larva (即濃度為 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 10 ppb，餵食四次) 以上的益達胺，羽化後的學習能力就明顯降低，顯示極有可能影響幼蟲神經細胞的發育，進而導致神經系統受損。假設這些學習能力已受損的蜜蜂外出採集時，可能因無法記憶採蜜位置與歸巢路線而不能順利回巢 (Yang et al., 2008; Yang et al., 2012)。

在生理層面上檢測到蜜蜂幼蟲取食到益達胺所產生的影響後，本實驗室進一步從分子層面進行探討，唯益達胺對蜜蜂基因表現的影響層面尚未釐清，因此利用次世代定序技術 (next generation sequencing, NGS) 檢測幼蟲期餵食亞致死劑量益達胺 (2 ng/larva) 後，基因組表現是否有所改變，結果發現餵食亞致死劑量益達胺造成 578 個基因表現有顯著改變，已知所影響的生理功能包括：解毒 (detoxication)、免疫 (immunity)、感覺神經 (sensory processing)、神經發育 (neuron development)、代謝 (metabolism) 及粒線體 (mitochondria) 等相關機制的基因 (Wu et al., 2017)。

在確認 2 ng 的劑量餵食蜜蜂幼蟲可影響成蟲基因表現後，本實驗室測試更

低劑量的益達胺，包括 0.004、0.04、與 0.2 ng 的益達胺餵食幼蟲後不同齡期蜜蜂基因表現改變狀況，發現第 9 日齡幼蟲與第 0 日齡成蟲所檢測到的差異性表現基因的數目隨著所餵食的益達胺濃度增加也增加，但是在第七日齡成蟲時，僅餵食 10 ppb 者檢測基因表現有顯著改變。我們隨後分析差異性表現基因所屬的功能群，結果顯示在蜜蜂幼蟲和成蟲所檢視到的差異性表現基因的功能分群有所差異。在表現量上升的群組中，幼蟲期餵食 50 ppb 的幼蟲所檢視到的 nucleic acid binding、GTP binding 等 9 組功能群組，在成蟲時期均沒有檢測到，而成蟲時期檢測到的 Metal-binding、RNA recognition motif domain、Ribosome、和 Ubiquitin mediated proteolysis 等 6 組功能群組在成蟲檢測到有差異性表現卻沒有在幼蟲樣本中發現，僅 Transmembrane helix、zinc ion binding、和 nucleus 等四群在幼蟲及成蟲均有檢測到差異性表現。在表現量下降的群組中（共 38 組），幼蟲和成蟲兩群之間所檢測到的差異性基因功能分群則較為相像，僅在幼蟲或成蟲檢視到有差異性表現的功能群組數量分別為 15 個與 13 個，有約 10 組功能群在幼蟲及成蟲均有檢視到差異性表現。初步分析顯示極低劑量 / 亞致死劑量益達胺雖然不會造成蜜蜂立即性的死亡，但是對蜜蜂不論幼蟲或是成蟲的基因轉錄、生理功能、免疫功能均造成深遠的影響，更可能進一步影響蜂群的穩定。本研究待整個時序性分析完成後將完整剖析益達胺對蜜蜂發育時期基因表現的影響。

參考文獻

- Almeida Rossi C, Roat T, Tavares D, Cintra-Socolowski P, Malaspina O. 2013. Brain morphophysiology of Africanized Bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. Arch Environ Contam Toxicol: 1-10.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry R, Faucon J-P, Ribière M. 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol 99: 348-350.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Colin ME, Fleche C, Bengsch ER. 2005. Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D, (eds). Environmental Chemistry Springer Berlin Heidelberg. pp 483-494.
- Brown M, J.F. and Paxton R, J. 2009. The conservation of bees: A global perspective. Apidologie 40: 410-416.
- Buckingham S, Lapied B, Corrionc H, Sattelle F. 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. J Exp Biol 200: 2685-2692.
- Decourtye A and Devillers J. 2010. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany S, (ed). Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors Springer New York. pp 85-95.

- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue M-H. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manage Sci* 59: 269-278.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delègue M-H. 2004. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 78: 83-92.
- Faucon J-P, Aurières C, Drajnudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel A-C, Zeggane S, Chauzat M-P, Aubert MFA. 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manage Sci* 61: 111-125.
- Goulson D, Nicholis E, Botias C, Rotheray E. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347:1255957.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP. 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 76: 183-191.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336: 348-350.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL. 2009a. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 1: 110-113.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I. 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol* 18: 55-60.
- Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB. 2005. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1442-1452.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. 2001. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 573-580.
- Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatin iA, Maini S. 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull Insectol* 56: 59-62.
- Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manage Sci* 57: 577-586.

- Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, Cesio MV, Heinzen H. 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int J Env Res Public Health* 8: 3844-3858.
- Peng YC and Yang EC. 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific Reports* 6, 19298; doi: 10.1038/srep19298.
- Pisa L, Goulson D, Yang EC, Gibbons D, Sánchez-Bayo F, Mitchell E, Aebi A, van der Sluijs J, MacQuarrie C, Giorio C, Long EY, McField E, Bijleveld van Lexmond M, Bonmatin JM. 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: Impacts on organisms and ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research* DOI: 10.1007/s11356-017-0341-3
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25: 345-353.
- Schmuck R. 1999. No causal relationship between Gaucho® seed dressing in sunflowers and the French bee syndrome. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52: 257–299.
- Schmuck R, Schöning R, Stork A, Schramel O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manage Science* 57: 225-238.
- Schneider CW, Tautz J, Grünwald B, Fuchs S. 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One* 7: e30023.
- Smith K, Loh E, Rostal M, Zambrana-Torrel C, Mendiola L, Daszak P. 2013. Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth* 10: 434-445.
- Stokstad E. 2007. The case of the empty hives. *Science* 316: 970-972.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* 20: 2482-2486.
- Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6: e14720.
- Wu MC, Chang YW, Lu KH, Yang EC. 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 88:12-20.

- Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS One* 7: e49472.
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101: 1743-1748.

The effects of sublethal dosage imidacloprid on honey bee gene expression during development

Yun-Ru Chen¹, David Tzeng², Chieh Ting¹, Pei-Shou Hsu³, Tzu-Hsien Wu³, Silin Zhong², and En-Cheng Yang¹

¹Department of Entomology, National Taiwan University

²School of Life Science, The Chinese University of Hong Kong

³Miaoli District Agricultural Research and Extension Station (Council of Agriculture, Executive Yuan)

ABSTRACT

The sublethal dosage of neonicotinoids residues and honey bee colony collapse phenomenon is believed tightly correlated. In this report, we investigated the sublethal dosage effect of imidacloprid at different development stages of honey bee. We fed honey bee larvae with 1 ppb, 10 ppb, and 50 ppb imidacloprid and examined the global gene expression profile at different development stages of honey bee. We found that global gene expression changes were observed at 9 days old larvae, 0 day old, and 7 days old adults, suggesting the effect is sustainable throughout the development stages. The number of differentially expression genes (DEGs) increased with the concentration of imidacloprid at 9 days old larvae 0 day old adults, yet, DEGs were only found in the honey bee fed with 10 ppb for the 7 days old adults. Moreover, the functions of the DEGs diverse between the larvae and the adults, suggesting the effects of imidacloprid change with the development of honey bee. The results of this study evidence that 10 ppb of imidacloprid can greatly affect honey bee individual homeostasis and may consequently reduce the stability of the honey bee colony.

Key words: *Apis mellifera*, sublethal dosage, imidacloprid, Differentially Expressed Genes (DEGs)

義蜂育王之實務分享

陳威年

台灣養蜂協會 副理事長

根據研究，蜂王的壽命可以長達 3-5 年。然而，隨著蜂王的年齡增長，其產卵能力與費洛蒙分泌都會逐漸降低，因此，實務上養蜂農民會適時的淘汰舊蜂王並培育年輕的新王取代之，一來年輕蜂王產卵能力強，費洛蒙高，可相對維持蜂群的強勢與健康；二來可增加蜂產品產量，提高經濟收益，因此，適時地育王與換王，在蜂群管理上極為重要。

育王的時機

在台灣，能夠量產的蜂蜜主要為荔枝蜜及龍眼蜜，這兩種蜂蜜可說是蜂農一年之中最重要的經濟來源，因此，蜂農無不竭盡所能地在荔枝與龍眼開花期前培育蜂群達到強勢，以便掌握一個多月的開花期中，獲取最大的產能。

普遍來說，台灣的蜂農每年都會更換新蜂王。筆者曾就教於蜜蜂學博士張世揚顧問，「一年當中以什麼季節更換蜂王最好？」張博士提示說，「雄蜂數量最多的時候」。

一般而言，秋天及春天這兩季是雄蜂數量最多的時候。依筆者所知，台灣大多數的蜂農會在秋天更換蜂王，另有一部份蜂農選擇在春季採蜜期更換蜂王。

選育新蜂王的原則

蜂王的優劣對於蜂群的群勢、健康以及生產力等，影響顯著。筆者承襲父執輩及養蜂先進的指導，多年來採取下列原則進行新蜂王的選育工作：

- 一、以連續觀察至少 6 個月以上，產卵能力及群勢都經常保持強勢的蜂群，作為培育新蜂王的來源種群。
- 二、選育新王的種群應確認健康狀況良好。曾經罹病或是蜂蟹蟎發生嚴重者，不宜作為選育新蜂王使用。
- 三、個別蜂場經 3-5 年的選育操作之後，宜適時的引進不同來源蜂場的優良蜂種，以避免過度的近親繁殖而造成蜂群的弱化。

育王移蟲的操作

育王移蟲是培育新蜂王過程中相當重要的一環。操作順利的話，自然可以培育出個體大、品質佳的處女王，增加育王的成功率。

操作實務上，首先要在育王框上以蜂蠟黏上王杯，並以毛筆點入一些新鮮的蜂王乳，之後從種群提取適合的子脾，移入一日齡幼蟲放入擬培育新王的蜂群中，同時，以隔王板將蜂王隔離，上方再覆蓋隔網，以避免蜂王進入咬除王台。

育王移蟲後第 11 日，即可介入王台。介入王台 3 日後，巡查新蜂王是否正常羽化？若未正常羽化或是個體太小，則須重新介入王台。

結語

影響育王是否成功的因素有很多，其中，以環境因素的影響最為關鍵。筆者認為，在對的時間，對的環境下進行育王，往往事半功倍。除此之外，透過人為的操作，也能提高育王成功率，例如，培育體型較大的處女王，育王成功率相對較高；蜜粉源充足的情況下，育王成功的機率也會提高。

多年的操作經驗顯示，要百分之百地育王成功，幾乎不可預期。因此，組織育王箱培育預備蜂王，以便在第一次育王失敗時，即時介入，為實務上不可或缺。

臺灣西方蜂病毒流行率調查與養蜂管理模式之探討

陳本翰*、徐培修

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

*通訊作者:陳本翰

電子郵件:Banhen@mdais.gov.tw

通訊地址:苗栗縣公館鄉館南村 261 號

摘要

蜜蜂病毒是臺灣西方蜂(*Apis mellifera*)重要的病害，目前無有效治療方式，因此蜂群管理是維護蜂群健康的關鍵。本研究在臺灣 39 個養蜂場共採集 63 件西方蜂樣本，分析蜂群健康樣態與病毒檢出率之關係，結果顯示異常蜂群 BQCV (Black queen cell virus)、AcSBV (*Apis cerana* Sacbrood virus)及 AmSBV (*Apis mellifera* Sacbrood virus)檢出率與正常蜂群相近，但異常蜂群 DWV (Deformed wing virus)與 KV (Kakugo virus)檢出率分別為 44%與 48%，正常蜂群 DWV 與 KV 檢出率僅為 2.6%與 10.5%，並且異常蜂群之 DWV 與 KV 合併感染約為 30.8%，正常蜂群僅有 2.7%，顯示 DWV 及 KV 感染是造成蜂群異常的重要原因。另調查周年蜂群換王次數、防治蜂蟹蟎次數與蜂糧餵飼等管理模式，結果顯示異常蜂群換王頻率與防治蜂蟹蟎頻率高於正常蜂群，但正常蜂群有 67.6%在夏季加強餵飼蜂糧，但異常蜂群僅 30.8%，推測加強供給營養的管理模式，可減少蜂群出現異常情形。

關鍵詞：西方蜂(*Apis mellifera*)、畸翅病毒(Deformed wing virus, DWV)、Kakugo virus(KV)、蜂糧(Bee bread)、蜂蟹蟎(*Varroa destructor*)

前言

全世界約有75%農作物生產仰賴昆蟲授粉，西方蜂(*Apis mellifera*)在農業生產體系是重要的授粉昆蟲，對全世界農業生產體系與自然生態系植物繁衍都扮演重要角色(Calderone, 2012)，亦是蜂產業生產蜂蜜與蜂王乳等產品的重要蜂種。

許多研究指出，影響蜜蜂健康的原因，可能包含農藥汙染、病毒傳播、微粒子病(Nosema disease)及蜂蟹蟎(*Varroa destructor*)寄生等因素相互影響，非單一因素造成(van Engelsdorp *et al.*, 2008；Goulson *et al.*, 2015)。研究發生蜂群崩解症的蜂群，發現以色列麻痺病毒(Israel acute paralysis virus, IAPV)、急性麻痺病病毒(Acute bee paralysis virus, ABPV)與畸翅病毒(Deformed wing virus, DWV)等病原，具有較高的病毒RNA增殖量與流行率，顯示病毒感染是威脅蜂群健康的重要因子(Johnson *et al.*, 2009)。

在法國、義大利、中國大陸與阿根廷的研究，西方蜂普遍受到DWV、ABPV與黑王台病毒(Black queen cell virus, BQCV)等多種蜜蜂病毒潛伏感染(Tentcheva *et al.*, 2004；Porrini *et al.*, 2016；Ding *et al.*, 2016)。蜜蜂病毒可能透過蜂群交食行為在蜂群間水平傳播，潛伏感染時不易有明顯癥狀，當外在環境變化，或蜜粉源缺乏季節，病毒由潛伏期轉變為大量增殖，導致病害發生(Tentcheva *et al.*, 2004)。依據盧等人(2010)的研究指出，臺灣西方蜂在幼蟲期、蛹期與成蜂各發育階段，受到DWV、BQCV與KV(Kakugo virus)等多種蜜蜂病毒潛伏感染，平均感染率以12月為最高達94.4%，並且一隻蜂感染2種以上病毒之多重感染現象普遍存在。本研究為探討蜜蜂病毒流行率對蜂群健康的影響，調查蜂群健康樣態，並分析蜂農管理模式與病毒檢出率的差異，藉以提供蜂群管理策略的基礎。

材料與方法

一、樣本收集

本研究於2017年1月至2018年3月間，在臺灣北、中、南各地區39個養蜂場共採集63件西方蜂樣本。採集工蜂為樣本以活體或以冷凍-15℃運送回實驗室，以PCR(Polymerase chain reaction)進行DWV、KV、AmSBV (*Apis mellifera* Sacbrood virus)、AcSBV (*A. cerana* Sacbrood virus)與BQCV等病毒基因片段檢驗。

二、蜂群健康樣態調查

調查臺灣各地區養蜂場，檢查蜂群健康樣態。如發現巢脾有幼蟲期哺育不良；褐化的死亡幼蟲；蛹體死亡，工蜂咬破封蓋房；巢房口有工蜂出現顫抖、爬行、死亡或畸形翅等癥狀為異常蜂群。如無上述癥狀，群勢發展正常為正常蜂群。

三、蜂農管理模式調查

為調查蜂農管理模式對蜂群健康的影響，在臺灣各地養蜂場，調查蜂群健康樣態並採集樣本，並調查蜂農每年更換蜂王次數及每年蜂蟹蟎防治次數。臺灣蜂農在冬天與初春季節會加強蜂群餵飼管理，使蜂群在冬天能維持群勢，並在採蜜季節之前擴增蜂群，增加採蜜量。本研究另調查蜂農夏季管理是否增加餵飼蜂糧，綜合調查結果再與蜂群健康樣態進行交叉分析。

四、RT-PCR增幅病毒基因片段

解剖蜜蜂樣本取頭部組織，採用 GE Healthcare illustra™之 RNA 萃取套組萃取病毒 RNA 樣本，萃取方法如廠商說明書，完成萃取的病毒 RNA 樣本保存於-20℃備用。病毒 RNA 採用 Invitrogen SuperScript™ III 反轉錄套組進行製備病毒之 cDNA，製備方法如廠商說明書，製備完成的病毒 cDNA 樣本保存於-20℃備用。

取病毒 cDNA 樣本，進行 PCR 分析，PCR 係採用 Protech Technology Enterprise CO., Ltd. All-in-One PCR Mix 套組進行，方法詳如廠商說明書。本調查所使用蜜蜂病毒引子序列如表一。蜜蜂肌動蛋白(β -actin)基因片段為內部對照組。PCR 反應條件為 94℃，3 分鐘，94℃，30 秒；55℃，30 秒；72℃，30 秒共 35 個循環；最後 72℃，5 分鐘 1 循環。將 PCR 產物取 10 μ l 以 1.5%瓊脂膠體進行電泳分析，並在 UV 312 nm 照射下進行片段大小分析。

結果與討論

在臺灣39個養蜂場，分析異常蜂群26個樣本與正常蜂群37個樣本蜜蜂病毒流行率，異常蜂群有56%感染2種以上病毒，正常蜂群為25.6%（圖一A），顯示多重病毒感染是造成蜂群出現異常癥狀的重要原因。異常蜂群BQCV、AcSBV與AmSBV檢出率分別為60%、33.3%與8%，與正常蜂群BQCV 52.6%、AcSBV 30.8%與AmSBV 7.9%檢出率相近，但異常蜂群DWV與KV檢出率分別為44%與48%，高於正常蜂群DWV 2.6%與KV 10.5%（圖一B），推測DWV與KV是造成蜂群異常的關鍵。蜂群潛伏感染DWV時無明顯癥狀，當蜂群受到蜂蟹蟎寄生率增加、蜜粉源缺乏導致營養不足等壓力因子，可能使DWV病毒量在蛹期大量增加，造成羽化工蜂畸形翅、個體較小等癥狀，工蜂失去正常飛行能力，導致蜂群逐漸衰弱(de Miranda and Genersch, 2010；Tantillo *et al.*, 2015)。西方蜂感染KV後，在工蜂頭部神經組織、下咽頭腺和脂肪體偵測到大量病毒，KV病毒量在工蜂頭部神經組織大量增加，可能與工蜂攻擊行為增加有關，但不會造成羽化工蜂畸形翅癥狀(Fujiyuki *et al.*, 2009；Tantillo *et al.*, 2015)。

進一步分析蜂群異常是否由病毒複合感染所造成，異常蜂群單一感染DWV或KV，檢出率為3.9%比正常蜂群未檢出略高，而分析異常蜂群病毒複合感染情形，DWV或KV合併感染其他病毒之複合感染率，結果均高於正常蜂群，其中DWV與KV合併感染檢出率約為30.8%，比正常蜂群複合感染率2.7%高出約11倍（圖一C）。而正常蜂群BQCV或SBV單一感染率或複合感染率，均高於異常蜂群率，此外有24.3%正常蜂群與11.5%異常蜂群未檢出病毒（圖一D）。推測除了病毒感染，可能感染微粒子或其他病原感染造成蜂群異常。由病毒感染型態推測，DWV與KV合併感染西方蜂或單一感染DWV或KV，都可能是造成蜂群異常的原因。

蜂王或雄蜂帶原DWV，可垂直傳播病毒到次代蜂群(de Miranda and Genersch, 2010)，因此選用未得病的蜂群來培育處女蜂王，可減少病毒傳播，增加蜂群抵抗力（吳及吳等, 2000）。蜂蟹蟎是西方蜂體外寄生蟎，吸食蜜蜂體液同時也傳播DWV、SBV等病毒，因此降低蜂蟹蟎在蜂群的寄生率，可減少蜜蜂病毒的傳播(Rosenkranz *et al.*, 2010)。因此假設蜂蟹蟎防治次數或每年蜂王更新次數，或許會影響病毒疾病的發生。蜂蟹蟎之防治方法是以福化利(tau-fluvaliate)連續處理3週為1次防治週期，調查發現正常蜂群約有81.1%每年防治1-2次，18.9%則防治3-4次，而出現異常蜂群的蜂場約有65.4%每年防治1-2次，34.6%防治3-4次（圖二A）。此外正常蜂群約78.4%每年更換蜂王1次（圖二B），21.6%換王2-3次，異常蜂群有57.7%每年換王1次，34.6%換王2-3次。結果顯示防治蜂蟹蟎次數與周年更換蜂王次數，與蜂群是否出現異常現象無明顯相關性，推測蜂群如有較優良的抗病力或抗蜂蟹蟎能力，蜂農在蜂群正常情況下，無需增加換王或防治蜂蟹蟎次數。

本研究另分析蜂群餵飼管理模式與蜂群健康樣態，正常蜂群約有67.6%的樣本在夏季增加蜂糧餵飼，而出現異常現象的蜂群，僅有30.8%的樣本在夏季有餵食蜂糧習慣，顯示在增加蜂糧餵飼的管理模式下，可能減少蜂群出現異常情形。進一步了解蜂農夏季餵飼蜂糧是為生產蜂王漿，蜂王漿生產需提供蜂群充足蛋白質來源，選擇蜜粉源充足場域放蜂，並獎勵餵飼糖漿或人工蜂糧可提高產量(陳及陳, 2002；吳及吳等, 2000)。在Tritschler等人(2017)所發表的研究，以花粉飼育西方蜂，發現DWV病毒量較無花粉組別低。推測為增加蜂王漿產量，蜂農所進行的獎勵餵飼，提供蜂群充足營養，因而降低蜂群出現異常情形。

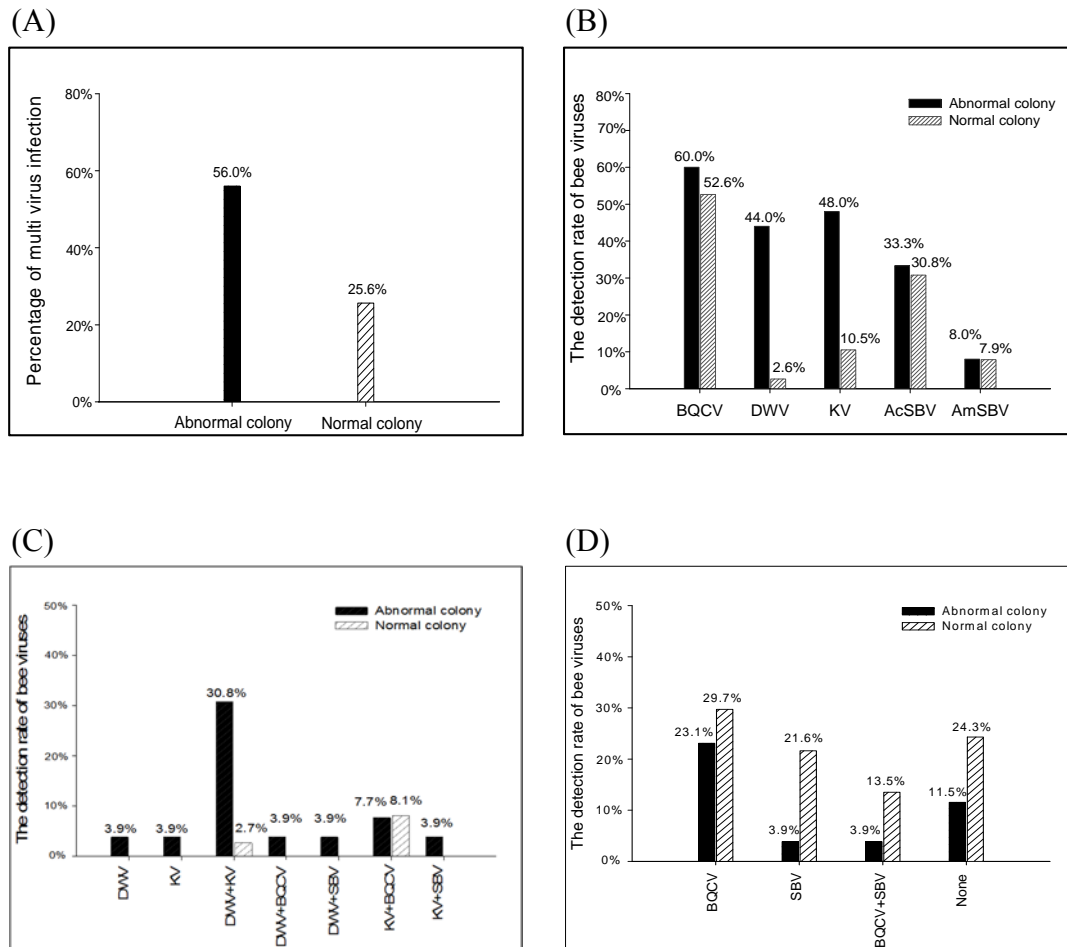
本研究調查臺灣西方蜂各地區之病毒流行率，並分析病毒潛伏樣態對蜂群健康之影響，結果顯示DWV與KV共同感染可能是威脅蜜蜂健康的重要因子。目前蜜蜂病毒病無有效治療方法，從本研究調查結果推測，除平時注重蜂蟹蟎防治減低DWV與KV之感染外，仍難以避免的病毒潛伏感染，若加強營養供給的管理模

式，可減少蜂群出現病癥，維持蜂群正常生產狀態，發現潛伏感染病群應適時汰換蜂群，以免整場感染影響正常生產。

表一 引子序列

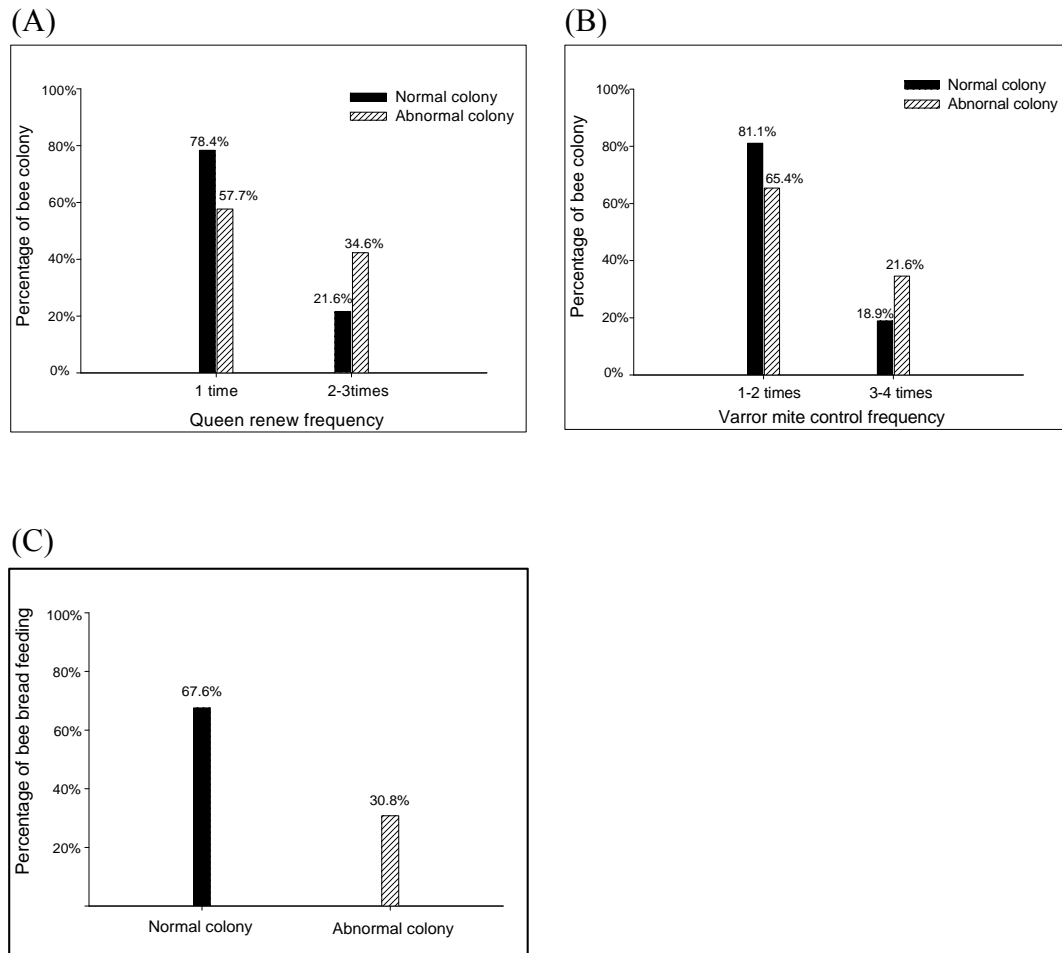
Table 1. Primers used in this study. F: forward, R: reverse.

引子	序列 (5'-3')	參考文獻
Black Queen Cell Virus	F TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC	Benjeddou <i>et al.</i> (2001)
	R GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	
Deformed Wing Virus	F GGATGTTATCTCTTGCGTGGA	Lanzi <i>et al.</i> (2006)
	R CGATAATAATTCGAACGCTGA	
Kakugo Virus	F GGACTGAACCAAATCCGATGTCATCACG	Fujiyuki <i>et al.</i> (2009)
	R TCTCAAGTTCGGGACGCATTC	
<i>Apis mellifera</i> Sacbrood Virus	F GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT	Chen <i>et al.</i> (2004)
	R TCATCATCTTCACCATCCGA	
<i>Apis cerana</i> Sacbrood Virus	F TCGTTTCTAATGCGTTTCACACTG	Ma <i>et al.</i> (2011)
	R CCTCGCATATACACCAAAACCTCT	
β -actin	F TCCTCAAGCTTGGAAAAGAG	Chen <i>et al.</i> (2006)
	R GGTGGACAAAGAAGCAAGAA	



圖一、臺灣西方蜂正常蜂群與異常蜂群之病毒檢出率比較。(A)病毒複合感染率。(B)異常蜂群與正常蜂群之病毒檢出率。(C)異常蜂群與正常蜂群 DWV 與 KV 病毒檢出率。(D)異常蜂群與正常蜂群 BQCV 與 SBV 病毒檢出率。

Fig 1. Profiling of bee virus detection rate within normal and abnormal colonies. (A) The multi viruses infection rate in bee colonies. (B) Comparison bee virus detection rate within normal and abnormal colonies. (C) Comparison DWV and KV detection rate within normal and abnormal colonies. (D) Comparison BQCV and SBV detection rate within normal and abnormal colonies.



圖二、臺灣蜂場西方蜂群管理模式比較。(A)正常蜂群與異常蜂群周年防治蜂蟹蟎次數比較。(B)正常蜂群與異常蜂群每年更換蜂王次數比較。(C)正常蜂群與異常蜂群夏季餵食蜂糧比較。

Fig 2. Comparison with different beekeeping modes in normal and abnormal colonies. (A) Comparison with varroa mite control frequency yearly in normal and abnormal colonies. (B) Comparison with queen renew frequency yearly in normal and abnormal colonies. (C) Comparison with beebread feeding in summer in normal and abnormal colonies.

引用文獻

- 吳登楨及吳輝虎。2000。實用養蜂。行政院農業委員會苗栗區農業改良場。
- 陳吉同及陳保良。2002。蜂王漿生產效率之研究。台灣昆蟲特刊，4: p.93-106。
- 盧美君、吳輝虎、侯鳳舞。2010。台灣地區蜜蜂病毒監測。農政與農情，217: 56-58。
- Benjeddou M., N. Leat, M. Allsopp and S. Davison. 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honey bees by reverse transcriptase PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2384-2387.
- Calderone, N. W. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period1992–2009. PloS One 7:e37235.
- Chen Y. P., J. Hammond, H-T. Hsu, J. Evans and M. F. Feldlauer. 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. J. Invertebr. Pathol. 87:84-93.
- Chen Y. P., J. S. Pettis, A. Collins, and M. F. Feldlauer. 2006. Prevalence and transmission of honeybee Viruses. Appl. Environ. Microbiol. 72: 606–611.
- de Miranda J. R and E. Genersch. 2010. Deformed wing virus. J. Invertebr. Pathol. 103:48–61.
- Ding G., N. Fondevila, M.A. Palacio, J. Merke, A. Martinez, B. Camacho, A. Aignasse, E. Figini, G. Rodriguez, L. Lv, Z. Liu and W. Shi. 2016. Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 35: 825-833.
- Fujiyuki T., E. Matsuzaka, T. Nakaoka, H. Takeuchi, A. Wakamoto, S. Ohka, K. Sekimizu, A. Nomoto and T. Kubo. 2009. Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. J Virol. 83:11560-11568.
- Goulson D., E. Nicholls, C. Botías and EL. Rotheray. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 347: 1255957.
- Lanzi G., J. R. de Miranda, M. B. Boniotti, C. E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S. M. Camazine and C. Ross. 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). J. Virol. 80:4998-5009.
- Johnson R.M., J.D. Evans, G.E. Robinson and M.R. Berenbaum. 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). P Natl. Acad. Sci. Usa. 106: 14790–14795.
- Ma M., C. Ma, M. Li., S. Wang, S. Yang and S. Wang. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. J. Virol. Methods. 176:115-119

- Porrini C., F. Mutinelli, L. Bortolotti, A. Granato, L. Laurenson, K. Roberts, A. Gallina, N. Silvester, P. Medrzycki, T. Renzi, F. Sgolastra and M. Lodesani. 2016. The status of honey bee health in Italy: Results from the nationwide bee monitoring network. PLoS ONE 11:e0155411.
- Rosenkranz P., P. Aumeier and B. Ziegelmann. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Virol. 103:S96-S119.
- Tentcheva D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin and M. Bergoin. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. Appl. Environ. Microbiol. 70:7185–7191.
- Tantillo G., M. Bottaro, A. D. Pinto, V. Martella, P. D. Pinto and V. Terio. 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. Ital. J. Food Saf. 4:157-168.
- Tritschler M., J. J. Vollmann, O. Yañez, N. Chejanovsky, K. Crailsheim and P. Neumann. 2017. Protein nutrition governs within host race of honey bee pathogens. Sci. Rep. 7:14988.
- van Engelsdorp D., J. Hayes Jr., R. M. Underwood and J. Pettis. 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. PLoS ONE 3: e4071.

應用無人航空載具追蹤蜜源植物

呂明倫¹、黃靜宜¹、宋一鑫²

¹特有生物研究保育中心 55244 南投縣集集鎮民生東路 1 號

²國立嘉義大學植物醫學系 60004 嘉義市學府路 300 號

摘要

臺灣的蜜源植物資源豐富是蜜蜂的重要糧食，因此，瞭解植物花期的特徵及花的豐富度，將有助於養蜂業者在蜂群上的管理。本文以荔枝為例，藉由無人航空載具(unmanned aerial vehicle, UAV)與遙測技術進行花期的追蹤，研究結果顯示，UAV所獲取的高品質影像，可即時監測植物的流蜜期，並解析開花特徵，進一步經由遙測分析技術，更能產製花的豐富度與分布資訊，有利蜂農決定蜂箱擺設的最佳時機與最適地點，俾利增進相關蜂產品的產值。建議未來應多善用UAV技術，發揮其機動性佳與高解析影像之特點，同時也能節省許多生態調查所需的人、物力及成本，掌握更多蜜源植物資源，為生態保育與產業發展共創雙贏。

前言

臺灣地理位置特殊，氣候與地形詭譎多變，不僅集合了寒、溫及熱帶等植物相，並孕育出繁多的植物種類，其中廣受人們喜愛的開花植物為人類創造許多生態系服務價值，如觀賞、食材、藥用或原料等。提到花往往少不了蜜蜂的陪襯，許多開花植物均含有豐富的花蜜，是蜜蜂的重要食物來源，當蜜蜂外出採集花蜜時，會先暫存於第二個胃中，帶回蜂巢後待含水量降低，花蜜中的主成份蔗糖則會轉變為葡萄糖和果糖等單糖類，即所謂的蜂蜜，可供蜂群食用，或者藉由蜂蠟貯存下來，幫助渡過缺蜜期和越冬季節。長久下來，蜂蜜也被人類有效開發與利用，造就了養蜂業的蓬勃發展，因此，植物花況的好壞，不僅影響著本身植株的發育，也關係著蜜蜂族群的維持，以及蜂農的收入。

2016~2017 年冬季，臺灣明顯出現暖冬現象，打亂兩種主要蜜源植物「龍眼與荔枝」之花期，且又於流蜜期出現間歇性大雨，蜜蜂面臨無花可採的窘境，使國產蜂蜜大幅減少，臺灣養蜂協會更表示該年為「50 年來最慘的一次」。由此可知，為確保蜂蜜產量的穩定性，預先掌握花況的空間資訊，將有利蜂農釐清最佳採蜜時機，以及決定蜂箱的擺設位置。有鑑於此，本文應用無人航空載具 (unmanned aerial vehicle, UAV) 技術建立監測模式，進行蜜源植物的花期追蹤，期望研究成果可提供生物多樣性保育與產業永續發展推動之參考。

UAV 之特性

UAV 顧名思義是指沒有飛行員於載具上操控，使用者可藉由地面遙控或機器自動拍攝取得地物資訊，依據飛行的方式，一般可區分為定翼型與旋翼型兩類，其中定翼型較像是常見的飛機樣式，機身兩側有一對固定機身的主翼，飛行方式最符合空氣動力學；旋翼型則近似直昇機，按旋翼數量的多寡又分為單旋翼與多旋翼機，兩種型態的 UAV 各具有特色與優缺點，如定翼型滑翔能力強，具有耗能小、航程距離長等優勢，但卻不能滯留於空中，須不斷地前進；旋翼型可直接垂直升降，並固定於空中，適合作定點的監測，缺點是需要相當大的電容量供應。一組完整的 UAV 裝置必須搭載具有攝影或測量功能之儀器，如照相機、攝影機、熱像儀及光譜儀等，用來取得照片、影像、熱輻射、光譜訊號等等所需要的資訊。

相較於傳統的大型飛行載具，UAV 具多項優勢：一、一般多在雲層下方執行低空航攝任務，當天候狀況惡劣時較不受影響；二、由於裝備簡單，體積小且攜帶方便，僅需要大略瞭解環境概況，必要時須事先申請好空域，便可在許可期間內自由起降；三、進行具高度風險區域之探勘任務時，可兼顧降低不必要的人員冒險，同時取得完整的資訊，尤其應用於救災、救難工作可望大幅提升安全性及成功率；四、使用 UAV 執行任務的成本逐年降低，且與以往航測常使用的有人

飛機設備相比，僅能說是九牛一毛；五、由於 UAV 的低空航攝優勢，搭配高畫質的數位相機，所取得的照片影像可獲得非常高的地面解析度(約 2~5 cm 左右)。

UAV 之應用

荔枝屬亞熱帶常綠果樹，樹高可達 20 公尺左右，花為雌雄同株，圓錐花序頂生或腋生，顏色為白色偏黃，開花時期並沒有明顯的花瓣，但花穗數量頗多，會覆蓋整個植株表面(圖 1)，此特徵有助於從空拍影像判讀，因此，作者於南投縣草屯鎮平林里，選擇一片種有大量荔枝的農地作為試驗區(約 65 公頃)，針對流蜜期(2018 年 3 月~4 月間)進行 UAV 航拍作業，藉此全盤瞭解花期的特徵。



圖 1、荔枝於盛花期時，花會覆蓋整個植株表面

本文所採用之 UAV 為 DJI Inspire 2 旋翼機，搭配 Zenmuse X5S 航拍雲台相機(圖 2)，影像拍攝重疊率達到前後 80%、左右 70%以上，整個試驗區共可規劃 21 條航帶(圖 3)，飛行速度保持在 15 m/s 左右，高度設定 70 m。利用 UAV 獲取影像後，參考試驗地既有之相關高解析力影像圖資(航空照片、高解析衛星影像)，選取不易改變且明顯之地物，如房屋角隅、道路交會點或地形特殊點，做為地面控制點，先於數位影像上量測各點影像座標，再攜高精度之全球定位系統(global positioning system, GPS)儀器至各點測量記錄其 TM 二度分帶座標值，此等地面控制點可視實際需要，部分做為控制點，部分做為檢核點。另於像對重疊處選擇若干點，量測其影像座標，做為連接點(tie point)。地面控制點設定完畢後，再藉

由 Pix4Dmapper 軟體進行影像匹配與自動化產製程序，最終產製地面解析度 2 cm 之空拍影像。



圖 2、本研究所採用之 UAV 設備(DJI Inspire 2 搭配 Zenmuse X5S 相機)



圖 3、試驗區位置及航線規劃

由 UAV 影像中發現，3 月 5 日初花期(圖 4)，尚無法明顯看出荔枝的花況，進入為期近兩個月之盛花期，影像上明顯出現高密度的花覆蓋其中(3 月 21 日，圖 5)，並與周邊的果樹呈現明顯的差異，直至末花期，花逐漸凋萎，整體影像又回覆以綠葉為主的植被特徵(4 月 30 日，圖 6)，由以上觀察可知，該地 3 月底至 4 月中為荔枝的黃金流蜜期，是蜂農擺設蜂箱的最佳時機。



圖 4、荔枝的初花期(2018 年 3 月 5 日)，UAV 影像上花況尚不明顯。

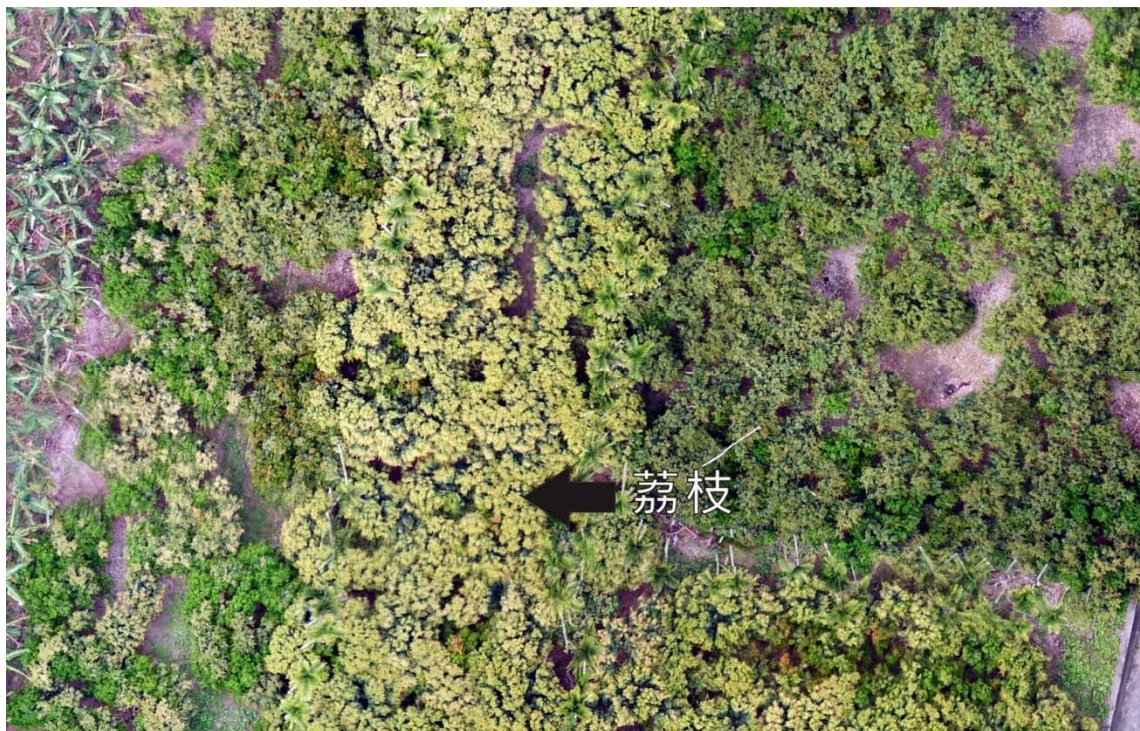


圖 5、荔枝的盛花期(2018 年 3 月 21 日)，UAV 影像上花覆蓋明顯。



圖 6、荔枝的末花期(2018 年 4 月 30 日)，UAV 影像回覆綠葉為主的植被特徵。

影像分類是一種須借助電腦處理資訊的方法，即透過數學及統計的運算，重新歸類數位影像上的重要特徵，如森林、草原、道路、建物...等等，經過分類後的影像可將原本複雜的資訊，轉化為簡單瞭解且具有實質意義的主題圖，因此，藉由 UAV 獲取的空拍影像可進一步透過該技術，瞭解蜜源植物的花況資訊。針對 3 月 21 日盛花期的影像，透過影像分類技術可快速繪製荔枝的花覆蓋範圍(圖 7)，花的密度愈高處，代表該處的蜜源愈豐富，蜂農即可在附近選擇適合擺設蜂箱的位置，以提升蜂蜜的收穫量。



圖 7、影像分類技術可快速繪製荔枝的花覆蓋範圍(橘色區域)。

未來展望

本文應用 UAV 追蹤蜜源植物之花期，可有效率地獲取高品質影像，有利即時掌握花期特徵，對於蜂農來說，有助於蜂群的管理，增加蜂蜜的收穫，而蜜蜂亦可維持其族群量，另一方面，植物因受惠於蜜蜂的授粉，可生產更多高質量的果實，實為動物、植物與產業等多方得利之道。臺灣的蜜源植物種類雖多樣，但因土地面積有限，加上工業發展與環境變遷，蜂農長期面臨蜜源短缺的困窘，為此，行政院農業委員會林業試驗所近年積極推廣林地養蜂策略，有望開闢新的契機，然而，森林面積廣闊，發展林地養蜂前提，仍有許多基礎資料尚未完備，如林地蜜源植物的種類、花況、物候、分布與面積等資訊。就這些生態屬性的調查工作，筆者認為 UAV 確為一種可依賴的重要利器，建議未來應多善用 UAV 技術，發揮其機動性佳與高品質影像之特點，俾利掌握以往傳統作業不易獲得之資訊，同時也能節省許多生態調查所需的人、物力及成本。

東方蜂囊狀幼蟲病毒對西洋蜂幼蟲影響評估

張紫婷、乃育昕、陳裕文*

國立宜蘭大學生物技術與動物科學系

*通訊作者：陳裕文

電子郵件：chenyw@niu.edu.tw

通訊地址：宜蘭縣宜蘭市神農路一段一號

摘要

蜜蜂囊狀幼蟲病毒(Sacbrood virus, SBV)是單股正鏈的 RNA 病毒，屬於傳染性軟化症病毒科(Iflaviridae)之病毒(Bailey et al., 1964; Baker and Schroeder, 2008; Chen et al., 2006; Zhang et al., 2001)，罹患此病之幼蟲無法化蛹，死亡的蟲體會形成一堅韌的小囊袋，故名為囊狀幼蟲病。雖然台灣過去並無關於 SBV 的流行，但在 2016 年的報告中發現 SBV 已在台灣中部流行。2017 年追蹤檢測各季節台灣 SBV 流行度，發現有 SBV 感染徵狀的蜂場各地流行率有所差異，此病毒正逐漸擴散且整體感染率也逐漸上升(Nai et al., 2018)。SBV 在東方蜂(*Apis cerana*)與西洋蜂 (*A. mellifera*)兩種蜜蜂身上皆有感染現象，在台灣主要飼養蜂種為西洋蜂，然也有部分蜂農在同一蜂場混養東方蜂與西洋蜂，這可能造成病毒交互感染的情形，此外，與野生蜂群接觸亦是可能造成東方蜂囊狀幼蟲病毒感染西洋蜂的原因，本實驗評估東方蜂囊狀幼蟲病毒對西洋蜂幼蟲之影響，幼蟲於感染後第 4 天(約七日齡)時開始出現排便蟲隻，不經感染的對照組及感染 AcSBV 組的平均幼蟲排便率於感染後的第 8 天分別來到 71.7%及 80.0%，兩組之間並無顯著差異($P>0.05$)；羽化率於感染後第 21 天分別來到 60.0%及 58.3%，兩組之間並無顯著差異($P>0.05$)；比較死亡率，感染後第 14 天的平均幼蟲死亡率為 36.7%及 28.3%，以 KM 系統分析作圖，顯示兩組間並無顯著差異。初步實驗可知西洋蜂幼蟲感染東方蜂囊狀幼蟲病毒並不會出現明顯的蜂損，未來可將實驗方向放在幼蟲體內的病毒複製情況、跟同蜂場東方蜂群是否產生交互作用等，繼而釐清西洋蜂蜂群在 AcSBV 的傳播過程所扮演的角色。

關鍵詞：東方蜂囊狀幼蟲病、東方蜂、西洋蜂