

# 臺灣西方蜜蜂潛伏感染蜜蜂病毒區域性調查分析

陳本翰\*、徐培修

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

## 摘 要

本研究為調查臺灣蜜蜂病毒區域性分佈及探討蜂群感染病毒是否造成蜂群異常，共分析81件西方蜂樣本。蜜蜂病毒檢出率調查結果分別為黑王台病毒(BQCV) 53.2%、畸翅病毒(DWV) 24.1%、Kakugo virus(KV) 20.2%、東方蜂囊狀幼蟲病病毒(AcSBV) 32.1%、西洋蜂囊雛病病毒AmSBV 6.3%。區域分析顯示，臺灣北、中、南各地區BQCV流行率相近，約為48%-55.6%，DWV與KV在北部地區檢出率達44%與32%為最高，AcSBV在中部地區檢出率50%為最高，AmSBV僅在中部與南部地區發現，檢出率為11.1%。分析病毒檢出率與蜂群健康樣態關係，BQCV、AcSBV及AmSBV在異常蜂群與正常蜂群檢出率相近，異常蜂群DWV與KV檢出率分別為44%與48%，正常蜂群DWV與KV檢出率分別為2.6%與10.5%，且出現異常蜂群之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。另在正常蜂群有67.6%在夏季加強餵飼蜂糧，但異常蜂群加強餵食僅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：蜜蜂病毒、黑王台病毒、畸翅病毒、Kakugo virus、東方蜂囊狀幼蟲病病毒、蜜蜂囊雛病毒

## 前 言

蜜蜂是重要的授粉昆蟲，對全世界農業生產體系與自然生態系植被相都扮演重要角色(Calderone, 2012)。全世界有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，自2006年美國與歐洲等地區發現蜂群崩解症(colony collapse disorder,

CCD)，大量的外勤蜂消失，巢內僅存蜂王與少量內勤蜂，蜂群逐漸瓦解的現象，引起糧食生產的疑慮(Klein *et al.*, 2007；van Engelsdorp *et al.*, 2008)。許多研究指出，造成蜂群崩解症候群的原因，可能包含農藥汙染、病毒傳播、微粒子病及蜂蟹蟻寄生等因素相互影響，非單一因素造成(van Engelsdorp *et*

\*論文聯繫人

Email: BanHen@mdais.gov.tw

al.,2008 ; Goulson *et al.*,2015)。檢測發生蜂群崩解症的蜂群與健康蜂群，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，在蜂群崩解症的蜂群有較高的病毒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)。

目前從西方蜂上分離出24種病毒，以昆蟲小RNA病毒 (insect picorna-like virus)危害最嚴重。昆蟲小RNA病毒形態上直徑約為30nm，結構為20面體，具有單鍊正股核醣核酸 (de Miranda *et al.*, 2013)。病毒分類上，畸翅病毒 (deformed wing virus, DWV)、蜜蜂囊雛病毒 (*Apis mellifera* Sacbrood virus, AmSBV)、Kakugo virus(KV)、及東方蜂囊狀幼蟲病毒 (*Apis cerana* Sacbrood virus, AcSBV)屬於Iflaviridae科；急性麻痺病病毒 (acute bee paralysis virus, ABPV)、黑王台病毒 (black queen cell virus, BQCV)、喀什米爾病毒 (Kashmir bee virus, KBV)與以色列麻痺病毒屬於Dicistroviridae科 (de Miranda *et al.*, 2013)。慢性麻痺病病毒 (chronic bee paralysis virus, CBPV)型態上為不等軸結構，分類上暫未明確分科 (Mayo, M. A. 2002)。

蜜蜂病毒可能透過蜂群交哺現象 (trophallaxis)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)。在法國、義大

利、中國大陸與阿根廷的調查，西方蜂受到DWV、BQCV、ABPV等多種蜜蜂病毒潛伏感染 (Tentcheva *et al.*, 2004 ; Porrini *et al.*, 2016 ; Ding *et al.*, 2016 )。許多研究指出蜜蜂病毒流行率與環境有關，Ding等人(2016)調查中國大陸蜜蜂病毒，屬於溫帶氣候的新疆地區西方蜂病毒流行率分別為DWV 50%、SBV 70%與ABPV 70%，屬於亞熱帶氣候的福建分別為DWV 89%、SBV 89%而ABPV則無發生。Porrini等人亦指出，西方蜂DWV、SBV與ABPV等病毒，在義大利南部有較高的流行率。

臺灣位於亞熱帶地區，嘉義北回歸線以南地區較接近熱帶氣候，日照充足，冬天及夏天溫差比其他地區小，而盧等人(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、KV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%。本研究在臺灣北、中、南各地區的調查西方蜂，分析各地區蜜蜂病毒感染率，並探討病毒感染對蜂群健康的影響，以及比較蜂農管理模式與蜂群健康的差異，藉以提供蜂群管理策略的基礎。

## 材料及方法

### 一、樣本收集

本研究於2017年1月至2018年3月間每月採集西方蜂工蜂樣本，共81件。採集樣區劃分為北、中、南三區，南部為臺灣嘉義以南；中部為雲林以北至臺中含南投；北部為苗栗以北至宜蘭，各區分別採集27件樣本，採樣地點與時間詳

原因，是否有其他病原對蜂群健康的影響，仍須進一步探討。

過去病毒基因序列的研究指出，KV與DWV親緣關係相近(Bere'nyi *et al.*, 2007)，本試驗調查結果KV與DWV的區域性流行率相似，在北部地區KV與DWV檢出率分別為32%與44%，南部地區檢出率為3.7%（表二），北部地區KV與DWV檢出率比南部地區高出約8-10倍。

有研究指出，在冬天低溫環境下，蜜蜂*defencin-1*、*PPO*等免疫基因表現降低，並有DWV病毒量增加的現象(Steinmann *et al.*, 2015)。依中央氣象局氣候統計資料，2017年夏季6至8月份均溫約為27.1°C，秋季9-11月均溫約為24.2°C，冬季12月至翌年2月均溫降為15.9°C。本研究於2017年6至8月份採集樣本未檢出DWV，9-11月檢出12%，12月至翌年2月檢出率達50%（資料未呈現）。此外依2017年中央氣象局統計資料，南部嘉義以南至屏東，年均溫約25.4°C，冬季最冷月均溫約為19.6°C，降雨日數約為4天；北部苗栗以北至基隆，年均溫約22.1°C，冬季最冷月均溫約為15.7°C，降雨日數為11天，而表三南部DWV檢出率為3.7%北部則為40.7%。顯示出在低溫的季節與地區，DWV檢出率有逐漸增加的現象，與Steinmann等人提出低溫環境造成DWV病毒量增加相符，並推測北部地區KV流行率高於南部地區，可能亦受低溫影響。

東方蜂囊狀幼蟲病是近年臺灣東方蜂(*A. cerana*)主要發生病害，是由AcSBV(*Apis cerana* Sacbrood Virus)引起，染病蜂群病徵為大量幼蟲死亡，導

致族群衰退，臺灣AcSBV病毒株VP1基因序列與中國大陸CSBV-FZ、CSBV-JL病毒株親緣性相近，序列相似度達96.9%以上(Huang *et al.*, 2017；Nai *et al.*, 2018)。臺灣過去調查囊狀幼蟲病流行趨勢顯示，北部東方蜂之囊狀幼蟲病檢出率最高達91.3%，中部與南部地區分別為57.9%與47.6%，東部為22.2%，並發現臺灣西方蜂有帶原AcSBV的現象。本研究西方蜂AcSBV檢出率，以中部地區檢出率50%為最高；北部與南部地區分別為22%與25.9%（表三），全臺西方蜂樣本檢出率為32.1%。Gong等人(2016)曾以AcSBV接種西方蜂與東方蜂幼蟲，病毒對西方蜂幼蟲沒有明顯致病性，但東方蜂幼蟲接種病毒24小時後大量死亡；此外西方蜂工蜂接種後，有病毒量增加的現象，顯示西方蜂可為AcSBV保毒宿主。本研究調查異常蜂群AcSBV檢出率為33.3%，與正常蜂群檢出30.8%相近（圖三B），顯示蜂群中容易感染AcSBV，現有調查資料及相關文獻顯示臺灣東方蜂與西方蜂均會帶原AcSBV，應避免同一地區混養東方蜂與西方蜂，降低病毒在蜂種間交互傳播，加速產生變異之風險。

為了解病毒潛伏樣態對蜂群健康與的影響，在異常蜂群26個樣本與正常蜂群37個樣本分析蜜蜂病毒流行率。異常蜂群有56.0%感染2種以上病毒，正常蜂群為23.4%（圖一A），顯示多重病毒感染影響蜂群健康( $\chi^2 = 6.79, P < 0.01$ )。

異常蜂群BQCV、AcSBV與AmSBV檢出率分別為60%、33.3%與8

如表一。

樣本以活體或以冷凍-15°C運送回實驗室，進行DWV、KV、AmSBV、AcSBV與BQCV等病毒基因片段檢驗。

## 二、蜂群健康樣態調查

調查各地養蜂場蜜蜂樣本，並檢查蜂群健康樣態。如發現巢脾中明顯有幼蟲期哺育不良，褐化的死亡幼蟲；或死亡蛹體；或巢房口有工蜂出現顫抖、爬行、死亡，或羽化工蜂畸形翅等癥狀均為異常蜂群(*infected colony*)。如無以上癥狀則視為正常蜂群(*healthy colony*)；野外採集樣本則未紀錄，蜂群健康樣態詳如表一。

## 三、蜂農管理模式調查

在各地取樣之養蜂場，針對蜂農每年更換蜂王次數及每年蜂蟹蟻防治次數，進行查訪並予以記錄。訪查項目另包括蜂農是否在冬季、夏季與初春季節加強餵飼管理，以了解蜂農之養蜂習慣，綜合調查結果在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*<sup>TM</sup>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°C備用。病毒RNA採用Invitrogen *SuperScript*<sup>TM</sup> 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°C備用。

取病毒cDNA樣本，進行PCR反應，

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。使用蜜蜂病毒引子序列如表二，蜜蜂肌動蛋白( $\beta$ -actin)基因片段為內部對照組。cDNA樣本分別與引子對及All-in-One PCR Mix套組試劑混合，反應條件均為94°C 3分鐘1循環，94°C，30秒；55°C，30秒；72°C，30秒共35個循環；最後72°C，5分鐘1循環。將PCR產物取10  $\mu$ l以1.5%瓊脂膠體進行電泳分析，並在UV 312 nm照射下進行片段之確認。

## 結果與討論

調查臺灣西方蜂病毒檢出率依序為BQCV 53%、AcSBV 33%、DWV 24%、KV 20%、AmSBV 6%（表二）。本調查所有樣本ABPV與CBPV均未檢出（資料未呈現），推測ABPV與CBPV在臺灣無發生。

臺灣西方蜂BQCV在北、中、南各地區檢出率約為48-55.6%（表三），普遍感染情形與中國大陸、日本與義大利等國家相同 (Ding *et al.*, 2009；Kojima *et al.*, 2011；Porrini *et al.*, 2016)。工蜂帶原病毒沒有明顯病癥，王台中幼蟲感染病毒後，表面呈現淡黃色，於前蛹期或蛹期死亡，病變後的王台變呈黑色 (de Miranda *et al.*, 2013)。本調查未對蜂王幼蟲進行檢驗，蜂王幼蟲之BQCV感染率並不清楚，但調查BQCV與蜂群健康之關係，異常蜂群檢出率為60%，感染率略高於正常蜂群的52.6%（圖一B），推測BQCV可能非主要造成蜂群異常的主要



%，與正常蜂群BQCV檢出率52.6%、AcSBV 檢出率30.8%與AmSBV檢出率7.9%相近（圖一B）。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，當蜂蟹蟻寄生率增加、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因為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）。此外有24.3%正常蜂群與11.5%出現異常蜂群未檢出病毒，推測除了病毒感染，可能感染如微粒子病或其他病原使蜂群造成異常。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）。蜂蟹蟻(*Varroa destructor*)是西方蜂體外寄生蟻，吸食蜜蜂體液同時也傳播DWV、SBV等病毒，因此降低蜂蟹蟻在蜂群的寄生率，可減少蜜蜂病毒的傳播(Rosenkranz *et al.*, 2010)。因此蜂蟹蟻防治次數或每年蜂王更新次數，或許影響病毒疾病的發生。

蜂蟹蟻防治之防治方法是以福化利(tau-fluvalinate)連續處理3周為1次防治週期，訪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），統計分析無顯著差異( $\chi^2=3.1$ ,  $P>0.05$ )。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。統計分析無顯著差異( $\chi^2=1.99$ ,  $P>0.05$ )。推測蜂群有較優良的抗病力或抗蜂蟹蟻能力，而蜂農在蜂群健康情況下，無需增加換王或防治蜂蟹蟻次數。

本研究另調查蜂群餵飼管理模式對蜂群健康樣態的影響，訪查結果蜂農在冬天與初春季節均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。但訪查發現正常蜂群約有67.6%的樣本在夏季增加蜂糧餵飼（圖二C），而出現異常癥狀的蜂群，僅有30.8%在夏季增加餵飼，顯示在增加蜂糧餵飼的管理模式

下，減少蜂群出現異常情形( $\chi^2=8.29, P < 0.01$ )。進一步了解蜂農夏季餵飼蜂糧是為生產蜂王漿，蜂王漿生產需提供蜜蜂充足蛋白質來源，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。

本研究調查臺灣各地區西方蜂之病毒檢出率，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，除平時注重蜂蟹蟻防治減低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，維持蜂群健康生產狀態。

## 誌謝

本調查分析承蒙行政院農業委員會106農科-6.2.1-苗-M1計畫補助，苗栗區農業改良場顏君靜及趙傑等同仁協助，特致謝忱。

表一 樣本採集紀錄表

Table 1. Sample sites of *Apis mellifera* and their healthy status, management mode checks

編號 <sup>a</sup>	縣(市)	鄉、鎮、區	採樣時間			座標	蜂群健康樣態 <sup>b</sup>	夏季蜂糧餵飼 <sup>c</sup>	周年換王次數	防治蟹蟎次數	檢驗樣本數	
			年	月	日							
N1	苗栗縣	頭份鎮	2017	1	5	24.69130	120.94820	-	-	1	2	1
N2	苗栗縣	公館鄉	2017	3	3	24.49864	120.87312	UN	UN	UN	UN	1
N3	苗栗縣	銅鑼鄉	2017	3	10	24.48880	120.78407	-	+	1	2	1
N4	桃園市	大園區	2017	5	18	25.02256	121.19128	-	-	1	2	1
N5	新竹縣	關西鎮	2017	9	30	24.78346	121.17874	+	-	2	3	1
N6	宜蘭縣	冬山鄉	2017	12	24	24.63068	121.71658	+	-	1	1	1
N7	桃園市	蘆竹區	2017	12	12	25.03684	121.26975	+	-	1	3	2
N8	苗栗縣	西湖鄉	2018	1	22	24.54692	120.77099	UN	UN	UN	UN	1
N9	苗栗縣	西湖鄉	2018	1	24	24.54670	120.78976	+	-	1	3	1
N10	苗栗縣	頭屋鄉	2018	1	24	24.58596	120.88627	-	-	1	4	1
N11	基隆市	七堵區	2018	2	9	25.10503	121.65900	-	-	1	3	1
N12	苗栗縣	公館鄉	2018	2	12	24.46568	120.86070	UN	UN	UN	UN	1
N13	苗栗縣	銅鑼鄉	2018	2	12	24.47460	120.79597	UN	UN	UN	UN	1
N14	苗栗縣	銅鑼鄉	2018	2	12	24.45158	120.78444	UN	UN	UN	UN	1
N15	苗栗縣	公館鄉	2018	3	3	24.48192	120.79587	UN	UN	UN	UN	1
N16	苗栗縣	獅潭鄉	2018	3	3	24.49652	120.87600	UN	UN	UN	UN	1
N17	苗栗縣	苑裡鎮	2018	3	7	24.40411	120.74640	UN	UN	UN	UN	1
N18	苗栗縣	苑裡鎮	2018	3	7	24.40343	120.70901	UN	UN	UN	UN	1
N19	苗栗縣	苑裡鎮	2018	3	7	24.41178	120.69013	UN	UN	UN	UN	1
N20	新北市	平溪區	2018	4	4	25.02058	121.71693	UN	UN	UN	UN	1
N21	苗栗縣	獅潭鄉	2018	3	17	24.46634	120.90540	UN	UN	UN	UN	1
N22	新北市	雙溪區	2018	4	4	25.02655	121.82544	UN	UN	UN	UN	1
N23	苗栗縣	西湖鄉	2018	3	22	UN	UN	UN	UN	UN	UN	2
N24	苗栗縣	卓蘭鄉	2018	3	17	24.29201	120.89099	UN	UN	UN	UN	1
N25	苗栗縣	獅潭鄉	2018	3	17	24.48769	120.89968	UN	UN	UN	UN	1
C26	臺中市	神岡區	2017	1	5	24.24880	120.64360	+	-	2	2	1
C27	南投縣	名間鄉	2017	3	1	23.84189	120.69319	+	-	1	2	1
C28	臺中市	太平區	2017	3	10	24.12360	120.73448	-	+	2	3	1
C29	臺中市	霧峰區	2017	3	22	24.01517	120.71687	+	+	1	2	2
C30	臺中市	太平區	2017	5	18	24.11758	120.75923	+	+	2	3	1
C31	南投縣	埔里鎮	2017	6	13	23.95603	120.97735	-	-	2	3	1
C32	彰化縣	田中鎮	2017	6	13	23.84404	120.55801	-	+	2	2	1
C33	臺中市	后里區	2017	7	4	24.33798	120.69929	-	+	1	2	1
C34	南投縣	埔里鎮	2017	8	29	23.98225	120.99800	-	+	3	3	1
C35	南投縣	埔里鎮	2017	9	1	23.94497	120.95720	-	+	2	3	1
C36	南投縣	埔里鎮	2017	9	1	23.94354	120.93179	-	+	1	2	1
C37	南投縣	中寮鄉	2017	9	2	23.93265	120.78168	-	-	1	2	1
C38	南投縣	草屯鎮	2017	9	2	23.97775	120.77429	-	+	2	2	1
C39	南投縣	草屯鎮	2017	9	2	23.99894	120.80518	-	-	1	2	1
C40	臺中市	新社區	2017	10	6	24.21729	120.79191	+	+	3	2	1
C41	南投縣	中寮鄉	2017	11	9	23.96030	120.76997	+	-	2	2	3
C42	南投縣	名間鄉	2017	11	28	23.85178	120.69436	+	-	1	2	2
C43	臺中市	霧峰區	2017	11	28	24.01447	120.70401	+	-	1	3	1
C44	臺中市	新社區	2018	1	23	24.15574	120.86132	UN	UN	UN	UN	1
C45	彰化縣	和美鄉	2018	1	25	24.09329	120.49304	+	-	1	2	2
C46	南投市	南投市	2018	3	6	23.94028	120.65624	+	+	2	3	2
S47	嘉義縣	民雄鄉	2017	3	7	23.52294	120.43795	+	-	1	3	1
S48	臺南市	白河區	2017	3	23	23.39383	120.44401	+	+	2	2	1
S49	嘉義縣	新港鄉	2017	4	19	23.93348	120.72317	-	-	1	2	5
S50	嘉義縣	朴子市	2017	5	9	23.51430	120.15820	-	+	1	2	1
S51	臺南市	楠西區	2017	5	9	23.17580	120.50240	-	+	2	2	1
S52	臺南市	東山區	2017	5	9	23.22820	120.47160	-	+	2	2	1
S53	臺南市	東山區	2017	6	27	23.32325	120.40509	+	+	2	2	1
S54	嘉義縣	東石鄉	2017	9	18	23.51430	120.15820	-	+	1	2	12
S55	臺南市	新營區	2018	1	12	23.30093	120.29593	-	+	1	2	1
S56	臺南市	新營區	2018	1	12	23.18031	120.48452	-	+	1	3	1
S57	高雄市	田寮區	2018	3	30	22.84475	120.35554	+	-	1	2	2

<sup>a</sup> Regional symbols: N: Northern region, Form Miaoli to Yilan County; C: Central region: Changhua, Nantou County and Taichung City,; S: Southern region: Chiayi County and Tainan, Kaohsiung City.

<sup>b</sup> Apiaries conditional checks: 「+」: Infected colony: Larvae, pupa or worker with dead, worker shaken or deformed wings; 「-」: Healthy colony; Un: Unknown.

<sup>c</sup> Summer beebread feeding: 「+」: feeding; 「-」: None feeding; Un: Unknown.

表二 引子序列

Table 2. Primers used in this study. F: forward, R: reverse.

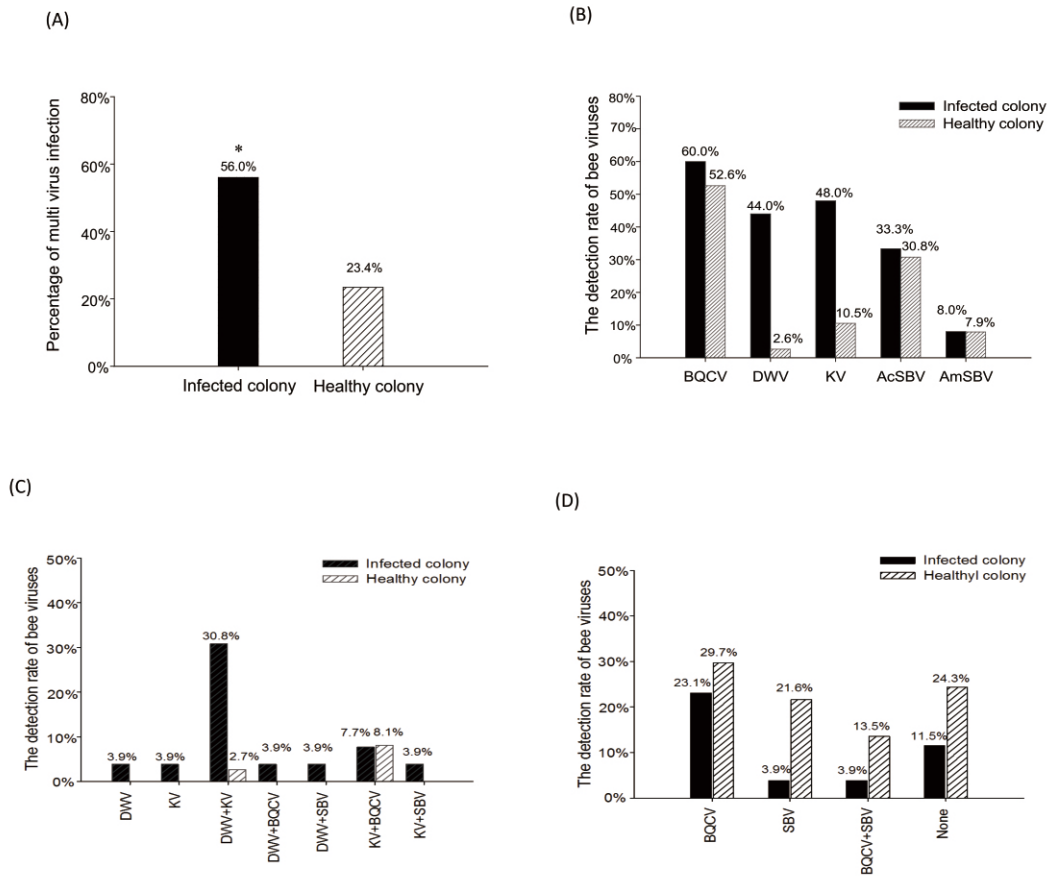
引子	序列 (5'-3')	參考文獻
Black Queen Cell Virus	F TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC	Benjeddou <i>et al.</i> (2001)
	R GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	
Deformed Wing Virus	F GGATGTTATCTCTTGCGTGGA	Lanzi <i>et al.</i> (2006)
	R CGATAATAATTTTGAACGCTGA	
Kakugo Virus	F GGAAGTGAACCAATCCGATGTCATCACG	Fujiyuki <i>et al.</i> (2009)
	R TCTCAAGTTCGGGACGCATTC	
<i>Apis mellifera</i> Sacbrood Virus	F GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT	Chen <i>et al.</i> (2004)
	R TCATCATCTTCACCATCCGA	
<i>Apis ceranae</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	

表三 臺灣西方蜂病毒檢出率。(T: 全部西方蜂樣本; N: 北部西方蜂樣本; C: 中部西方蜂樣本; S: 南部西方蜂樣本)

Table 3. Bee viruses detection rate of *A. mellifera* in Taiwan. (T: Total sample, N: Northern region, C: Central region, S: Southern region)

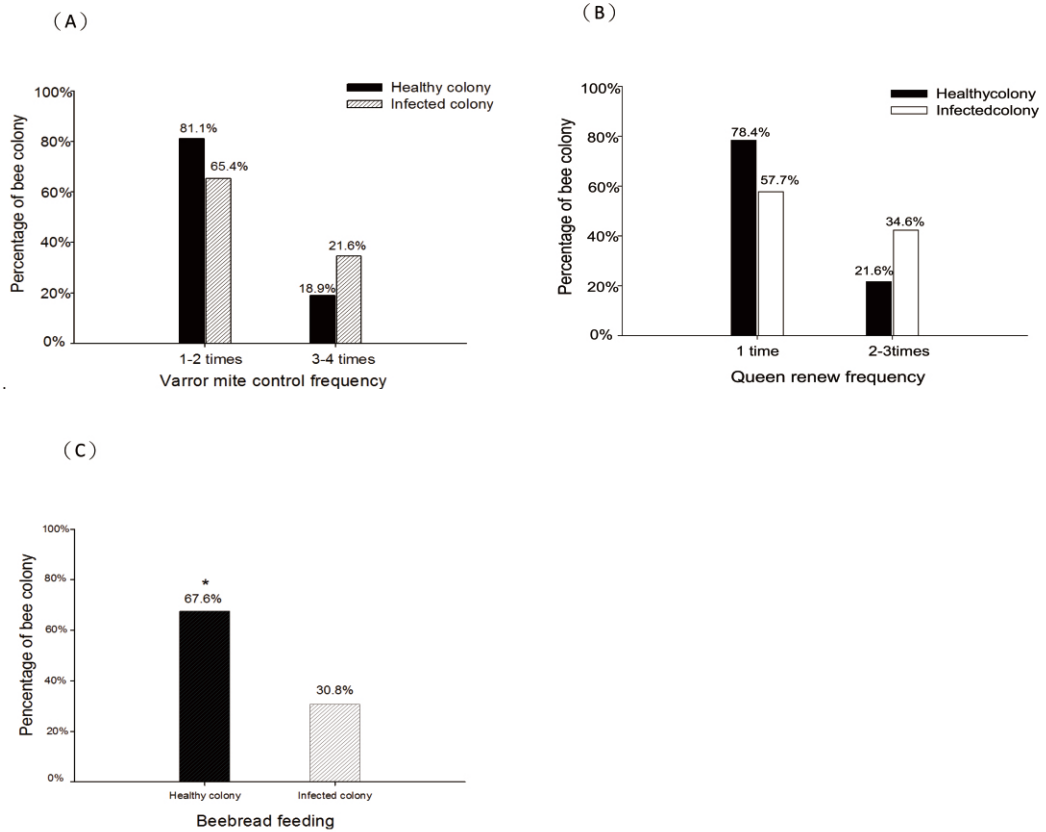
	<b>BQCV</b>	<b>DWV</b>	<b>KV</b>	<b>AcSBV</b>	<b>AmSBV</b>
<b>T</b>	51.9%	23.5%	23.4%	32.1%	6.2%
<b>N</b>	44.4%	40.7%	29.6%	25.9%	0.0%
<b>C</b>	55.6%	25.9%	37.0%	48.2%	7.4%
<b>S</b>	55.6%	3.7%	3.7%	22.2%	11.1%





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)正常蜂群與異常蜂群多重病毒感染率為 $\chi^2=6.79, P < 0.01$ 。(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. Detection rate of bee virus in healthy and infected colonies of *Apis mellifera*. (A)Percentage of multi viruses infection rate in healthy and infected colonies.  $\chi^2 = 6.79, P < 0.01$ . (B)Detection rate in healthy and infected colonies. (C)Detection rate of DWV and KV in healthy and infected colonies. (D)Detection rate of BQCV and SBV in healthy and infected colonies.



圖二 臺灣蜂場西方蜂群管理方式比較。(A)正常蜂群與異常蜂群週年防治蜂蟹蟎次數比較( $\chi^2=3.1$ ,  $P>0.05$ )。(B)正常蜂群與異常蜂群每年更換蜂王次數比較( $\chi^2=1.99$ ,  $P>0.05$ )。(C)正常蜂群與異常蜂群夏季餵食蜂糧比較。  
 Fig. 2. Comparison of beekeeping managements in healthy and infected colonies. (A) mite control frequency annually ( $\chi^2 = 3.1$ ,  $P > 0.05$ ). (B) queen renew frequency annually ( $\chi^2 = 1.99$ ,  $P > 0.05$ ). (C) beebread feeding in summer season ( $*\chi^2 = 8.29$ ,  $P < 0.01$ ).

## 參考文獻

- 吳登楨、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、陳保良。2002。蜂王漿生產效率之研究。臺灣昆蟲特刊，4: p.93-106。
- 盧美君、吳輝虎、侯鳳舞。2010。臺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.
- Bere'nyi O, T. Bakonyi, I. Derakhshifar, H. Ko'glberger, G. Topolska, W. Ritter, H. Pechhacker, and N. Nowotny.** 2007. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3605-3611.
- Calderone, N. W.** 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *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.
- de Miranda J. R., L. Bailey, B. V. Ball, P. Blanchard, G. E. Budge, N. Chejanovsky, Y. P. Chen, L. Gauthier, E. Genersch, D. C. de Graaf, M. Ribière, E. Ryabov, L. De Smet, and J. J. M. van der Steen.** 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apicult. Res.* 52: 1-56.
- 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 E.L. Rotheray.** 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science.* 347: 1255957.
- Gong H.R., X. X.Chen, Y. P. Chen, F. L. Hu, J. L. Zhang, Z. G. Lin, J. W. Yu,, and H. Q. Zheng.** 2016. Evidence of *Apis cerana* Sacbrood virus Infection in *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 2256-2262.
- Li B., C. Hou, S. Deng, X. Zhang, Y. Chu, C. Yuan and Q. Diaoa.** 2016. First complete genome sequence of chronic bee paralysis virus isolated from honey bees (*Apis mellifera*) in China. *Genome Announc.* 4: e00618-16
- Huang, W.F., S. Mehmood, S. Huang, Y. W. Chen, C. Y. Ko, and S. Su.** 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.
- 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: 1479014795.
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., and Tscharntke, T.** 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc Lond B* 274: 303-313.
- Kojima Y., T. Toki, T. Morimoto, M. Yoshiyama, K. Kimura, and T. Kadowaki.** 2011. Infestation of Japanese Native Honey Bees by Tracheal Mite and Virus from Non-native European Honey Bees in Japan. *Microbiol. Ecol.* 62: 895-906.
- Mayo, M. A.** 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147: 1655-1663.
- 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
- Molineri A. I., A. Pacini, A. Giacobino, N. Bulacio-Cagnolo, A. Aignasse, L. Zago, N. Fondevila, C. Ferrufino, J. Merke, E. Orellano, E. Bertozzi, H. Pietronave, and M. L. Signorini.**

- Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. 2017. Rev Argent Microbiol. 49: 166-173.
- Nai Y. S., C. Y. Koa , P. S. Hsu, W. S. Tsaic, Y. W. Chena, M. H. Hsud, and I. H. Sung.** 2018. The seasonal detection of AcSBV (*Apis cerana* sacbrood virus) prevalence in Taiwan. J Asia Pac Entomol. 21: 417-422.
- 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.
- Steinmann N, M. Corona, P. Neumann, and B. Dainat.** 2015. Overwintering Is Associated with Reduced Expression of Immune Genes and Higher Susceptibility to Virus Infection in Honey Bees. PLoS ONE 10: e0129956.
- 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.



# A regional survey and analysis of latent infection of western honeybee viruses (*Apis mellifera*) in Taiwan

Pan-Hen Chen\* and Pei-Shou Hsu

Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, R. O. C.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the distribution of Western honeybee viruses (*Apis mellifera*) in Taiwan. A total of 81 honeybee samples were collected from Taiwan Northern, Central and Southern regions, performed symptom observations and viral molecular identifications. There were five viruses found in detection rate: black queen cell virus (BQCV) 53.2%, deformed wing virus (DWV) 24.1%, Kakugo virus (KV) 20.2%, *Apis cerana* sacbrood virus (AcSBV) 32.1% and *Apis mellifera* sacbrood virus (AmSBV) 6.3%. The detection rate of BQCV was common distributed in Taiwan southern, central and northern region ranged from 48~ 55.6%. AmSBV was found 11.1% in the Central and Southern regions. The detection rate of DWV and KV were found in 44% and 32% in Northern region. The detection rate of AcSBV in the Central region was 50% highest than Northern and Southern region. Analysis of the virus detection rate and the healthy status of honeybee colonies, the detection rates of DWV and KV in infected bee colonies were 44% and 48% compared to 2.6% and 10.5% for healthy colonies. Further analysis of co-infection rates in DWV and KV for infected and healthy bee colonies were 30.8% and 2.7%, respectively. It was indicated that DWV and KV co-infection threaten the health colonies. In addition, the proportions of feeding in summer season were found 67.6% and 30.8% in infected and healthy colonies, indicated that enhancing nutrition supplement reduced the infection rates.

**Keywords:** honeybee virus, black queen cell virus (BQCV), deformed wing virus (DWV), kakugo virus (KV), *Apis cerana* sacbrood virus (AcSBV), *Apis mellifera* sacbrood virus (AmSBV)

\*Corresponding author, e-mail: BanHen@mdais.gov.tw