

# 2017 蜜蜂與蜂產品研討會 論文集

2017 年 9 月 15 日

行政院農業委員會苗栗區農業改良場  
環境教育大樓 AE106 會議室

杜武俊 吳明城 林峻賢 主編  
呂庭萱 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  
國立臺灣大學昆蟲學系  
國立宜蘭大學生物科技與動物科學系  
國立虎尾科技大學生物科技系

台灣蜜蜂與蜂產品學會 編印

2017 年 09 月出版

# 2017 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	行政院農業委員會苗栗區農業改良場 呂秀英 場長 致開幕詞	吳姿嫻 課長
		台灣蜜蜂與蜂產品學會 杜武俊 理事長 致詞	
		台灣養蜂協會 鄭金崑 理事長 致詞	
09:50 - 10:00		大會合照	
10:10 - 11:00	專題演講	<b>蜜蜂王漿之生技開發與應用</b> 國立虎尾科技大學生物科技系 彭及忠 主任	杜武俊 教授
11:00 - 11:15	報告一	<b>從新尼古丁藥劑事件看蜜蜂毒性評估之不足</b> 國立臺灣大學昆蟲學系 楊恩誠 教授	何鎧光 教授
11:15 - 11:30	報告二	<b>採蜜前蜂群管理</b> 台灣養蜂協會 鄭金崑 理事長	
11:30 - 11:45	報告三	<b>設施栽培蜜蜂授粉效益與技術</b> 行政院農業委員會苗栗區農業改良場 徐培修 助理研究員	
11:45 - 12:00	報告四	<b>四十五年前臺灣的養蜂事業</b> 明新科技大學休閒事業管理系 安奎 榮譽教授	
12:00 - 13:45		午餐時間	
13:45 - 14:00	報告五	<b>都市蜂潮：城市蜂群行為適應初探</b> 宏國德霖科技大學休閒事業管理學系 江敬皓 助理教授	安奎 教授
14:00 - 14:15	報告六	<b>台灣近年養蜂業發展之成因與隱憂</b> 國立嘉義大學植物醫學系 宋一鑫 助理教授	
14:15 - 14:30	報告七	<b>台灣無螫蜂飼養及無螫蜂膠之開發利用</b> 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 陳怡伶 教授	
14:30 - 14:45	報告八	<b>多元化蜂產品開發</b> 養蜂人家蜂采館 黃俊彥 經理	吳登楨 副場長
14:45 - 15:00	報告九	<b>氣相層析離子泳動光譜分析儀技術應用在蜂蜜鑑定的研究</b> 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 陳春廷 博士候選人	
15:00 - 15:15	報告十	<b>台灣北部野蜂養殖現況</b> 川樹蜜蜂生態農場 陳柏融 負責人	
15:15 - 15:45		茶點時間	
15:45 - 16:00	報告十一	<b>畸翅病毒對西洋蜂幼蟲的影響</b> 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 乃育昕 助理教授	王重雄 教授
16:00 - 16:15	報告十二	<b>台灣東方蜂中囊病之流行率調查</b> 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 柯仲宇 博士候選人	
16:15 - 16:30	報告十三	<b>蜂毒抗菌肽對多重抗藥性菌株之抑菌作用與應用潛能</b> 國立中興大學昆蟲學系 林峻賢 博士	
16:30 - 16:45	報告十四	<b>台灣西方蜂種原分析與展望</b> 國立中興大學昆蟲學系 吳明城 博士	
16:50 - 17:50		蜂界交流座談	

## 一、活動時間與地點：

時間：2017年9月15日(星期五)。

地點：苗栗縣公館鄉館南村261號。

行政院農業委員會苗栗區農業改良場環境教育大樓 AE106 會議室。

## 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

顯花植物出現後，蜜蜂是豐富大自然生物多樣性的最重要推手，是自然生態系中的大功臣；其所生產的蜂蜜更是許多動物偏愛的瓊漿玉液。而在眾多喜愛的蜂蜜的動物中，人類可以說是最瞭解蜜蜂的知己；除了蜂蜜外，人類陸續發掘了蜂王漿、蜂膠、蜂毒、蜂蠟、蜂子的各種活性與功效性，並將之產品化；除此之外，蜜蜂超強的授粉功力也為農業產值做出巨大的貢獻，讓蜜蜂成為重要的經濟動物，也成為人類的好朋友。

然而近年許多與蜜蜂相關新聞卻讓我們不得不省思我們的好朋友怎麼了？抑或是我們怎麼了？殺蟲藥劑的使用重則直接讓外勤蜂群致死，輕則積累影響下一代發育；蜂蟹蝨的問題遲遲未能解決，一場前所未有的中囊病毒侵襲，又導致臺灣中蜂的浩劫；可以看到的是中蜂蜂農的直接損失，然而其對自然界野蜂的影響我們尚未評估，口耳相傳的野蜂變少了是否應進行更嚴謹的科學調查？還有糖漿混充、蜂蜜造假的新聞也經常上報。而在這樣的環境中養蜂人家如何自處？如何因應？研究蜜蜂的人如何幫助這個產業？政府的態度又是如何？這些都是我們蜂界面臨的嚴峻挑戰。

臺灣地方不大資源有限，然無論自然生態的生機盎然、或是人們的積極向上精神，在在都顯示這是一個充滿蓬勃生機的一個島，我們的蜂學研究與養蜂產業何嘗不是臺灣精神的縮影。這一次的研討會更是結合了產、研、學各方的努力成果，報告內容涵蓋蜜蜂種原、蜜源、養蜂技術與管理、蜜蜂病蟲害、蜜蜂授粉、蜂產品創新研發、休閒蜂潮、環境影響等，全面具體展現我們多元的蜜蜂產業與蜜蜂文化。希望藉由此次研討會的成果分享、經驗交流與意見交換，能讓我們更聚焦蜂學課題，除養蜂問題的解決外，更能友善環境、提供健康、促進經濟，主動積極開創前瞻的蜂學研究與蜂產業。相信這一定是一場精彩可期的研討會，凝聚蜂人共識，發揚臺灣蜜蜂精神。

台灣蜜蜂與蜂產品學會 理事長 杜武俊 謹誌

中華民國 106 年 9 月 8 日

## 序 二

西元 1969 年 8 月，在養蜂先進前輩的奔走號召下，台灣養蜂協會正式成立（時稱台灣省養蜂協會）。當時是以聯絡養蜂同業感情，推廣養蜂技術，繁榮農村經濟為目標。

時光荏苒，48 年忽焉過去。養蜂前輩們走過草創的艱辛，以最簡陋的養蜂器械，從北而南，由西而東，踏遍台灣每一座蓊鬱山林。在不斷地刻苦摸索，彼此交流心得，乃至於向國外同業研習精進養蜂生產技術之下，蜂蜜採收技術趨於成熟，蜂王漿採收質量也獲得突破。1980 年代，台灣產蜂王漿品質深受肯定，源源不斷拓銷日本市場，帶來豐厚的收益，當時臺灣的養蜂人家一度高達 2,000 戶，盛極一時。

在歷屆理事長的努力經營，以及農政機關的關愛與輔導之下，台灣養蜂協會漸而成長。會務經營已經從早期「生產者端的輔導」，階段性地發展為「消費者端的滿足」。也就是說，在會友生產與加工技術漸趨穩定的基礎上，會務發展已轉型為滿足消費者「健康，安全」的食用需求為目標，宣導推廣本會驗證通過的蜂產品為方向。

本次台灣蜜蜂與蜂產品學會盛情邀請本會參與主辦「2017 蜜蜂與蜂產品研討會」，以促進國內蜜蜂生物學資訊交流，以及提升養蜂技術與蜂產品質量為目標，確實裨益本會蜂友進一步精進生產管理技術與提升蜂產品質量，符合本會刻正推動的滿足消費需求目標，爰欣然參與，廣邀本會蜂友踴躍參加並為之序。

台灣養蜂協會 理事長  
鄭金崑 謹識  
106 年 9 月 1 日



### 序 三

蜜蜂除了生產蜂蜜、蜂王漿、蜂花粉等蜂產品供人類享用，更是農業生產上的最佳助手，全球超過四分之三需授粉的農作物仰賴蜜蜂授粉。臺灣養蜂產業自 1960 年代起蓬勃發展，目前國內蜂產品每年產值約 30 億，若加上需蜜蜂授粉之作物年產值約 500 億。本場前身為臺灣省蠶蜂業改良場，自 1989 年全力投入臺灣養蜂產業的推廣與輔導，而後雖在 1997 年改制為苗栗區農業改良場，但仍掌理全國蜂業的技術輔導並從事相關研發工作。國內大學院校亦有多位學者，積極投入蜂學研究。這些研究涵蓋蜜蜂生物學、養蜂技術管理、蜜蜂病蟲害防治、蜂種改良、蜂產品生產及生物活性等，乃至於氣候變遷對蜜蜂之影響，在在說明這迷人的小昆蟲所帶來的科學探討、經濟價值及生態意義，有探索不完的奧秘，深具無限的發展潛力。

近年來全球「蜂群崩解症候群」(Colony Collapse Disorder, CCD)備受關注，喚醒了國內各界正視蜜蜂議題，從氣候變遷導致蜜(粉)源不足，延伸至蜜蜂農藥中毒、蜂產品生產安全與產地辨別、城市養蜂、農作物授粉等各種問題。突然間，人們彷彿發現了這小小的蜜蜂與我們的生活，甚至與人類的生存，息息相關。為了確保國內蜂業的永續健全發展，我們應該好好維護這些為人類辛勤付出的小蜜蜂，凝聚共識、分工合作，從基礎科學與應用技術各方面做全盤性的問題分析，研議出具體的解決策略，導入創新研究，以提高養蜂產業競爭力。

透過本次研討會的舉辦，展現出產、官、學各方多年來努力投入的研究成果，並藉此提供一個交流平台，讓國內的蜂學研究與產業應用能互相對話與激盪，透過跨領域知識碰撞，激發出科技整合與創新研究的火花。在農政單位致力發展新農業科技的浪潮下，國內養蜂產業亦在新舊世代傳承交替之時，相信透過共聚一堂、彼此分享經驗，定能就養蜂產業的問題、現況及前景，達到深入檢討、前瞻思考及擘畫未來之效。

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 106 年 9 月 1 日

# 目錄

1. 蜜蜂蜂王漿之生技開發與應用	1
彭及忠*、孫慧慈、吳政穎、蔡僑銀、舒坦莉	
2. 從新尼古丁藥劑事件看對蜜蜂毒性評估之不足	11
丁婕、楊恩誠*	
3. 採蜜前蜂群的管理	19
鄭金崑	
4. 設施栽培蜜蜂授粉效益與技術	22
徐培修*、盧美君	
5. 四十五年前臺灣的養蜂事業	28
安奎	
6. 都市蜂潮：城市蜂群行為適應初探	38
江敬皓	
7. 台灣近年養蜂業發展之成因與隱憂	50
宋一鑫	
8. 台灣無螫蜂飼養及無螫蜂膠之開發利用	51
陳怡伶*、余思賢、彭及忠、陳翠瑤、林湘羚、楊久滕	
9. 多元化蜂產品開發	68
黃俊彥	
10. 氣相層析離子泳動光譜分析儀技術應用在蜂蜜鑑定的研究	72
魏于凡、陳春廷、陳裕文*	
11. 台灣北部野蜂養殖現況	84
陳柏融	
12. 畸翅病毒對西洋蜂幼蟲的影響	86
許博雅、黃鈺峰、陳裕文*、乃育昕*	
13. 台灣東方蜂中囊病之流行率調查	100
柯仲宇、陳裕文*、乃育昕、徐培修、蔡文錫、宋一鑫	
14. 蜂毒抗菌胜肽對多重抗藥性菌株之抑菌作用與應用潛能	113
林峻賢、杜武俊	
15. 台灣西方蜂種原分析與展望	122
吳明城、呂庭萱、路光暉*	

(編排順序以投稿作者演講時間為主要，投影片檔案至於後端)

# 蜜蜂蜂王漿之生技開發與應用

彭及忠\*、孫慧慈、吳政穎、蔡僑銀、舒坦莉

國立虎尾科技大學生物科技系

\*通訊作者：彭及忠

電子郵件：bocky@nfu.edu.tw

通訊地址：雲林縣虎尾鎮文化路 64 號

## 摘要

蜂王漿主要由青年工蜂的下咽頭腺和大顎腺分泌混合而成專為哺育蜂后成蟲和幼蟲的乳白色食物。蜂王漿具有豐富的營養成分包含有蛋白質、胺基酸、酯質及糖類等，另外也在蜂王漿中發現一些俱有醫藥活性的物質成分如 10 羥基-2-癸烯酸(10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA)), royalisin, jelleines 與 apisin 等。許多研究發現蜂王漿具有養生保健功效尤其對降低血壓、血脂、預防動脈硬化、降低血糖，增強記憶能力、促進造血機能、調整內分泌和代謝、延遲衰老、增強組織再生能力、提高機體免疫功能、預防感冒、癌症、肝炎、神經衰弱、失眠、改善更年期障礙等。由於蜂王漿的營養價值因此他他在天然保健食品及化妝品市場上廣被使用。目前本研究室利用黑色素細胞及老鼠皮膚實驗的驗證，成功證明蜂王漿的美白及抗黑斑的功效，除此之外其也能增加皮下膠原蛋白質的增生，此一成果將有利蜂王漿在美白及抗皺之產品的開發與應用。除此之外、我們利用大鼠運動模式生理分析檢測系統來評估蜂王漿的抗疲勞功效，我們藉由運動模式分析發現有使用蜂王漿大鼠的運動耐力比沒有使用蜂王漿的要高出百分之 30，並透過血液生理分析血液中葡萄糖及乳糖的變化，發現在有使用蜂王漿大鼠的血液葡萄糖濃度比未使用蜂王漿大鼠的血液葡萄糖濃度要穩定且運動時增加濃度幅度也較低；在乳糖的變化上也發現使用蜂王漿大鼠的產生濃度也低於未使用蜂王漿大鼠，並能快速的代謝乳糖減少體內堆積，因此我們發現蜂王漿能讓運動耐力提升並減少疲勞降低乳糖的累積。

**關鍵詞：** 蜂王漿、黑色素、美白、抗疲勞

蜂王漿為年輕工蜂的大顎腺及下咽頭腺以一定比例所分泌的乳白或淡黃色含甜、辣、澀、酸味的黏稠狀液體，有特殊芳香氣味，顏色因蜜源植物、季節及儲存期而有別，主要作為蜂王的終身糧食及養育蜂王幼蟲。(1)(章加寶,1995)。蜂王漿的化學成分極為複雜，新鮮蜂王漿含水 65~68%、蛋白質 11~14%、脂類 6%、碳水化合物 14~17%、灰分 1%、未確定物質 3% (1)。其中 2/3 為白蛋白(清蛋白)、45%為球蛋白，此和人類血液中的清球蛋白的比值大致相似。目前已知王漿中含多種活性蛋白質，主要有：活性多肽、類胰島素、球蛋白和酶類四種。王漿中胺基酸約占乾物重的 0.8%、相當於鮮王漿的 0.28%、已測出至少含有 18 種胺基酸，有 8 種是人體必需胺基酸，主要種類依次為脯胺酸 55%、賴胺酸、25%、股胺酸 7%、精胺酸 4%等(1)。蜂王漿中含大量水溶性維生素，以 B1、B2、B6、B12 等 B 族含量最多，其中以 B2 含量最豐富，亦含一定量脂溶性維生素 A、D、E 及菸鹼酸、泛酸、生物素、肌醇、乙醯膽鹼等。維生素 B 族可促進體內蛋白質、脂質、醣類等三大營養素的消化與吸收，所以有輔酵素的功能，維生素 B1 對人體疲勞、倦怠、睡眠障礙、肌肉痙攣、神經痛等有明顯的功效，維生素 B2 對促進發育、強壯身體、防止衰老有直接作用，與碳水化合物、脂肪及胺基酸的代謝有密切關係，全部的磷酸和核酸等的代謝也與維生素 B2 有關。菸鹼酸是兩種輔酶的成分，對保護皮膚、造血機能及治療神經炎症有效。乙醯膽鹼是王漿中的活性物質，在體內可直接被吸收利用，是記憶和神經信息傳達的支柱，和腦力、思維能力、記憶能力的提高和改善有重要作用(1)。

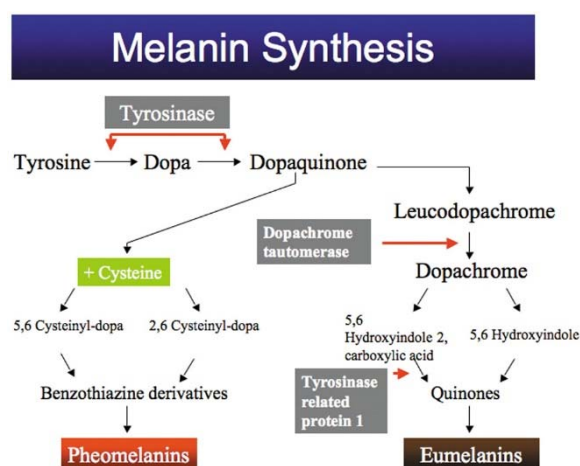
有機酸中主要是脂肪酸，至少含有 26 種游離脂肪酸，其中有一種特殊有機酸，稱為 10-羥基-2-癸烯酸 ((E)-10hydroxy-2-decenoic acid)，又稱王漿酸，簡稱癸烯酸 (10-HDA)，天然食物中只在蜂王漿內發現，是一種非常穩定的物質，具有抗菌和抑制腫瘤細胞生長的效果。此外王漿尚有數種具生物活性的類腮腺激素(parotin)及類固醇激素，類腮腺激素含量多，是人體唾液腺重要成分，具有活化皮膚、肌肉、軟骨組織的功能，可預防老化及血管疾病；類固醇激素主要有：17-酮固醇、17-羥固醇、去甲腎上腺素、腎上腺素等，這些激素都是人體生理代謝不可少的物質，它可隨時提供及補充體內激素的來源，但含量輕微，不必擔心會造成超量的副作用(1)。

於上述營養成分讓蜂王漿具有養生保健功效尤其對降低血壓、血脂、預防動脈硬化、降低血糖，增強記憶能力、促進造血機能、調整內分泌和代謝、延遲衰老、增強組織再生能力、提高機體免疫功能、預防感冒、癌症、肝炎、神經衰弱、失眠、改善更年期障礙等。由於它是蜂王唯一的食物，使蜂王如此神奇的活力，堪稱珍貴的帝王食品，由於生產技術的改進及蜂種的改良使產量提高，讓蜂王漿能成為人們喜愛使用的保健聖品。蜂王漿除了上述功效外近來我們也發現其在美白及抗疲勞、抗老上具有相當不錯的療效，本文將就蜂王漿在美白及抗疲勞部份之應用與開發來說明。

## 蜂王漿美白功效

美白去黑在化妝保養品市場中一直受到東方女性的熱愛，全球美白、抗老防皺產品的市場也正在快速成長，各個國際知名藥廠或化妝品大廠紛紛推出各種以美白、抗老為主要訴求的保養品，故在開發安全且有效的美白、抗老成分就成為重要的研究方向。由於近年來天然化妝品陸續被重視、開發及應用；蜂王漿為天然的美容保養品，在美容方面也被廣泛的應用如在美白、滋潤皮膚、抗老化和化妝品原料上都有相關的產品和應用價值。

黑色素生成的路徑主要發生在黑色素路徑中(下圖一)(2)，其中酪胺酸酶扮演著非常重要的角色，酪胺酸酶主結構為雙核銅，而它的活性單位也是在銅離子，是一個氧化酶，廣泛的存在於生物體中，是黑色素生成過程中的 rate limiting enzyme，為一個重要的催化因子(3,4)。黑色素生成之前都會經過酪胺酸酶的催化反應，黑色素生成是為氧化反應，在太陽的暴曬下，紫外線中的 UVB 會促使黑色素細胞中的 L-phenylalanine 羧基化後變成酪胺酸(Tyrosine)後，開始活化酪胺酸酶(Tyrosinase)，促使酪胺酸(Tyrosine)氧化成 Dopa，再一次經過酪胺酸酶催化成 Dopachrome，而此時會化成兩個路徑，一邊是與半胱胺酸(Cysteine)作用及一連串的化學反應後，轉換為會造成黃紅色斑點的優黑素(Pheomelanin);另一路徑則是 L-Dopa 經由 dopachrome tautomerase (又被稱做 Tyrosinase related protein 2, TRP-2)及 Tyrosinase related protein 1(TRP-1)兩個酵素作用成為 Quinones 後，最後變換為會行成褐黑色斑點的褐黑素(Eumelanins)(9,10)。



圖一. 黑色素生成途徑

(<http://www.oculist.net/downat0502/prof/ebook/duanes/pages/v4/v4c038.html>)

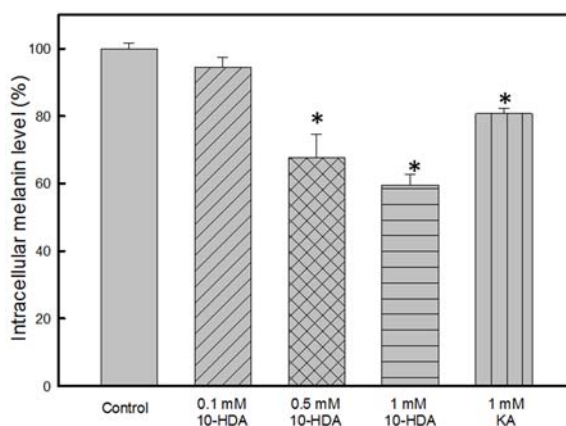
由於皮膚變黑主要是由皮膚黑色素細胞所製造黑色素(Melanin)量的多寡來決定，若黑色素細胞中的酪胺酸酶(tyrosinase)活性過高或被激活產生大量黑色素就會導致細胞變黑。因此在抑制黑色素過度生成在主要機制有兩種，一是對黑色素合成過程進行抑制作用；另外就是將黑色素細胞(melanocyte)失活或以細胞毒性將低其活性。然而黑色素具吸收紫外線輻射能簡火發炎反應(5, 6)及具SOD

(superoxide dismutase)-like 活性能清除超氧陰離子之自由基等相關生理保護作用(7)，若將黑色素細胞失活其保護作用也將消失，因此目前科學研究不由黑色素細胞失活作用著手，而是從黑色素生成途徑之抑制生成反應著手。皮膚的黑色素(melanin)的生成(8,9)主要是細胞內酪胺酸酶所控制的，酪胺酸酶會將酪胺酸(tyrosine)氧化成dihydroxyphenylalanine(即dopa)，然後dopa在轉變成dopachrome，在經一連串的氧化代謝步驟後最後形成黑色素。在這過程中酪胺酸酶催化dopa變為dopachrome示速率限制步驟(10)，因此若能抑制酪胺酸酶的活性的物質即可發展為美白劑了，其中以對苯二酚(hydroquinone)和麴酸(kojic acid)最為人所知(11, 12)，麴酸是新受認可抑制melanin生成的美白物質。除此之外目前許多研究投入開發天然而溫和的新一代功能性美白產品成分，如從天然中草藥中篩選具美白功效的物質或萃取物如大黃萃取物(13)、由構樹乾燥根以酒精所萃取的5-(3-(2,4-dihydroxy-phenyl)propyl)-3,4-bis(3-methyl-2-butenyl)-1,2-benzenediol(14)、黃芩苷與黃芩苷元(15)，此外也分別由藍綠藻(16)、苔蘚和真菌(17, 18)中分離出具抑制酪胺酸酶活性的物質。在皮膚美白尚可由切斷或減少UV刺激、消除自由基、抑制酪胺酸酶形成、抑制酪胺酸酶的活性及阻礙黑色素形成或促進行程代謝來著手。因此利用抑制酪胺酸酶來減少黑色素形成及清除自由基可做為天然物中美白活性成分的篩選模式。

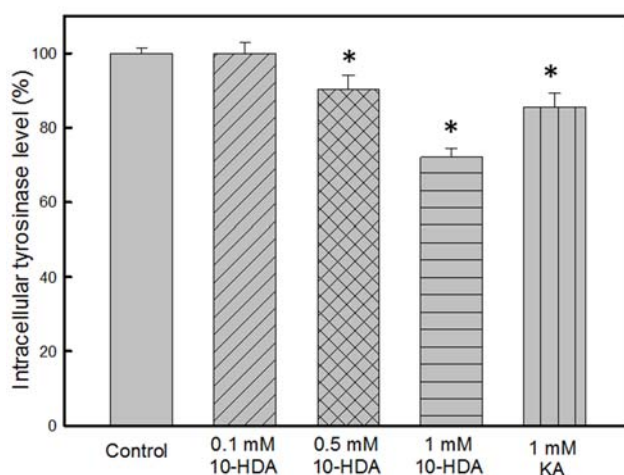
蜂王漿含有許多的維生素及無機鹽類，能促進肝醣釋放、增加代謝，可以促進表皮細胞增生、加速代謝老化角質、減少皺紋的產生及延緩皮膚的老化，同時也具有保溼的作用(1, 18)及抑制酪胺酸酶來減少黑色素形成的活性(19)，本研究團隊目前也已證實蜂王漿主要造成美白功效的因子為癸烯酸(20)。我們利用B16F10 黑色素瘤細胞探討癸烯酸(10-HAD) 美白機制，並以老鼠動物實驗驗證蜂王漿萃取物的美白功效。

首先我們必須確認癸烯酸(10-HAD)對細胞是不具有毒殺情況的，因此利用B16F10 黑色素瘤細胞驗證癸烯酸(10-HAD)的細胞毒性測試，實驗結果顯示 10-HDA 濃度範圍 0-1mM 及 1 mM Kojic acid 有著很好的細胞存活率(data not show)。因此我們藉由此濃度範圍來探討其美白活性。首先我們利用 B16-F10 黑色素瘤細胞內黑色素含量之分析來測試其抑制黑色素形成的活性，由圖二中可以發現 10-HDA 在 0、0.1、0.5 及 1 mM 時，各個濃度的黑色素含量變化依序為 100%、94.6%、67.7%及 59.6%有明顯降低的趨勢，呈 dose-dependent 的現象，且比正控制組 Kojic acid 1mM (80.7%)的效果好 (20)。因此我們進一步分析 B16-F10 黑色素瘤細胞內酪胺酸酶，由圖三結果中也發現低濃度 10-HDA 0.1 mM 及 10-HDA 0.5 mM 時酪胺酸酶含量依序為 100%及 90.4%，沒有明顯降低的趨勢，含量要在高濃度時(1 mM) 酪胺酸酶含量才有明顯降低，抑制率達 28% (20)。因此為了確認 10-HAD 的美白機制是否於其他黑色素生成途徑，利用西方墨點法來分析細胞內 MITF、TRP-1、TRP2 及 tryosinase 的蛋白質表現量，確認蜂王漿美白活性物質在美白作用機制上的功能和角色，由圖四結果中發現 MITF、Tyrosinase、TRP-

2 及 TRP-1。MITF 活性隨著 10-HDA 濃度的增加其活性越低，因此可以確定 10-HDA 在制黑色素生成的效力上具有相當的成效(20)。

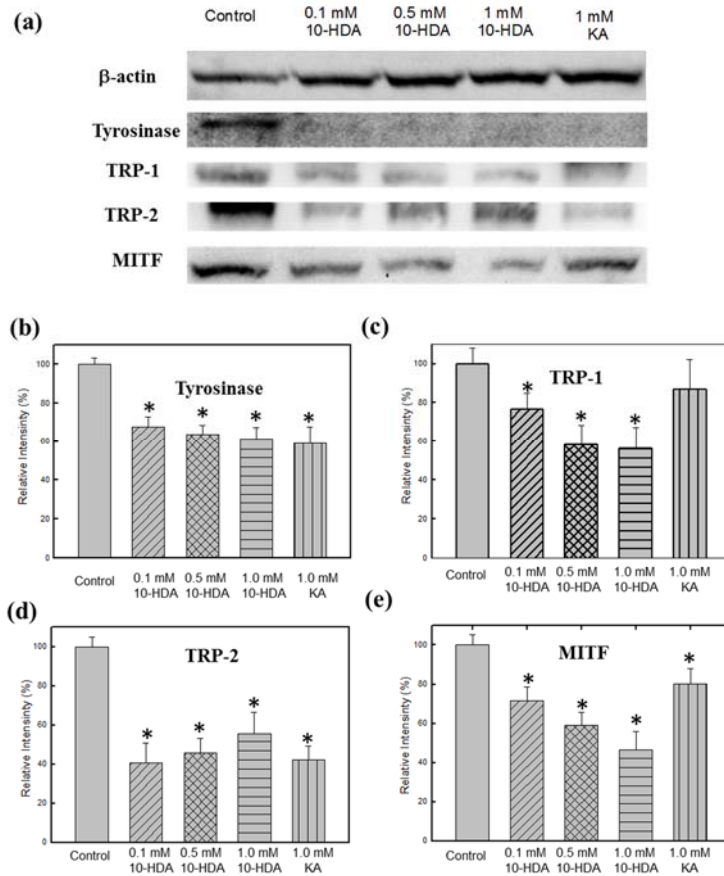


圖二、細胞內黑色素含量分析(20)。

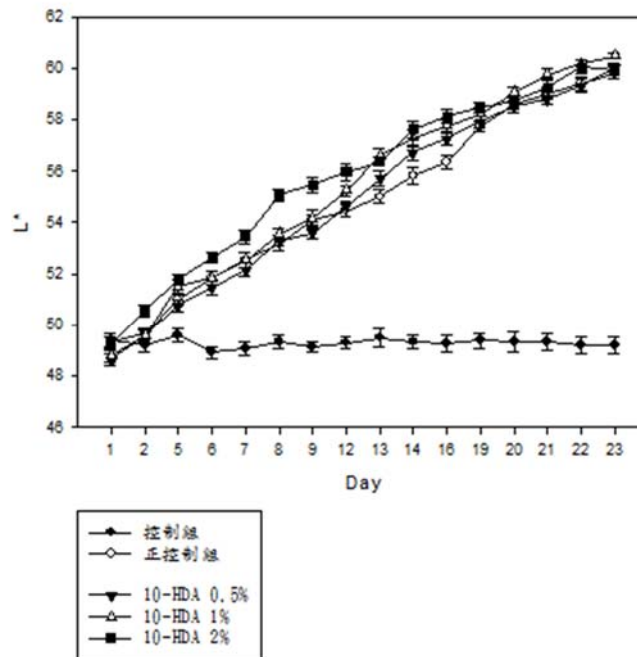


圖三、B16F10 黑色素瘤細胞內酪胺酸酶含量分析(20)。

由於在細胞的分析實驗上以驗證 10-HDA 的美白活性，為更加確認其在動物皮膚上的功效，因此我們藉由小鼠美白模式試驗來驗證，由圖五實驗結果中發現不同濃度的 10-HDA 其美白效果都是往上的趨勢，L 數值越高代表皮膚越白皙。經由上述蜂王漿癸烯酸之抗老化、防皺、美白作用的機制詳家探討分析，其是質得開發新的抗老化、防皺、美白保養品。



圖四、B16F10 黑色素瘤細胞中黑色素相關酵素群之表現(20)。



圖五、小鼠美白模式試驗結果分析圖(20)。



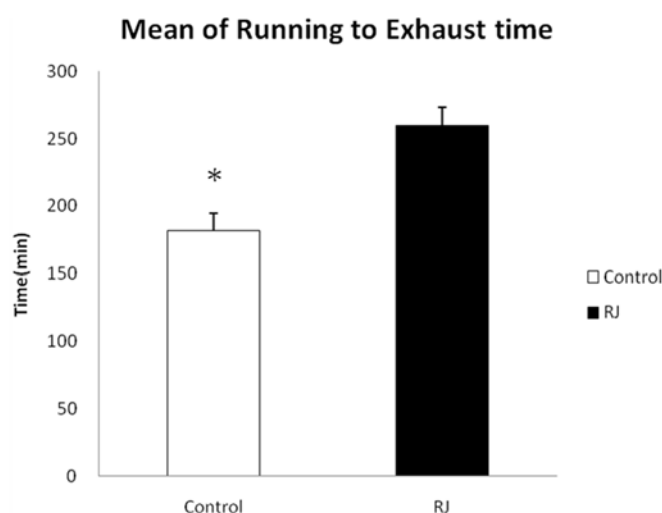
## 蜂王漿抗疲勞功效

運動選手提升成績最主要的兩個條件是運動訓練的科學性和恢復手段的有效性，因此消除疲勞、恢復體力是扮演非常重要性，人的疲勞改善液是如此。

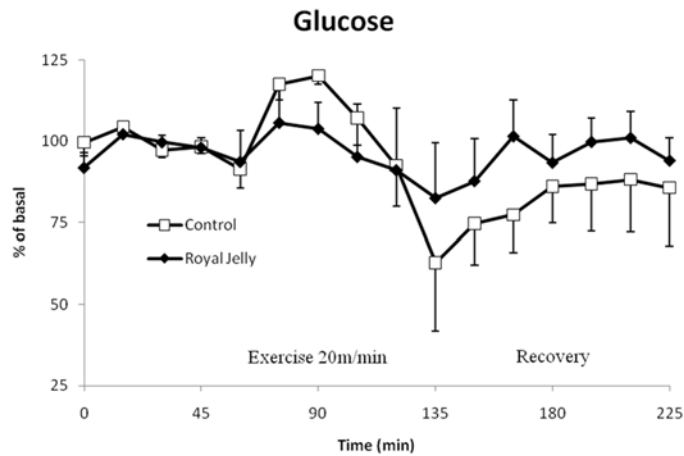
高強度運動的主要能量來自肌肉中的肝醣，但肌肉中肝醣的儲存量低(21)，當儲存於肌肉中的肝醣耗盡時，體的內能量利用會轉於脂肪酸的代謝利用，此時 ATP 的產生減少，造成疲勞產生導致運動表現降低(22)及體內的乳酸堆積。乳酸隨著運動時間及運動強度而增加，乳酸增加會解離出 H<sup>+</sup>，使得血液 pH 值降低(23)，進一步使 ATP 酶活性下降，造成疲勞產生而降低運動表現。因此，葡萄糖速率和乳酸堆積是測試運動能力重要的評估項目。

蜂王漿本身就具有抗疲勞及體能恢復的功效，但缺少了科學上的證據。因此我們利用 Sprague-Dawley 大鼠以跑步機做為運動模式進行模擬人體生理參數，以頸靜脈埋管技術進行連續採集少量血液，並分析血液葡萄糖、乳酸作為評估運動表現之生理參數(24)。

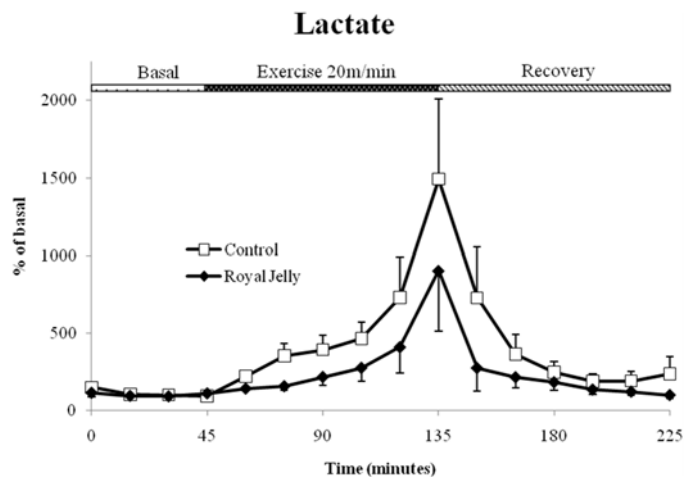
藉由老鼠運動模式的實驗結果發現有使用蜂王漿的老鼠的運動時間的長度上要比沒使用蜂王漿要長許多(圖五)。而在其血液分析發現有使用蜂王漿的老鼠在運動時其葡萄糖濃度較穩定且代謝效率也比沒使用蜂王漿者要高(圖六)，在血液乳糖的變化上可以發現使用蜂王漿者的乳糖上升程度較未使用者低，且恢復得效率也較佳(圖七)，故由此研究分析數據我們證實蜂王漿可以提高血液葡萄糖的使用效率，並改善乳酸代謝率以減緩疲勞產生，進而促進運動表現提升，因此確定蜂王漿在運動訓練之應用價值及人體抗疲勞之價值與應用。



圖六、Sprague-Dawley 大鼠跑步運動能力測試。



圖七、Sprague-Dawley 大鼠運動時血液中葡萄糖濃度變化的分析。



圖八、Sprague-Dawley 大鼠運動時血液中乳糖濃度變化的分析。

### 參考資料

1. 章加寶。蜂王漿生產與應用。1995。
2. Elias I. Traboulsi ,W. Richard Green . An Overview of Albinism and Its Visual System Manifestations .<http://www.oculist.net/downatn502/prof/ebook/duanes/pages/v4/v4c038.html>
3. Jung S, Kim DH, Son JH, Nam K, Ahn DU, Jo C. The functional property of egg yolk phosvitin as a melanogenesis inhibitor. Food Chemistry 2012, 135: 993-8.
4. Han SM, Yeo JH, Cho YH, Pak SC. Royal Jelly Reduces Melanin Synthesis Through Down-Regulation of Tyrosinase Expression. The American Journal of Chinese Medicine 2011, 39(6):1253-60.

5. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 1998, 20(9): 712-21.
6. Sato s, Yamamoto H. Development of pigment cells in the brain of ascidian tadpole larvae: insights in to the origins of vertebrate pigment cells. *Pigment Cell Res* 2001, 14(6): 428-36.
7. Chakraborty DP, Roy S, Chakraborty AK. Vitiligo, psoralen, and melanogenesis: some observations and understanding. *Pigment Cell Res* 1996, 9(3): 107-16.
8. Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol* 2003, 14(2): 57-65.
9. Halaban R. Pigmentation in melanomas: changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. *Oncol Res* 2002, 13(1): 3-8.
10. Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal Biochem* 1999, 270(2): 207-19.
11. Regnier M, Duval C, Galey JB, Philippe M, Lagrange A, Tuloup R, Schmidt R. Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis : models to study modulation of melanogenesis. *Cell Mol Biol* 1999, 45(7): 969-80.
12. Iida K, Hase K, Shimomura K, Sudo S, Kadota S, Namba T. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Med* 1994, 61(5): 425-8.
13. Jang D-I. melanogenesis inhibitor from paper mulberry. *Cosmetics and Toiletries* 1997, 112(3): 59-62.
14. Sano T, Kaya K. Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *J Nat Prod* 1996, 59(1): 90-2.
15. 李怡靜,王苑婷,莊滄婷,賴宜君,張聰民。黃芩苷與黃芩苷元美白功效之研究。弘光學報 2009, 第 59 期:106-115。
16. Senji T. Melanoxazol, new melanin biosynthesis inhibitor discovered by usig the larval Haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Antibiotics* 1996, 49(6): 513-18.
17. Mireille G, Selim K. Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 1996, 42: 935-40.
18. Takeshi N, Mizuho S, Rriji I, Hachiro I, Nobutaka S. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry* 2001,75(2):237-240.
19. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002,138(11): 1462-70.
20. Peng CC, Sun HT, Lin IP, Kuo PC, Li JC. The functional property of royal jelly 10-

- hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017, DOI: 10.1186/s12906-017-1888-8
21. Karlsson, J. and Saltin, B. Diet, muscle glycogen and endurance performance. *Journal of Applied Physiology*, 1971. 31(2):p.203-206.
  22. Pierce, G. N., Kutryk, M. J., Dhalla, K.S., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. Biochemical alterations in heart after exhaustive swimming in rats . *Journal of Applied Physiology*, 1984. 57(2):p. 326-331.
  23. Wu, M., Zhang, J.Y. and Zhang, X. Clinical observation of Flos magnoliae volatile oil nano-liposome nasal drops in treating pediatric allergic rhinitis . *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2009. 29(8): p.740-742.
  24. Powers, S.K. and Howley, E.T. *Exercise physiology - theory and application to fitness and performance* . Boston : McGraw Hill. 2009
  25. Chen HY, Cheng FC, Pan HC, Hsu JC, Wang MF. Magnesium Enhances Exercise Performance via Increasing Glucose Availability in the Blood, Muscle, and Brain during Exercise. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85486.

# 從新尼古丁藥劑事件看對蜜蜂毒性評估之不足

丁婕、楊恩誠\*

國立臺灣大學昆蟲學系

\*通訊作者：楊恩誠

電子郵件：ecyang@ntu.edu.tw

通訊地址：台北市羅斯福路四段一號

## 摘要

現行的農藥的蜜蜂毒性測定已有一定的規範和標準來量測與評估，最為各國所遵循的便是經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Co-operation and Development, 簡稱 OECD) 所公告的測試方法。自從 1994 年歐洲爆發這一波國際性的蜜蜂蜂群大量死亡消失問題以來，對於新尼古丁類殺蟲劑的蜜蜂毒性研究便在世界各國積極展開。然而傳統的標準量測方法並無法對於蜜蜂慢性毒性做出客觀的評量，導致非致死劑量或濃度的新尼古丁類殺蟲劑對蜜蜂個體與蜂群所造成的傷害無法顯現出來。直到近年從行為、生理、基因等不同層次的研究才逐漸浮現出該類藥劑對蜜蜂的毒害，其中益達胺的研究資料最多且研究的面相也最豐富。本文將概述 OECD 的測試方法與新尼古丁類殺蟲劑的非致死劑量影響，以闡述目前所施行的毒性評估方式其不足之處。

**關鍵詞：**新尼古丁、殺蟲劑、蜜蜂、非致死劑量、毒性

## 前言

一般而言，農業藥劑的開發，尤其是殺蟲劑，就是要用來殺死害蟲的藥劑。在眾多可能殺死害蟲的化學品中篩選出效率最好的來當作殺蟲劑，篩選方式是使用能夠殺死 50% 的昆蟲個體所需劑量或濃度當作評估的依據，稱為「半致死劑量」(median lethal dose, LD<sub>50</sub>) 或「半致死濃度」(median lethal concentration, LC<sub>50</sub>)。利用達到某特定的致死率所需的劑量或濃度來當作評估殺蟲劑的毒性，在實務操作上是以前所測試昆蟲的個體死亡來作為判斷的依據。如此一來，較易忽視了非致死劑量 (或稱亞致死劑量, sublethal dose) 或非致死濃度 (或稱亞致死濃度, sublethal concentration) 下可能造成昆蟲個體或族群的影響。藥劑所造成的非致死效應，則可藉由 ED<sub>50</sub>(median effective dose)與 EC<sub>50</sub>(median effective concentration) 來評估昆蟲個體成長、行為、形態是否造成影響。然而這些影響評估仍有許多遺漏之處，包括藥劑對於個體的生理、發育、行為或是族群，乃至於基因等不同層次的作用所造成的反應。評估非致死劑量下對昆蟲所造成的影響，因為知識的限界與技術上的限制，導致在測試條件上也具有一定程度的困難。若沒有對各個層面的作用進一步研究，則無法利用其反應來做 ED<sub>50</sub> 或 EC<sub>50</sub> 的量測。另一方面，也正因為如此，在探討殺蟲劑對昆蟲的作用模式 (mode of action) 或作用機制 (mechanism of action) 時，仍多為急性毒的影響為主，甚少碰觸到非致死劑量的影響或是慢性毒所造成的影響。

殺蟲劑能殺害蟲，當然也會殺益蟲。當原本發展來殺死害蟲為目的殺蟲劑碰到非目標生物時，上述未被評估過在昆蟲的不同層次上所造成的影響，則立刻讓人類知識的極限顯現出來。近二十年來，全球整體蜜蜂族群受不明因子影響而有逐漸減少的趨勢，其中以 1994 年開始在歐洲各國所發現的蜜蜂大量消失現象及 2006 年開始在美國蜂群崩解症候群 (colony collapse disorder, CCD) 最為嚴重，這些現象已喚起各界對蜜蜂族群存亡的危機意識 (Cox-Foster et al., 2007; Hayes Jr et al., 2008; Potts et al., 2010)。雖然全球蜜蜂族群下降的原因可能涉及的原因未明，但是越來越多證據指向環境中農藥的影響，尤以新型系統性尼古丁類殺蟲劑 (neonicotinoid insecticide)(Farooqui., 2013; Lu et al., 2014)。而這類殺蟲劑中又以可尼丁 (clothianidin)、益達胺 (imidacloprid) 和賽速安 (thiamethoxam) 等對蜜蜂所造成的危害最為嚴重 (Maini et al., 2010; Henry et al., 2012)。若單就 LD<sub>50</sub> 或 LC<sub>50</sub> 來判定這些殺蟲劑對蜜蜂的毒性，相較於作用在其他昆蟲，這些殺蟲劑對蜜蜂並未具有較高的毒性。然而，經過科學家二十多年來的研究，這類殺蟲劑的亞致死劑量或濃度對蜜蜂所造成的影響 (sublethal effects) 則逐漸浮現。不僅是個體層次的影響，在低於個體制死劑量或濃度的作用下也可能造成蜂群的慢性衰竭導致最終崩潰。

為了說明現行對蜜蜂的毒性測試標準不足之處，本文將先介紹目前國際上所遵循的經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Co-operation and Development, 簡稱 OECD) 公告測試農藥對蜜蜂毒性的標準方法，再以研究最多的新尼古丁類殺蟲劑為例，介紹目前已知該藥劑在亞致死劑量或濃度下對蜜蜂的多重影響。

## 農藥對蜜蜂毒性測試介紹

蜜蜂為自然界中最重要之授粉昆蟲，於農作物生產中扮演傳媒的關鍵角色，根據調查，供應全球 90 % 糧食來源的 100 種農作物中，高達 71 種必須仰賴蜜蜂授粉才能達成果實生產與採收種子 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008)；而如今蜜蜂卻暴露於大量農藥的威脅之下，現代農業廣泛地使用農藥，蜜蜂可能在外出採集時進入施用農藥的農田當中，除了立刻接觸到施藥的農作物與雜草外，同時也會攝入帶有農藥的花粉及花蜜並將其帶回巢中。在施用農藥的田間實驗中，已經證實了新尼古丁類藥物對於蜜蜂族群數目與組成造成影響 (Henry et al., 2015)。

國際上農藥毒性的判定主要依循 OECD 組織所制定的標準試驗流程進行測量。針對蜜蜂的部分可分為以下幾項：蜜蜂成蟲口服急性毒性試驗 (honey bee, acute oral toxicity test)、蜜蜂成蟲接觸急性毒性試驗 (honey bee, acute contact toxicity test)、蜜蜂成蟲慢性口服毒性試驗 (honey bee, chronic oral toxicity test) 與蜜蜂幼蟲重複暴露毒理試驗 (honey bee larval toxicity test following repeated exposure)。

以下提供各試驗項目之簡易實驗操作流程：

- 一、蜜蜂成蟲口服急性毒性試驗：將成年工蜂關入試驗用盒子飢餓兩小時後，提供 100 至 200  $\mu$ l 含有待測藥物之 50 % 蔗糖水溶液，待測藥物至少處理五個測試劑量，一組毒性參考藥物與一組未處理組。每組至少 10 隻成蜂，該試驗應重複測量三次以上。並於 4、24 與 48 小時評估死亡率及亞致死劑量 (LC<sub>50</sub>, median lethal concentration)。
- 二、蜜蜂成蟲接觸急性毒性試驗：以二氧化碳或氮氣麻醉成年工蜂後，於胸背板上滴加 1 $\mu$ l 待測藥物。待測藥物至少處理五個測試劑量，一組毒性參考藥物與一組未處理組。每組至少 10 隻蜜蜂，該試驗應重複測量至少三次。並於 4、24 與 48 小時評估死亡率及亞致死劑量。
- 三、蜜蜂成蟲慢性口服毒性試驗：將羽化後兩日齡內之工蜂關入試驗用盒子，並給予含有待測藥物之 50 % 蔗糖水溶液，進行共計 10 日之試驗期，每日記錄死亡率與行為異常，計算 10 天後之 LC<sub>50</sub>、LDD<sub>50</sub> (median lethal dietary dose)、NOEC (no observed effect concentration) 與 NOEDD (no

observed effect dietary dose)。待測藥物至少處理五個測試劑量，一組毒性參考藥物與一組未處理組。每組至少 10 隻蜜蜂，該試驗應重複測量至少三次。

- 四、蜜蜂幼蟲重複暴露毒理試驗：將一日齡之蜜蜂幼蟲移入 48 孔盤中，於第三天 (D3) 至第六天 (D6) 每日餵食含有待測藥物之幼蟲食物，以每日遞增濃度的方式餵食，並於 D6 達到累積劑量濃度。待測藥物至少處理五個測試劑量，一組毒性參考藥物與一組未處理組。每組至少 12 隻蜜蜂幼蟲，該試驗應重複測量至少三次。於試驗期間紀錄 D4 到 D8 的幼蟲死亡率並觀察藥物對幼蟲成長、行為、形態是否造成影響，並於 D15 及 D22 記錄化蛹率與羽化率。最終計算 NOEC、NOEDD、EC<sub>50</sub> 與 ED<sub>50</sub> 進行整體風險評估。

而國內之農藥對蜜蜂毒性規範由行政院農委會動植物防疫檢疫局訂立，用以測定農藥對蜜蜂之安全容許劑量，若農藥有效成分對蜜蜂造成死亡以外之影響，例如生殖發育、生長調節或其他慢性危害者，須提供「蜜蜂幼蟲口服急性毒性試驗」報告。「蜜蜂毒性之成品田間試驗」報告是以蜜蜂成蟲之農藥成品接觸急性毒性、農藥成品口服急性毒性試驗報告及田間施藥劑量，計算出風險商數 (Risk Quotient, RQ,  $RQ = \text{每公頃農藥有效成分最大施用量 (g a.i./ha)} / \text{半數致死劑量 LD}_{50} (\mu\text{g a.i./bee})$ )，若風險商數 (RQ)  $\geq 50$  須繳交田間試驗報告，或對於幼蟲生殖、發育行為等試驗結果。空中噴藥需提供殘留農藥對蜜蜂毒性試驗，試驗以成品為試驗物質。農藥理化性及毒理試驗準則可由全國法規資料庫網站查詢

(<http://law.moj.gov.tw/LawClass/LawContent.aspx?PCODE=M0140027>)。

#### 類尼古丁藥劑亞致死劑量對蜜蜂影響的研究

接受到高劑量殺蟲劑的蜜蜂可能於採蜜途中死亡，但帶有低劑量殺蟲劑的蜜蜂依然能夠回到巢內，使得此低劑量殺蟲劑得以在巢內殘留累積，甚至將含微量殺蟲劑的花粉與蜂蜜餵食幼蟲，因此環境中殘留的低劑量類尼古丁類殺蟲劑對蜜蜂的影響已逐漸被重視。殘留量分析指出花粉、蜂蜜或是蜂蠟殘當中，同時累積了多種殺蟲劑 (Mullin et al., 2010; Krupke and Long 2015; David et al., 2016)。但是於蜂巢中農藥的亞致死劑量研究卻鮮少有人研究。

已有研究證實，在農藥污染的巢片孕育的幼蟲會有延遲發育以及成蟲壽命縮短的情況 (Wu et al., 2011)。此外，蜜蜂黑王台病毒 (black queen cell virus, BQCV) 和賽果培會有加成作用進而影響幼蟲存活率 (Doublet et al., 2014)。最近的一項研究證實，美洲幼蟲病 (AFB) 的致病因子類芽孢桿菌的與亞致死劑量的大滅松或可尼丁時會產生協同作用 (López et al., 2017)。此實驗驗證了幼蟲從個體到群



體對於綜合緊迫因子產生的細胞反應，揭開了先前研究無法檢測到的殺蟲劑半致死劑量對蜜蜂族群之影響。2008年 Yang et al. 首度發表研究報告指出，只餵食 4 ng 的益達胺即可影響外勤蜂的行為，而此劑量遠低於半致死劑量 ( $LD_{50} = 118.7 \text{ ng/bee}$ )(Yang et al., 2008)。

Matsumoto (2013) 亦報導證實低劑量的可尼丁會影響外勤蜂回巢率；除此之外，蜜蜂在冬天時接受非常低劑量 (0.74 ng/bee/day) 的益達胺與可尼丁，連續 13 個禮拜後，蜂族群明顯減少了一半 (Lu et al. 2014)。這些結果都指出低劑量殺蟲劑影響蜜蜂的嚴重性。Yang et al. 於 2012 年發表研究報告指出蜜蜂於幼蟲時期接受極低量的益達胺 (0.01 ng/larva) 餵食處理下，蜜蜂仍然能羽化為成蟲，但其羽化後成蟲的嗅覺制約行為會受到影響 (Yang et al., 2012)。此外，實驗證據顯示，長期餵食含有低劑量的賽速安糖水的狀況下，蜜蜂的飛行時間與飛行距離顯著下降，這對蜜蜂的採集與歸巢效率造成影響 (Henry et al., 2012; Tosi et al., 2017)。

在 Peng and Yang (2016) 研究中，利用免疫標記蜜蜂腦內蕈狀體環狀結構，進一步顯示了亞致死劑量的益達胺影響了蜂蜜腦神經發育。此結果不止證實嗅覺學習能力與異常神經連結相關，更證明益達胺會損傷幼蟲神經系統當中嗅覺與視覺神經相關區域的發育。為了揭開亞致死劑量益達胺對蜜蜂幼蟲造成的可能影響，Wu et al. (2017) 研究剛羽化的蜜蜂頭部全基因組表現狀況，證實暴露於亞致死劑量的益達胺會引起多種生理變化，包含影響了解毒、免疫、感覺、神經元發育、代謝、線粒體以及蜂王漿的合成。

## 討論與展望

從上述亞致死劑量對蜜蜂的影響研究中，不難發現即使在非致死劑量或濃度下，益達胺所造成的影響層面皆與原先新尼古丁類殺蟲劑的作用模式或作用機制相去甚遠。根據 Insecticide Resistance Action Committee (簡稱 IRAC) 對於殺蟲劑的作用模式分類，益達胺是屬於「菸鹼素性乙醯膽鹼受體競爭性調節劑」中 4A 類的新尼古丁殺蟲劑。這類殺蟲劑可與菸鹼素乙醯膽鹼受體結合，而使神經細胞膜上鈉離子通道持續打開，鈉離子持續進入神經細胞內而導致神經持續產生動作電位，最後蟲體因神經過度興奮而亡。現今的研究發現，亞致死劑量的益達胺作用在蜜蜂幼蟲並沒有讓幼蟲因神經過度興奮而死亡，反倒是影響了神經發育，甚至免疫系統及能量代謝系統等。這樣的結果極可能造成蜂群未來遭受病原菌攻擊時容易得病，或過冬時無法正常產生熱量來保持蜂群內的溫度。不幸的是，即使越來越多的科學證據支持著殺蟲劑慢性毒害可能對蜜蜂蜂群健康的影響，但是當檢視蜂群因病或失溫而衰竭崩潰之時，通常首先被排除的因子卻是殺蟲劑。

自從 2006 年蜜蜂基因體解序之後，比較蜜蜂與其他昆蟲之基因體發現，其相較於甘比亞瘧蚊 (*Anopheles gambiae*) 與果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之基因體演化速率慢，擁有較少數量的解毒基因與免疫基因 (Consortium, H.G.S., 2006; Evans et al., 2006)，顯示出蜜蜂並非像一般害蟲擁有極強的環境適應力，對於環境作物中日漸增加的農藥濃度，恐怕會危害其生存。以目前 OECD 的測試標準來看，雖然對於蜜蜂幼蟲慢性毒性有量測的標準，但是並無檢測蜜蜂幼蟲中毒之後發育成蟲的行為功能有檢測方法，這和目前越來越清楚的科學證據是有差距的，因此未來在判定農藥對蜜蜂健康的影響方面仍有很大的發展空間要努力。

過去五、六十年來，人類在地球上所施用的化學藥物的種類之多、數量之大，前所未有。這無疑是以化學藥物對自然界生物進行一場大規模的「人擇」的過程。目前已知在自然界中族群數量銳減的昆蟲並非只有蜜蜂，甚至有些種類的熊蜂在短短二十年內就已經滅絕 (Grixti et al., 2009)。農藥對於蜜蜂的慢性毒害所造成的影響無疑是一個警訊。最近的研究也顯示，過去未知的慢性毒害不只對蜜蜂族群有影響，對其他非昆蟲的動物亦然。例如，調查發現，在有益達胺污染的水源附近被發現鳥類、魚類、爬蟲類都有較易受病原菌攻擊的傾向，顯示這些動物的免疫力受到藥劑污染水源而下降 (Mason et al., 2013)。人類於自然環境中施用藥劑的行為實在需要更謹慎才是。

## 引用文獻

- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briesse T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WL. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318:283-287.
- David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D. 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ Int* 88: 169-178.
- Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RFA, Paxton RJ. 2014. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol* 17: 969-983.

- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Hultmark D. 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15: 45-656.
- Farooqui T. 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochem Int* 62:122-136.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. initial survey of good practices. from [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Biodiversity-pollination/SURVEY\\_DEC\\_08\\_Small.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Biodiversity-pollination/SURVEY_DEC_08_Small.pdf)
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68: 10-821.
- Grixti JC, Wong LT, Cameron SA, Favret C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol Conservat* 142: 75-84.
- Hayes Jr J, Underwood RM, Pettis J. 2008. A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PloS one* 3:e4071.
- Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350.
- Henry M, Cerrutti N, Aupinel P, Decourtye A, Gayrard M, Odoux JF, Pissard A, Rüger C, Bretagnolle V. 2015. Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proc. R. Soc. B* 20152110. doi:10.1098/rspb.2015.2110
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931.
- Krupke CH, Long EY. 2015. Intersections between neonicotinoid seed treatments and honey bees. *Cur Op Ins Sci* 10: 8-13.
- López JH, Krainer S, Engert A, Schuehly W, Riessberger-Gallé U, Crailsheim K. 2017. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Sci Rep* 7: 40853.
- Lu C, Warchol KM, Callahan RA. 2014. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *B Insectol* 67: 125-130.
- Maini S, Medrzycki P, Porrini C. 2010. The puzzle of honey bee losses: a brief review. *B Insectol* 63:153-160.
- Matsumoto T. 2013. Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. *B Insectol* 66: 1-9.

- Mason R, Tennekes H, Sánchez-Bayo F, Jepsen PU. 2013. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J Environ Immunol Toxicol* 1: 3-12.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5: e9754.
- Peng YC, Yang EC. 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci Rep* 6: 19298.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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* 7:49472.

# 採蜜前蜂群的管理

鄭金崑

台灣養蜂協會理事長

電子郵件：taiwan.bee40@yahoo.com.tw

通訊地址：台中市柳川西路二段 40 之 1 號 2 樓

## 摘要

採蜜期前，先挑選優良、強勢的蜂群數箱，仔細觀察其清潔能力，從中選擇清潔能力強的蜂群，做為育王的蜂種。這期間，如果外界環境的粉蜜源不夠充足，應適當餵食人工花粉，促使蜂王產卵，並維持整體蜂群強勢。大約在採蜜期前 2 個月開始，應加強蜂群的巡查整理，包括割除巢片中過多的雄蜂蛹，自然王台，查看蜜粉源是否足夠，以及有觀察無蜂蟹蟎為害。如果發現蜂蟹蟎，應立即進行防治，以免蜂勢轉弱，影響採蜜能力。必須注意的是，採蜜期前要停止用藥，以免影響蜂蜜品質。

## 序言

採收蜂蜜，尤其是荔枝與龍眼花蜜，是台灣蜂農一年之中最重要的工作，也是最主要的經濟來源。每年 3-4 月間荔枝、龍眼花蜜的採收結果，幾乎決定多數蜂農整年度收入的盈虧，重要性不言可喻。荔枝與龍眼花蜜的收成，天候因素的影響最為關鍵。如果溫濕度、降雨等條件適當，荔枝與龍眼樹開花茂盛，花朵流蜜量大，蜜蜂採收花蜜，成果自然豐碩。其次，蜂群健康情形，族群數量，以及採蜜能力等等，都與當年度蜂蜜採收結果，關係密切。筆者從事養蜂 30 年，歷經艱困的摸索期，常常在採蜜期鎩羽而歸。之後，經父執輩與養蜂先進指導，終於得到一點點採蜜前蜂群管理心得，謹歸納如下：

## 蜂王的更換

在每年入秋時，挑選優良的蜂種，更換蜂王，保持蜂王的年輕，對於往後的採蜜量，至為重要。因為年輕的新王產卵力佳、費洛蒙強，可以使得蜂群持續維持強勢；強勢的蜂群相對健康，蜂群活動力佳、不易染病。反之，如果未汰換老舊的蜂王，產卵力不佳，會使得繁殖期蜂群的成長速度緩慢，到了採蜜期蜂群仍無法達到強勢。在蜜蜂數量不足的情況下，自然無法採到大量蜂蜜。

## 人工花粉的補充

如果外界天然粉蜜源缺乏時，會造成蜂王在採蜜期前，不敢大膽放心的產卵，直接影響到採蜜期蜂群蜜蜂數量，以及蜂蜜的採收量。一般而言，油菜花開花期結束之後，外界的粉蜜源就相對不足。此時，應該開始餵養人工花粉，使蜂王能放心的產卵，工蜂也不用四處勞累，採集花粉及蜂蜜來餵養蜂巢中的幼蟲，整體蜂群才能達到強勢，到了採蜜期，蜂蜜採收量相對會提高。

## 蜂蟹蟎防治

蜂蟹蟎，是台灣義大利蜜蜂的頭號殺手。如果沒有採行適當的防治措施，降低蜂蟹蟎族群數量，不可避免地會造成蜜蜂翅傍畸型、爬蜂的疫情，縱然是強勢的蜂群，在短時間內也會迅速轉為弱群。嚴重的話，到了採蜜期，將血本無歸。依經驗觀察，蜂蟹蟎在入秋時會大量繁殖，此時為防治的必要時機。目前國內防治蜂蟹蟎，只有一種推薦用藥，建議依該藥劑的使用方法進行防治。當然，採蜜期前一定要停止用藥，以免影響蜂蜜品質。另外，防治期間如果沒有將雄蜂蛹割除，防治效果也會大打折扣。筆者觀察，如果防治期間雄蜂蛹未割除，到了防治期結束，雄蜂蛹裡面曾發現高達 6、7 隻成年的蜂蟹蟎。這些殘存的蜂蟹蟎，短時間內就能壯大族群數量，再度危害蜂群，籲請蜂友應特別注意。

## 蜂箱的清潔

採蜜期前，應注意蜂箱底部維持清潔。尤其是中北部地區，天氣原本較多雨潮溼，容易使得蜂箱內溼氣重，孳生病菌，相對導致蜜蜂身體虛弱，戰鬥力無法持續。其次，蜂箱底部環境不清潔，也可能在抖蜂時，造成蜂王落箱時損傷，尤應防範。另外，在蜂蜜採收時期，應隨時檢查蜂箱底部，切勿讓底部的違章建築過高，否則，抖蜂後容易有大量蜜蜂堆疊於蜂箱內部，以致於在放下空巢片時，蜜蜂受擠壓而損傷。

## 巢片的更換

蜂群在漸漸強勢過程中，違章建築也開始隨之增加，此時，可以視蜂群中蜜蜂的數量，適度增加新巢礎片。此新巢片能夠增加採蜜期的儲蜜空間，同時，蜂王產卵在新巢片中，羽化後的蜜蜂體型相對較大，有利於提高採蜜效能。其次，汰換老舊巢片，可以使得蜜蜂在搬遷時，肩挑蜂箱的工作人員負擔減輕；採蜜期間，內場的工作人員負擔的手提重量，也同時減輕。

## 結語

採蜜期前 2 個月，應開始加強蜂群的檢查與管理，漸次培養蜂群進入強勢狀態。期間應更仔細檢視蜂群狀態，增加檢視頻度，包括檢查自然王台，查看蜜粉源是否足夠，儲蜜量過多或過少，隨時因應蜂群需要，增加或減少糖水的飼養，或是補充人工花粉等。

另外，審慎選擇採蜜地點，也是攸關採蜜成敗的重要因素。尤其，蜂群移入採蜜場域後，應隨時保持警戒，嚴密掌握附近農作物噴灑農藥情形，如有發現蜜蜂中毒現象，應立即遷移蜂箱，以避免蜜蜂農藥中毒情形加劇，使得蜂群喪失採蜜能力，甚至遭致滅巢的慘劇，幾近一年的辛勞，付諸流水。

# 設施栽培蜜蜂授粉效益與技術

徐培修\*、盧美君

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

\*通訊作者：徐培修

電子郵件：pshsu@mdais.gov.tw

通訊地址：苗栗縣公館鄉館南村 261 號

## 摘要

氣候易變及病蟲害相複雜為農作物種植重要限制因子，為提升競爭力，設施栽培日漸興起，藉以提高產量、改善品質及穩定生產。惟設施內缺乏授粉媒介，為節省勞力降低成本，本研究針對高經濟價值的大果番茄、草莓及苦瓜調查蜜蜂 (*Apis mellifera*) 應用於設施栽培之效益。結果顯示設施大果番茄栽培適用蜜蜂授粉，可取代著果劑施用，優於人工授粉，但果實風味及品質無顯著差異；設施草莓栽培非常適用蜜蜂授粉，優於人工授粉，可大幅提升果實產量，且果實品質較佳；設施苦瓜栽培適用蜜蜂授粉，可取代人工授粉，且果實品質較佳。本研究提供授蜂群管理技術說明，包括隔離外勤蜂以減少衝網之處理方式、水源供應方式、蜂群結構及巢脾配置概念及延長授粉效期之管理方式等。

**關鍵詞：**蜜蜂、授粉、設施栽培



## 前言

氣候日漸嚴峻，為降低環境對作物的負面影響，許多作物的種植方式由露天栽種轉為利用設施栽培。在溫網室的輔助下有利於妥善調控環境因子，提供作物最佳生長條件，進而提高農產品品質，並達到穩定生產的目標。精緻化的溫網室農業是近年主流，但相對設施栽培隔絕自然授粉條件，如風、水及昆蟲等媒介，因此過去農民必須採用人工授粉，費工費時且成本昂貴，以致設施內授粉技術成為現今重要議題。

Klein 等人於 2007 年依據聯合國糧農組織統計資料分析，世界主要農作物約有 85% 仰賴蜂類(Hymenoptera: Apidae)授粉。蜂類授粉意指蜂隻採蜜或採粉時，沾附雄蕊散出之花粉將其傳播至雌蕊柱頭，進而使胚珠受精的過程。Gallai 等人於 2009 年調查蜂類授粉對全球農業經濟影響每年高達 1,530 億歐元，佔食用農產品總產值 9.5%。所以蜂類可稱為世界上最重要的授粉昆蟲，而臺灣普遍飼養之經濟蜂種為西洋蜂(*Apis mellifera*)，為取代設施內人工授粉之最佳潛力資源。

## 設施栽培現況

農委會近年致力推動設施栽培並輔導產業轉型精緻化生產，吸引更多農民投入現代化生產體系。農業設施栽培主要包括隧道棚、水平棚架、網室及溫室等，根據主計處統計，近十餘年來全臺設施栽培面積由 11,631 公頃增加到 30,726 公頃，成長 2.6 倍，設施栽培農戶數由 14,523 戶增加到 48,016 戶，成長 3.3 倍。半露天的棚架多數用於果樹類生產，以梨、柿、木瓜及棗為大宗，溫網室多數用於瓜果類生產，以瓜類及茄科為主，少數種植草莓，這些作物多半屬於需要藉由外力授粉才能正常結果的物種，雖然人工授粉已行之有年，但是農業人力資源匱乏且工資昂貴的問題卻益發明顯。因此授粉為目前設施栽培增加產量的瓶頸之一，為了省工並降低成本，利用西洋蜂授粉技術的需求隨之應運而生。

## 蜜蜂授粉效益

本場針對高經濟價值的大果番茄、草莓及苦瓜進行實驗調查，評估蜜蜂授粉應用於設施作物栽培的效益。大果番茄品種「桃美」具有自花授粉不親和的特性，自然著果率極低僅約 8%，人工授粉效果亦不佳僅有 43%，因此農民多半不採用此方式授粉，坊間慣用僱工噴施番茄生長素促使其單偽結果，實驗顯示效果極佳可達 89%，而應用蜜蜂授粉亦可大幅提升著果率達 92%，效果與施用藥劑無顯著差異，優於人工授粉 2 倍以上，遠高於自然著果率 10 倍以上(表一)。本實驗各處理均未產生畸型果(表一)，前人研究噴施生長賀爾蒙較易使番茄產生畸型果，但通常須伴隨高溫環境，因此以夏季發生為嚴重，本實驗期間為冬季，推測低溫環

境不易產生畸型果。本實驗各處理之果實品質及風味間均無顯著差異(表一及表二)，除藥劑處理之果實並不產生種子，其餘無論在糖度、酸度、糖酸比、果重、果長、果寬及長寬比等各項果實性狀方面均雷同，顯示此番茄品種一旦成功授粉，即可產出穩定品質之果實，因此提升著果率即可提升產量。

草莓品種「豐香」可自花授粉，但是自然著果率低僅約 59%，人工授粉效果可提升至 75%，而應用蜜蜂授粉則可 100% 完全著果，進一步分析更發現，於設施內自然畸果率高達 81%，人工授粉仍有 40% 畸形果實，然而蜜蜂授粉則完全沒有畸形果實(表三)。此外，比較果實品質發現，在果重、果長、果寬及種子數等各項性狀方面，實驗各處理間具顯著差異，蜜蜂授粉的果實重量最高、大小最大且種子數最多，人工授粉次之，無授粉果實品質最差，不過在果實風味及長寬比數據顯示實驗各處理間無顯著差異(表三及表四)，顯示蜜蜂授粉非常適合設施草莓栽培，可大幅提升果實產量，且果實產值應較高。

苦瓜品種「蘋果」為異花授粉，自然著果率為 0%，代表此苦瓜品種一定要藉由外力授粉才有產出，因此坊間慣用僱工授粉，實驗顯示效果極佳可達 87%，而應用蜜蜂授粉亦可達 87% 著果率，此兩種授粉方式並無顯著差異(表五)。進一步比較果實品質發現，蜜蜂授粉後果重及果實大小均顯著高於人工授粉，而果形則無顯著差異，以果重為例，蜜蜂授粉後果實重達 565g，顯著高於人工授粉果實 390g，約可增加果實重量 45%，顯示蜜蜂授粉不但為取代人工授粉的可行方式，還可提升果實品質(表五)。

## 授粉蜂群之管理

因溫室一般非開放空間，若冒然將蜂群移入設施內，易因不適應狹小環境衝網而折損蜂勢。為達最佳授粉效果，應事先隔離原巢中外勤蜂，促使原巢中內勤蜂分工重組，因自設施內成長之外勤蜂較能熟悉溫室內之光度及空間飛行模式，藉由蜂群馴化處理，即可減少衝網。外勤蜂隔離方法為日間將蜂群先行搬離原位 5 公尺以上，傍晚再將授粉蜂群移入設施內。蜂群移入時機為花期前 2 至 5 日，移入後通常會有 1 至 2 日環境適應期，之後蜂群便會開始進行授粉工作。

溫室內必須提供乾淨水源供蜜蜂飲用，水面上盡可能養殖浮萍或水芙蓉等植物，使蜜蜂採水時有合適立足之地，根據觀察蜜蜂喜好於輕微震動的淺層水面採集，因此水源供應最好由細小流量的水龍頭低落或水管釋出，流動的水源也較容易保持清潔使藻類生長不易。

蜂群於移入前須進行檢查，確定蜂后健康，產卵正常，並提供子脾、封蓋子脾及蜜粉脾使蜂勢結構完整，而其中子脾為授粉蜂群最重要的元素，因內勤蜂哺育幼蟲的食物成分主要為花粉，蜂群內幼蟲的數量與外勤蜂採集花粉的頻率間有

正相關性；封蓋子脾則是內勤蜂的補給元件，須謹記蜂多於脾的概念，工蜂數量足夠才能確保蜂群正常運作；蜜粉脾為食物來源，然而因設施內食物來源有限，蜜粉源經常不足，蜂箱內必須定期提供充足糖水及花粉來維持蜂勢，尤其花粉需求特別大，必須確保幼蟲及年輕的內勤蜂食物充足，才得以延長蜂群授粉效期。此外，當蜂后不適應環境時產卵數可能驟降，須每週檢察蜂王產卵情形，如發現異常減產，2週後務必要補充即將羽化之蜂蓋子脾加強蜂勢，否則容易出現工蜂斷層，進而導致蜂群快速衰弱滅亡。

## 結語

將西洋蜂引入溫網室內授粉，可提升多數作物的著果率，減少畸形果產生，提升產量及產值，更可減少授粉成本，人工授粉成本每月每公頃超過8千元，甚至達36千元，而西洋蜂授粉成本每月每公頃約2千元至5千元，將成為設施栽培授粉的好幫手。我國設施栽培面積逐年增加，精緻化種植的蔬果品質好，深受消費者喜愛。利用蜜蜂取代人工授粉，可降低生產成本，並提升果品品質，減少化學著果劑施用，健全友善環境發展，為專職設施栽培農民應具備的技術。

表一、大果番茄蜜蜂授粉實驗各組處理之畸果率、著果率及果實風味比較表

處理	著果率(%)	畸果率(%)	果實風味		
			糖度(°brix)	酸(%)	糖/酸
蜜蜂授粉	92±1.62 a	0 a	4.5±0.3 a	2.5±0.1 a	1.8±0.1 a
藥劑施用	89±3.63 a	0 a	4.5±0.3 a	2.5±0.2 a	1.8±0.2 a
人工授粉	43±7.4 b	0 a	4.5±0.5 a	2.4±0.2 a	1.9±0.2 a
自然著果	8±3.71 c	0 a	4.6±0.3 a	2.5±0.2 a	1.9±0.2 a

數值表示為平均值±標準誤差，不同英文字母代表 LSD 分析具顯著差異(P<0.05)。

表二、大果番茄蜜蜂授粉實驗各組處理之果實品質比較表

處理	果實品質				
	果重(g)	果長(cm)	果寬(cm)	長/寬	種子數(個)
蜜蜂授粉	202±6 a	7.3±0.09 a	7.1±0.07 a	1.02±0.004 a	57±2.89 a
藥劑施用	202±6.2 a	7.1±0.09 a	6.9±0.07 a	1.02±0.005 a	3±0.76 b
人工授粉	185±8.9 a	7.2±0.13 a	7±0.1 a	1.05±0.021 a	53±5.41 a
自然著果	183±14 a	7.2±0.23 a	7±0.2 a	1.03±0.012 a	56±7.98 a

數值表示為平均值±標準誤差，不同英文字母代表 LSD 分析具顯著差異(P<0.05)。

表三、草莓蜜蜂授粉實驗各組處理之畸果率、著果率及果實風味比較表

處理	著果率(%)	畸果率(%)	果實風味		
			糖度(°brix)	酸(%)	糖/酸
蜜蜂授粉	100±0 a	0±0 a	9.3±0.38 a	2.18±0.05 a	4.27±0.13 a
人工授粉	75±28.87 ab	40±25.82 b	9.28±0.33 a	2.13±0.14 a	4.37±0.4 a
自然著果	58.75±30.38 b	81.28±13 c	9±0.07 a	2.11±0.17 a	4.28±0.36 a

數值表示為平均值±標準誤差，不同英文字母代表 LSD 分析具顯著差異(P<0.05)。

表四、草莓蜜蜂授粉實驗各組處理之果實品質比較表

處理	果實品質				
	果重(g)	果長(cm)	果寬(cm)	長/寬	種子數(個)
蜜蜂授粉	16.89±1.56 a	45.56±2.43 a	32.64±1.52 a	1.4±0.03 a	270±18 a
人工授粉	11.79±1.4 b	38.72±4.05 b	28.87±1.25 b	1.35±0.14 a	219±9 b
自然著果	6.88±1.77 c	32.26±4.07 c	24.36±2.89 c	1.33±0.09 a	164±19 c

數值表示為平均值±標準誤差，不同英文字母代表 LSD 分析具顯著差異(P<0.05)。

表五、苦瓜蜜蜂授粉實驗各組處理之畸果率、著果率及果實品質比較表

處理	著果率(%)	果實品質			
		果重(g)	果長(cm)	果寬(cm)	長/寬
蜜蜂授粉	87±11.5 a	565±98 a	16±2.7 a	10±0.8 a	1.6±0.3 a
人工授粉	87±5.8 a	389±115 b	13±2.3 b	8.5±1.2 b	1.6±0.3 a
自然著果	0 b	0 c	0 c	0 c	N/A

數值表示為平均值±標準誤差，不同英文字母代表 LSD 分析具顯著差異(P<0.05)。

# 四十五年前臺灣的養蜂事業

安 奎

臺灣蜜蜂與蜂產品學會 榮譽顧問

臺灣早期養蜂事業的發展，在與何鎧光名譽教授共同著作《養蜂學》已有記述(安、何，1997)。退休後，再彙整 1918 年至 1972 年的珍貴資料，以時間軌跡及蜂產品產銷為主軸，增補四十五年前養蜂事業的發展。

## 1. 臺灣最早的養蜂機具展

1918 年(大正 7 年)10 月，日治時代的「臺灣商工協進會」，在台北市主辦大型博覽會及展售會，會中設有日本全國各縣市展品的獨立展覽館，展出多種產品包括機械類及養蜂機具等。臺灣各地蜂友前往參觀，展覽場中日本名古屋岐阜縣的渡邊養蜂場，展示 12 群意大利蜜蜂、製造巢礎機、多種養蜂器具及相關書籍。嘉義市的漢文老師連往、諸峰醫院張錦燦醫師及陳朝 (陳源祥之父)，共同買下展場中的 12 箱蜜蜂。林涂 (林宜鐘之父)及林瑞朋 (林華山之父)，合資買進手搖製作巢礎機。就此，引進優良蜂種及養蜂器具，將臺灣的養蜂事業發展向前推進一大步。

## 2. 臺灣最早的迷你書《蜜語》

1934 年 (昭和九年) 7 月 20 日，故友李錦洲尊翁李炳生先生出版《蜜語》迷你書(圖 1)，只有 9.7 X 15.3 公分，24 頁(圖 2)。該書是收存臺灣養蜂早期資料中，最早又最小的一本好書。當年養蜂事業的主要蜂產品，只有蜂蜜。李老先生的養蜂場頗具規模(圖 3、4)，並很重視蜂蜜的品質，所生產的蜂蜜都要送臺灣總督府中央研究所檢驗，並附成績書(圖 5)及成績表(圖 6)，敬業經營並深具遠見。李老先生不但博覽養蜂相關書籍，而且嫻熟中國古代蜂蜜醫書，例如神農本草經、陶宏景名醫別錄、李時珍本草綱目、汪訥庵本草備要、張仲景傷寒論等，並涉獵國外書籍，如美國魯特公司 (A. I. Root)出版的 ABC and XYZ of Bee Culture。

書中記述，蜂蜜與人參、砂糖及飴糖等的分析比較，根據學理闡述對人體的健康。另有蜂蜜成分介紹及蜂蜜品質鑑別等，期望大家了解蜂蜜對人體的益處。雖然這是一本迷你小書，但是內容頗具深度，誠屬難能可貴。也從書中得悉，臺灣的「假蜜」問題由來已久。(李炳生，1934)

## 3. 嘉義市成立蜂蜜運銷合作社

1945年三宜養蜂場林宜鐘，前往日本名古屋渡邊養蜂場，學習製造巢礎技術，因此奠定臺灣生產巢礎及經營養蜂器具的基礎。由於嘉義及鄰近地區有龍眼、柑橘等多種重要蜜源植物，再加上不斷改善養蜂器材，使嘉義成為臺灣養蜂事業的發展重鎮。

光復以前，全省蜂群約1萬箱。1949年臺灣蜂群的數目約有六、七千箱。據嘉義蜂友經驗，以前可使用繼箱採蜜，此期已經無法使用。因飼養蜜蜂搬運不便、飼養技術不良。專業蜂友均實行轉地飼養，蜂箱搬運到養蜂的山坡地區，交通工具困難，均以人力挑運。每人可挑4箱8框蜂箱，10框蜂箱僅可挑2箱，挑4箱則過重。當年一些蜂友有迷信心理，在舊式蜂箱上貼佛符或令旗，壓制蜂群不要逃蜂。當年已經有學校重視飼養蜜蜂，台中女中曾經購買數箱蜜蜂，鼓勵學生在校園飼養蜜蜂。可是蜂蜜仍是高貴補品，食用者少、銷售困難，養蜂事業僅能勉強維持。(林珪瑞，1953)

臺灣光復後，「嘉義市蜂蜜運銷合作社」在政府農政單位輔導下，於1953年11月25日成立，是臺灣第一個蜂友籌組的合作社，會址在嘉義市中正路165號。成立的宗旨是促進社員生產技術，提高品質，使蜂產品達到國際水準。期望能貢獻給社會大眾，享用最優良的天然蜂蜜。創始社員46人，蜂群6,750箱，是全省最大的蜂蜜合作社。理事長是賴張明喜，理事陳朝、林宜鐘、莊金波、蘇華章、魏日德、李漢、吳源福及陳源祥。監事長是林滄州，監事吳壬貴及林東水。(陳源祥，1977)

1956年7月日本井上晃(圖7)拜訪「嘉義市蜂蜜運銷合作社」，帶來「採收蜂王乳技術」影片，指導臺灣蜂友生產蜂王乳(陳源祥，1977)。這是臺灣生產蜂王乳的起源，為養蜂事業引進新的蜂產品，也帶來一番新氣象。

1960年前後，有蜂王乳丸劑自國外進口，輿論質疑，蜂友反對，許多人撰文否認蜂王乳的功效。1961年在縣政府合作股的陳榮松博士企畫下，嘉義市蜂蜜運銷合作社代表臺灣，第一次外銷法國20噸蜂蜜。早年越南總統來台訪問時，我國贈送給越南政府農務部110箱蜜蜂，也是由該合作社提供的。1961及1962年間，臺灣蜂友開始採收新鮮蜂王乳，量產上市。1964年臺灣蜂王乳年產50公斤(Inoue & Inoue，1964)。

1962年臺灣蜂群的數目約有三萬箱，西方蜜蜂約二萬箱、在來種約一萬箱。分布嘉義、屏東最多，依次為台南、彰化、苗栗、台東、台中、台北等縣市。專業蜂場有10餘家，飼養約300箱。副業養蜂約5~6群至20~30箱。專業蜂友遷移蜂群追逐花蜜，副業蜂友則定點飼養。以50~70箱的養蜂場估計，每年可採收1,800~2,000公斤蜂蜜(洪鍾銓，1962)。

嘉義市蜂蜜運銷合作社於 1964 年獲得合作社獎，1967 年、1971 年、1975 年及 1979 年獲得縣長獎。1984~1990 年獲得嘉義市長獎。歷年合作社辦理的蜂產品展售會，承蒙副總統謝東閔 (圖 8)、省主席邱創煥 (圖 9)、嘉義市長張博雅 (圖 10)、嘉義縣長林金生 (圖 11)、農林廳長余玉賢 (圖 12) 及台北果菜公司總經理陳榮松 (圖 13) 等長官們參觀指導 (陳源祥，1977)。合作社的貢獻頗受政府各級首長重視，珍貴照片為早期養蜂事業發展留下見證。

#### 4. 最早在國際養蜂會議的論文

范宗德先生是一位傳奇性人物，自空軍中校退伍後，在台北縣山區飼養蜜蜂。由於精通英文，訂閱美國、英國養蜂學專業雜誌及學刊，並博覽英美養蜂重要書籍。1956 年 3 月 24 日在維也納舉行的第 16 屆國際 Apimondia 養蜂會議中，發表「中國蜂禦敵及通風」論文。這是收存臺灣養蜂資料中，最早在國際養蜂會議發表的報告。范先生又將教皇批護 12 世，於 1958 年 9 月 23 日在 17 屆在羅馬國際養蜂 Apimondia 會議的致詞全文，翻譯成中文。兩篇譯文皆附錄於《蜂話》中 (范宗德，1956)。

1959 年 8 月 3 日，范先生出版臺灣第一本中文版養蜂專書《蜂話》。全書分為蜜蜂、養蜂及蜂蜜三篇，蜜蜂篇包括蜂種由來、養蜂的價值、蜜蜂的視覺、蜜蜂的嗅覺及味覺、蜜蜂的語言、蜜蜂的生活、工蜂分工的依據及蜜蜂的生育；養蜂篇包括養蜂始業、蜂群管理及進修；蜂蜜篇包括蜂蜜的成分與性質、蜂蜜對人體的功效、蜂蜜的醫學價值、蜂蜜的古代記載及蜂蜜的吃法。此外，范先生於 1958 年 9 月 16 日在臺灣新生報，發表「蜂蜜的真假及辨別法」。同年 11 月 9 日在臺灣新生報，發表「蜜蜂的舞」。1959 年 11 月 2 日在臺灣新生報，發表「蜜蜂怎樣釀製蜂蜜」。1960 年 4 月 8 日在中央日報，發表「蜜蜂的文化」。同年 7 月 29 日在中央日報，發表「蜂后的交替與分封」。

1967 年范先生在科學農業，發表翻譯的「蜜蜂卵研究之新發展」(范宗德，1967a)。1967 年 9 月 6 日出版《現代養蜂法》，也是一本養蜂專書。全書分為十篇，包括養蜂的目的、蜜蜂的生活、養蜂場、蜂群管理、四季管理和採收蜂蜜、天然分蜂及防止法、人工養王、花蜜及蜜源植物、生理及病蟲害、蜜蜂的銷售。由內容可知，本書是針對初學養蜂的一本寶典(范宗德，1967b)。作者 1967 年，在國立中興大學昆蟲系選修貢穀紳教授開授的「養蜂學」時，同學們都以《現代養蜂法》為重要參考書籍。

#### 5. 大學開授「養蜂學」

1962 年由農復會的協助，聘請美國密西根大學賴爾博士(Dr. Clay Lyle)，在國立臺灣大學及國立中興大學擔任客座教授，協助養蜂事業發展。賴爾博士曾任



美國經濟昆蟲學會(美國昆蟲學會前身)會長，及密西西比州立大學理農學院院長，同時具有 20 餘年養蜂經驗。當年春天他建議在兩所大學，以專題討論方式，開授「養蜂學」課程。1964 年賴爾博士返美後，國立臺灣大學的養蜂學課程，由何鎧光教授接任(何鎧光，2002)。

1962 年 9 月「行政院國軍退役官兵就業輔導委員會」在雲林縣斗六鎮榮民之家，辦理「榮民養蜂訓練班」(圖 14)。朱先墀(56 歲)將軍擔任班主任，空軍中校范宗德(49 歲)是教導主任，邀請賴爾博士(68 歲)主持授課。另請陳源祥理事長(42 歲)及尹冠三(55 歲)共同授課，由饒連財(24 歲)擔任助教兼翻譯。榮民養蜂訓練課程由班主任主持，請嘉義市蜂蜜運銷合作社協助辦理。訓練期間全體學員駐校學習，成績斐然。訓練班辦理兩期，每期十七人。結訓後每人贈送三箱蜜蜂，回家磨練養蜂技術。其後連續 2~3 年適逢氣候乾旱，養蜂事業陷入困境。受過專業訓練的榮民們，在山區特殊環境飼養蜜蜂，擔負延續臺灣養蜂事業發展的重任。

## 6. 養蜂事業的重大問題

臺灣養蜂事業逐步發展後，有三個較為嚴重的問題，假蜜、蜜蜂中毒及蜜蜂病蟲害，逐步浮現檯面，受到重視。

### 6.1 假蜜

臺灣的「假蜜」問題由來已久(李炳生，1934)，當初政府輔導民間成立蜂蜜運銷合作社及養蜂協會等組織，就是要提高蜂產品的品質，達到國際水準，社會大眾享用最優良的天然蜂蜜。

1970 年為了估算蜂王乳的生產成本，訂定合理價格。國科會補助經費委託賁正亞研究，1972 年在臺灣銀行季刊發表「臺灣蜜蜂產銷之研究」(賁正亞，1972)，文中分析蜂蜜及蜂王乳的產銷問題，並記述臺灣蜂蜜市場「偽蜜」充斥。另有程發和取得政府經費支援下，1974 年 3 月在臺灣土地金融季刊發表「臺灣蜂場經營之研究」，文中分析養蜂場經營成本，也記述「假蜜」問題(程發和，1974)。第二屆理事長的工作報告中記述：研擬內銷蜂蜜統銷辦法，以對抗假蜜，支持會員生產純良蜂蜜，協助銷售順暢。

### 6.2 農藥中毒

早在 1971 年返回國立中興大學擔任助教之際，當年系主任張書忱教授告知，臺灣濫用農藥是養蜂事業最大的單門。1972 年臺灣省養蜂協會發行「臺灣養蜂通訊」記述，當年民間農作物普遍施用農藥，對養蜂事業威脅甚大。部分農民認為蜜蜂是害蟲，加以殺害。養蜂協會希望政府宣導，讓農民了解蜜蜂並非害蟲，需加以保護。並希望各地農民能統一空中噴藥，並使用低毒性農藥，以減少蜜蜂

受害(陳振凱, 1972)。1972年范宗德記述：1971年12月12日彰化溪州鄉突遭空中噴藥之害，養蜂協會會員廖後生飼養的108箱蜜蜂損失近半，農藥使用是養蜂事業必須重視的問題(范宗德, 1972)。

### 6.3 蜜蜂病蟲害

養蜂協會成立之前，1966年中興大學昆蟲系李幼成發表「蜜蜂病害與敵害之初步研究」，是收存最早一篇有關蜜蜂病蟲害報告。文中記述，美國賴爾博士1963年在本省實地調查後指出，本省尚未發生嚴重蜜蜂病蟲害。但是本省氣候溫高多濕，是一切昆蟲疾病發生的溫床，應加強檢疫(李幼成, 1966)。果然，1968年起農政機構不斷收到蜂友們蜂群受害的報告，初步了解一般蜂場罹病蜂群在20~30%之間。

蜂王乳價格逐漸攀升之前，已經引起政府農政單位的密切關注，加強輔導養蜂事業，以期繁榮農村經濟。在農委會(現今的行政院農業委員會)及農林廳指導下，蜂友於1969年8月成立「臺灣省養蜂協會」。創會會員151人，1970年會員人數增為425人。第一屆第一次會員大會紀錄中提到：...進行蜜蜂病蟲害防治，購置噴燈4台、噴霧器6支分存於理監事處，提供需要會員借用；防治藥品2磅，因數量太少，無法分配存於協會；提供蜜蜂3箱，給台大病蟲害學系研究(黃齋輝, 1972)。可知，當年蜜蜂病蟲害已經造成問題。

養蜂協會成立之後，養蜂人數及飼養蜂群的數目，都迅速增加。1971年臺灣省養蜂協會會員565人，蜂群數約120,000箱(賁正亞, 1972)。臺灣養蜂事業奇蹟式的發展，引起當年在臺灣工作的美國人好奇。服務於美國海軍醫學研究所麥當勞(J. L. McDonald)研究員，在訪問中南部各地養蜂場後，發表一篇「Beekeeping in Taiwan, Republic of China (臺灣的養蜂事業)」於美國Dadant & Son公司的「美國養蜂月刊(American Bee Journal)」。文中記述：農藥毒害蜂群造成嚴重傷害；各地養蜂場主要病蟲害是美洲幼蟲病(*Bacillus larvae*) (圖15)，並且普遍存在；蜂友對幼蟲病的認識不足，不願意用最有效燒毀的方法殺除；另有小蜂蟎(*Tropilaelaps clareae*, 枇杷蟎)寄生紀錄(圖16)。該文介紹臺灣的養蜂事業概況之外，並有不同觀點的建言(McDonald, 1971)。

1970年蜂蟹蟎，在新竹地區發現(何鎧光, 2002)。同期，國立臺灣大學昆蟲學系嚴奉琰教授研究室，開始研究蜜蜂病蟲害問題。1971年嚴奉琰及秦履慶發表「蜜蜂幼蟲病及其病原之研究」，證實美洲幼蟲病危害。1971年9月李肇祥出版《蜜蜂飼養法》，由省農林廳編印。1971年臺灣省政府農林廳編印「怎樣防治蜜蜂病蟲害」摺頁，宣導蜜蜂病蟲害的防治。1972年嚴奉琰及高學文發表「蜜蜂微粒子病及其病理學」。1973年臺灣養蜂協會理事長王嘉雄主持第三屆第一次會員大會，記述：...發生美洲幼蟲病，為減少損失，多不願燒毀。使用藥物防範。

每箱需要 700~800 元。蜜蜂病蟲害問題，逐漸嚴重。

## 7. 1972 年蜂王乳外銷價格創最高

1974 年程發和記述，中華民國輸出入貿易統計年刊統計，1964~1971 臺灣外銷蜂王乳數量、價值及地區。如表 1。

表 1、1964~1971 臺灣外銷蜂王乳數量、價值及地區統計

單位：公噸/新台幣千元

年份	地區	美國	香港	菲律賓	日本	琉球	新加坡	合計
		數量	-	2.7		3.9	0.9	
	價值	-	67.2		31.8	25.4		127.6
1965	數量	0.05	1.00		0.04			10.9
	價值	142.0	47.8		0.6			190.4
1966	數量	0.07	0.78		0.01			0.86
	價值	196.0	13.3		24.0			233.3
1967	數量	0.075	2.88	1.00		4.0	0.054	8.01
	價值	209.6	64.28	50.80		74.0	1.57	400.25
1968	數量	0.03	17.51			1.92		19.46
	價值	86.4	406.3			15.8		508.5
1969	數量	0.053	11.01					11.07
	價值	159.2	269.2					428.4
1970	數量	-	20.3		0.1		0.36	20.76
	價值	-	359.0		200.7		11.2	507.9
1971	數量	-	10.8		6.24	0.42	0.12	17.58
	價值	-	432.2		700.8	13.3	1.2	1,147.5

上表可知當年蜂蜜及蜂王乳的外銷概況，由於蜂王乳剛進入外銷市場，海關尚未明確辨認蜂蜜與蜂王乳。表中在海關統計分類號別為「蜂蜜」，實際上有些是蜂王乳的價格。1966 年蜂王乳開始輸往日本，10 公斤價值為新台幣 24,000 元，每公斤 2,400 元；1967 年輸往美國 75 公斤，價值 209,600 元，每公斤 2,794 元，顯然都是蜂王乳，因蜂蜜無此行情。1968 及 1969 年情況亦同，每公斤 2,880 及 2,895 元，也是蜂王乳。1970 年以後改向日本輸出，每公斤僅 2,007 元，數量卻顯著增加。

據日本蜂業的刊物報導，自 1971 年 6 月至 1972 年 2 月，日本從臺灣輸入蜂王乳 10,350 公斤。自 2 月~12 月價格上升 1.5 倍，有 16,000 公斤。據出口商未經

發布的統計，1972 年臺灣輸出到日本的蜂王乳約 25,000 公斤。在 25,000 公斤的蜂王乳中，單獨從台南洪姓出口商經手 10,000 公斤，嘉義其他出口商約 7,000 公斤，其餘由台北、基隆、高雄等地散戶及觀光客攜帶出口。如以每公斤 3,500 元計算，可獲外匯新台幣近 9,000 萬元。

1972 年 8 月以前蜂王乳產地價格，每公斤 1.500 元。1972 年 9~10 月間價格，每公斤 5,000~7,000 元。因為年關將近，日本市場需求大增，價格飆升，年底一度破萬元大關。1973 年蜂王乳外銷 48 公噸，金額 2 億 2 千餘萬元。蜂王乳銷售到日本利潤豐厚，前往日本的旅客可以免稅攜帶五公斤以內蜂王乳。因此，飛往日本、韓國及琉球的旅客，以此方式攜帶蜂王乳(程發和，1974)。

## 8. 結語

1956 年 3 月范宗德在國際養蜂會議中，首度發表臺灣蜜蜂的研究報告。1956 年 7 月日本井上晃帶來「採收蜂王乳技術」影片，自此臺灣養蜂事業開始有重大轉變。1961 年代蜂王乳量產上市，像是一顆強力震撼彈，點燃了養蜂事業的新生命。因而，養蜂事業也受到農復會及農林廳的重視，投入大量經費輔導。1962 年聘請美國賴爾博士來台，在大學開授養蜂學課程，至今已經 55 年。在學術界培養一批專業人才，共同為養蜂事業奉獻，奠定良好發展基礎。隨著養蜂事業急速發展，臺灣省養蜂協會也於 1969 年應運而生。養蜂協會成立後，更凝聚蜂友們的力量。政府農政機構及學術機構的通力合作，加上蜂友們辛勤的耕耘。1972 年蜂王乳價格，一度每公斤破一萬元台幣。締造臺灣養蜂事業最燦爛的佳績，也是蜂友們最興奮的一年。

但是，養蜂事業四十五年前發生的「假蜜」、「農藥中毒」及「蜜蜂病蟲害」等重大課題，至今仍然普遍存在。尚期待學術界及養蜂業界，持續相輔相成，共同努力，解決養蜂事業的問題。

## 9. 參考文獻

- 安 奎、何鎧光。1997。養蜂學。444 頁。國立臺灣編譯館。
- 何鎧光。2002。蜜蜂研究三十年。臺灣昆蟲特刊 4：1-6。
- 李炳生。1934。蜜語。24 頁。
- 李幼成。1966。蜜蜂病害與敵害之初步研究。興大昆蟲學會會報 5(1,2)25- 33。
- 李肇祥。1971。蜜蜂飼養法。臺灣省政府農林廳編印。
- 林珪瑞。1953。臺灣之養蜂問題。臺灣農林 7(6)：3-4。
- 洪踵銓。1962。臺灣之養蜂業調查。植物保護會刊 4(1):28-29。
- 范宗德。1956。中國蜂禦敵及通風。第 16 屆國際養蜂 Apimondia 會議。譯文刊

- 於《蜂話》1959。209-210 頁。
- 范宗德譯。1958。教皇批護 12 世向第 17 屆國際養蜂 Apimondia 會議致詞全文。譯文刊於《蜂話》1959。211-214 頁。
- 范宗德。1959。蜂話。217 頁。仁和蜂場。
- 范宗德。1967a。現代養蜂法。186 頁。仁和蜂行。
- 范宗德譯。1967b。蜜蜂卵研究之新發展。科學農業 8：190-193。
- 范宗德。1972。臺灣養蜂通訊。臺灣省養蜂協會發行。
- 陳振凱。1972。目前養蜂事業必須重視的問題。臺灣養蜂通訊。臺灣省養蜂協會發行。
- 陳源祥。1977。嘉義市蜂蜜運銷合作社概況。安奎個人通訊。
- 黃齋輝。1972。臺灣省養蜂協會沿革。臺灣養蜂通訊。臺灣省養蜂協會發行。
- 程發和。1974。臺灣蜂場經營之研究。臺灣土地金融季刊 39：11-1。1-28。
- 貴正亞。1972。臺灣蜜蜂產銷之研究。臺灣銀行季刊 23(4):205-222。
- 嚴奉琰、秦履慶。1971。蜜蜂幼蟲病及其病原之研究。植物保護會刊 13:12-17。
- 嚴奉琰、高學文。1972。蜜蜂微粒子病及其病理學。植物保護會刊 14:53-57。
- 1971。怎樣防治蜜蜂病蟲害。臺灣省政府農林廳編印。農復會補助。
- Inoue & Inoue 1964。The world royal jelly industry:present status and future prospects. Bee World 45(2)：59-69.
- McDonald, J. L. 1971。Lt., MSC, USN, Beekeeping in Taiwan, Republic of China.American Bee Journal.

圖 1 《蜜語》迷你書封面



圖 2 生記養蜂場版權頁

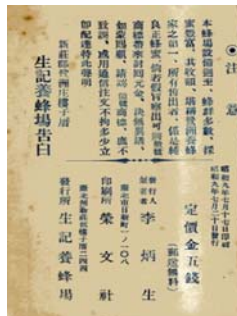


圖 3 生記養蜂場採蜜實況



圖 4 新莊郡樓子厝生記養蜂部



圖 5 臺灣總督府中央研究所試驗成績書

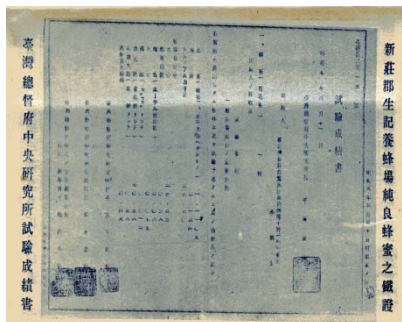


圖 6 封面內頁-蜂蜜與滋養品成分比較



圖 7 日本井上晃(中)及陳源祥(左)



圖 8 副總統謝東閔指導





圖 9 省主席邱創煥指導



圖 10 嘉義市長張博雅指導



圖 11 嘉義縣長林金生指導



圖 12 農林廳長余玉賢指導



圖 13 台北果菜公司總經理陳榮松指導



圖 14 榮民養蜂訓練班學員名冊

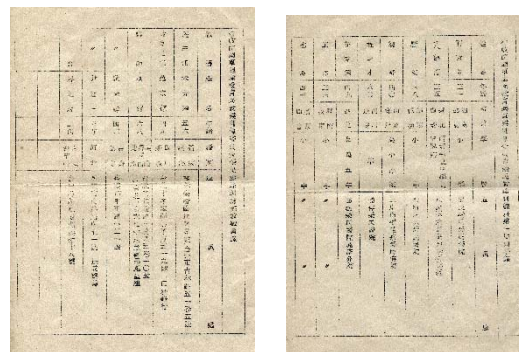


圖 15 美洲幼蟲病



圖 16 小蜂蟎(枇杷蟎)



# 都市蜂潮：城市蜂群行為適應初探

Urban Beekeeping : Observation of honeybee behavior

江敬皓\*、李佩紋、吳雨蓁

宏國德霖科技大學休閒事業管理系

\*通訊作者：江敬皓

電子郵件：chchiang@mail.hdut.edu.tw

通訊地址：新北市土城區青雲路 380 巷 1 號

## 摘要

近年來因嘗試飼養蜜蜂的民眾人數不斷提升，許多大台北都會區民眾都希望能在自家陽台或屋頂嘗試飼養蜜蜂的樂趣，除希望可採收到獨特的城市天然蜂蜜，也更加重視潛家社區環境的。本論文以飼養於台北市仁愛路的 5 群西洋蜜蜂(*Apis mellifera*)為城市養蜂研究對象，觀察記錄城市蜂群的繁殖狀況與蜂群內蜂蜜儲存量之變化。經過一年的觀察，其中兩蜂群群勢在春秋兩季可 8 片，三群蜂群達 9 片(滿群為 10 片)，蜂群貯蜜狀況在 2017 年 1 月、5 月因達高峰而分別採收了 17.6 公斤及 15.5 公斤的自然熟成蜜。一月份為冬季氣候，都市蜂群可進行採蜜，顯示大台北都市環境具有持續性的粉蜜源提供，使城市蜂群可維持成長，進一步將 2017 年 1 月、5 月兩次所採收蜂蜜進行檢驗，五大重金屬與 311 項農藥殘留為未檢出之結果，對台北都市養蜂的推廣具有重大意義。另外，五群蜂群經歷 7 次分封，其新蜂后均能順利於都市高樓環境交尾成功，於羽化後 13-22 天後開始產卵。蜂群採集活動的特性也與文獻資料相符，可知在大台北都會區推廣城市休閒養蜂是可行的，對於都會區的退休人口及銀髮族兩大族群，在自家進行城市養蜂不但可修身養性，更可採收到天然蜂蜜，對其休閒生活添增樂趣，也對世界蜜蜂消失之議題盡一份友善環境之力。

**關鍵詞：**城市休閒養蜂、西洋蜜蜂、大台北地區



## 壹、前言

世界各主要城市的居民對自身都市環境品質的要求日漸提升，而且越來越多環境維護、綠化與城市養蜂相互結合成功的案例，例如：東京銀座、美國紐約、歐洲的英國倫敦、法國巴黎、德國哥本哈根、柏林等大城市；雖然，大台北地區近年來在綠化植栽面積比例在居民與政府單位的重視下有所提升，從許多的社區生態活動、社區大學的課程及社群網站中也發現越來越多民眾對城市養蜂抱有極大參與感，但台北市在城市養蜂的概念上還是初步的階段，有許多的疑問還是必須進行科學性的研究與探討，例如：都市環境中全年粉蜜源的狀況、蜂群密度的適宜度、蜂群病蟲害的相關問題、對原生種東方蜜蜂(*Apis cerana*)或其他蜂種的族群影響、蜂群繁殖(交尾)的情形、蜂箱結構與體積是否適宜為城市養蜂、民眾對鄰近養蜂普遍的接受度，另外，城市養蜂所產出之蜂產品品質是否受環境(空汙)之影響等，若有系統性的相關實驗則對未來城市養蜂的規劃與推廣執行上具有極重要的參考價值。

大量蜜蜂不明消失的現象，所謂的“蜂群崩解失調”(Colony collapse disorder, CCD)現象在 1994 年起始於歐洲的法國與義大利，從 2006 年秋開始大規模在歐洲、北美、巴西等地陸續擴散(王等，2009)。國際間的政府機構、科學家、農人與一般的社會人士，都關注起這個問題，突然間，人們發現了蜜蜂與我們的生活，甚至與人類的生存，息息相關。根據世界糧農組織 (FAO) 的統計，全球主要的 115 種農作物中，有 52 種需要蜜蜂授粉，才能達成果實生產與採收種子；其中有 5 種主要作物，如果沒有蜜蜂授粉，產量將減產超過 90%；事實上，人類的食物有 35% 受益於蜜蜂授粉，估計全球蜜蜂授粉的經濟利益達 2,120 億美金/年，約佔全球農作物年產值 9.5%。吾人可以想像一下，蜜蜂消失後的世界，人類必然發生重大的生存危機，更何況地球上還有更多的野生植物需要蜜蜂的授粉作用，才能繁衍維持生態平衡 (FAO, 2009)。

城市養蜂在全世界並不是個陌生的名詞，美國紐約、芝加哥、波士頓、西雅圖、法國巴黎、英國倫敦、德國柏林、日本東京、香港、丹麥哥本哈根、挪威奧斯陸、加拿大溫哥華、多倫多、澳洲坎培拉等大都會，進行城市養蜂已行之有年，

日本首相夫人在近期訪美的過程中也看到白宮有飼養蜜蜂，並也與美國第一夫人對全球蜜蜂大量消失議題交換意見。可見關懷蜜蜂生存已深入人心。

如以上所描述，發展城市養蜂是一種嶄新的思維，可藉由城市養蜂展現全民對地球生態的重視，力挽蜜蜂族群逐。

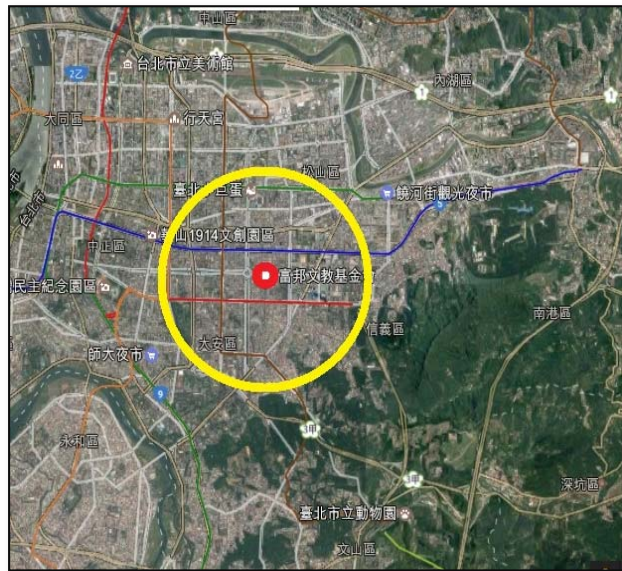
## 貳、材料與方法

1. 實驗種類與群數：西洋蜜蜂(*Apis mellifera*)五群。(圖一)。



圖一：(左)試驗用西洋蜜蜂(*Apis mellifera*)，與位於大樓 11 樓頂露臺區的五群蜂(右圖)。

2. 蜂群位置：台北市仁愛路安和路富邦大樓頂樓(圖二紅點處)



圖二：置放於台北都會區的蜂群位置圖，紅點為該大樓位置，黃圈圍蜜蜂採集活動可能之範圍。

3. 蜂群群勢：試驗期間蜂群維持在中至強群(7-9 片)。
4. 觀察記錄：每星期觀察記錄每群蜜蜂的狀況，並依蜂群紀錄表(圖三)內容紀錄蜂群內各項觀察所得之數據。例如蜂群的幼蟲、卵、封蓋、花粉量及蜂蜜量在巢片內之比例，以及病蟲害發生的情形。觀察城市蜂群於繁殖季節的新蜂后，交尾成功率、開始產卵時間以了解蜂群對都市環境繁殖之適應力。

● 記錄範例：

蜂群編號：	XXX	蜂王來源：	購買自xx養蜂場	開始產卵日期：	/ /					
蜂群特性：	採蜜能力強，採蜂膠意願中等 飼養地點與遷移記錄：XXX/XX/XX 起飼養於竹山 XXX 蜂場									
日期	巢框數	巢片狀況					蜂王狀況	覆病狀況	防治狀況	其它注意事項
		封蓋	幼蟲&卵	儲蜜	儲粉	巢礎				
2015/7/30	8	6.5	3.2	3.5	2.1	1	新王產卵佳	白垩病體 5 隻	蟻子夾除	外界蜜粉源不足，注意補充食物
所佔總面積數，以巢片單面為單位						新放入巢礎數	記錄其它重要事項，如疾病、施藥、收蜜、收粉、採蜂膠			

圖三、蜂群觀察紀錄表

5. 蜂蜜重金屬與農藥殘留分析：將城市養蜂蜂群採收之蜂蜜，進行 5 大重金屬與 311 種農藥之檢驗，探討蜂產品是否會因都市環境之關係而有

重金屬與農藥之殘留而品質受到影響。

6. **活動觀察**：利用蜂群活動監測系統紀錄蜜蜂活動數量與環境溫濕照度之變化關係(圖四)。



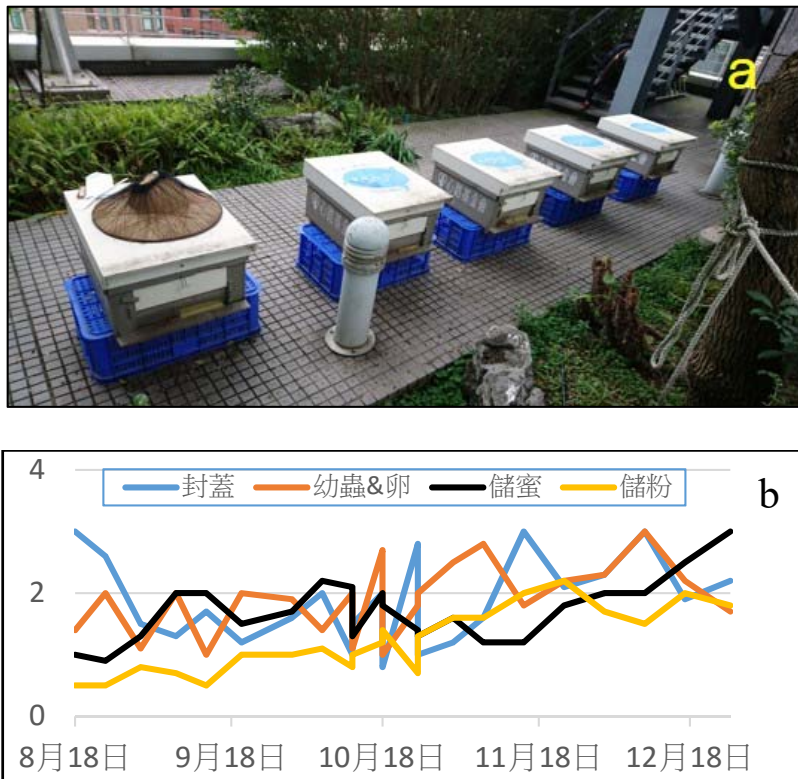
圖四、架設於蜂箱出入口的活動紀錄器。

分析各實驗蜂群放置點的紀錄表之數據，並對照周圍環境進行統和評估其城市養蜂蜂群的健康狀況，另一方面，透過蜂蜜樣本的分析可初步呈現城市蜂群活動範圍內的都市環境品質。

## 參、結果與討論

### 一、城市養蜂蜂群基礎資料的建構

根據蜂群紀錄表所列之項目，每週進行觀察記錄飼養於城市高樓的五群西洋蜂(*A. mellifera*)(圖五 a)其蜂群生長發育相關資料，紀錄時間自 8 月中旬至 12 月底，將記錄之蜂后狀況，卵、幼蟲蛹、蜂蓋幼蟲、粉蜜等數據資料轉換成折線圖進行解讀，如圖五 b 所示為群蜂群勢之變化，所顯示城市蜂群的生長狀態都很穩定，蜂群皆可維持達到 6~9 片。



圖五、a.台北城市蜂示範點；b.蜂群紀錄表所呈現之城市蜂群狀況。

城市蜂群生長發育狀況由圖五可清楚看出自 2016/08/15 至 2016/12/29，蜂群中蜂蜜的儲存量之變化，就是八月中旬，蜂群內的蜜儲存量處於較低點，此時期正處於盛夏時期，根據安等(2004)所述，夏季為缺蜜期需適時為蜜蜂補充糖水，不過城市蜂群此時期蜜儲存量還有一片，蜂群尚可正常運作無須額外補充糖水。不過，進入 9 月份之後，蜂群之儲存蜜量開始上升可維持在兩巢片上下。



## 二、採蜜

蜂群在 12 月中旬也觀察到巢內蜜儲存量維持高點，且有高比例的封蓋成熟蜜，經一週的觀察也持續有外界蜜源採入，因此 2017 年 1 月 1 日為 5 群蜂進行採蜜，此次各蜂群封蓋成熟蜜多，共收穫 17.6 公斤的天然濃縮蜂蜜(圖七)，水分含量為 17.3%，味道略帶苦味。在台灣，一月份已進入冬季，根據安等(2004)所述，冬季是蜜蜂缺蜜時期，常需要依賴人工餵食糖水以補充蜜蜂食物維持蜂群之正常運作，而這五群都市蜂群在此時期反而可進行蜂蜜生產採收，實為在都市環境養蜂之特有情形。此外，在 2017 年 5 月也因蜂群儲存蜜之狀況良好，進行第二次採蜜，共收穫 15.5 公斤的天然濃縮蜂蜜(圖六)，水分含量為 18.7%，風味為一般清香。

在觀察蜂群生長發育之情形，其封蓋的數量除了失王時期之外，皆維持一定的數量，顯示蜂后產卵情況與幼蟲生長發育皆維持在正常狀況，推測與其城市飼養環境提供充足之食物(花粉與花蜜)有密切相關。粉蜜源為蜜蜂糧食的主要來源，都市蜂群採用定點方式飼養，有別於一般蜂農築花採蜜的方式，因此都市蜜蜂在其距離蜂巢半徑約 2.5 公里的採集範圍內，植物開花與否，開花數量、流蜜量等皆易受環境因素影響，需要長期(2-3 年以上)持續性的觀察紀錄所累積之各項資料，其對於城市養蜂的適切性能有更完整的描述與規範之建立。



圖六、城市蜂群於 2017 年 1 月及 2017 年 5 月進行採蜜。

### 三、城市蜂蜜檢驗

為了解城市養蜂所採收之蜂產品品質，將 2017 年 1 月、5 月兩次所採收蜂蜜樣品分別送至 SGS 與國立宜蘭大學檢測中心進行 5 大重金屬與 311 項農藥殘留之檢測，其檢測結果如圖七所示，在五大重金屬與 311 項農藥皆未檢出之結果。顯示城市蜂群所採之蜂蜜並未受都市環境可能受汙染之疑慮，對台北都市養蜂的推廣具有重大正面意義。



圖七、城市蜂群採得蜂蜜之重金屬與 311 項農藥之檢測結果。

四、都市蜂群新蜂后交尾之觀察

西洋蜜蜂(*A. mellifera*)為了繁殖擴展族群，在原蜂后年齡較大(一般為 3-5 年)，產卵能力下降時，蜂群則照其正常運作機制會產生新蜂后取而代之，以延續蜂群的生命。但飼養在都市高樓環境的蜂群，其新蜂后是否會因位處高樓層而影響其交尾成敗，對城市養蜂長期的推廣與蜂群延續性飼養具有重要意義，因此本計畫特以高樓的城市蜂群為觀察都市蜂群產生新蜂后與其交尾之情形，自 2017 年 3 月中旬至 2017 四月下旬，以人為方式造成三群蜂發生失王之情形，三群生王群之新處女蜂后在羽化 13 至 22 天內均可交尾成功開始產卵，使蜂群得以維持正常發展。由此可見其城市蜂群在失去蜂后也可透過正常機制培育新蜂后，而新蜂后也可在都市高樓環境下進行順利交尾(圖八)。

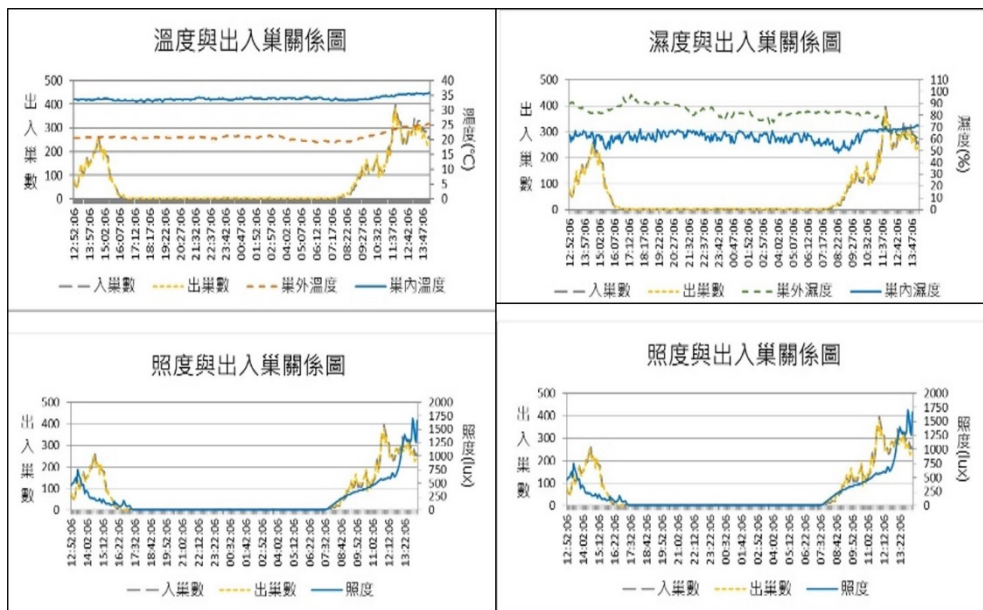




圖八、新蜂后(圈起處)交尾完成後腹部明顯膨大並開始產卵。

### 五、城市蜜蜂活動數量與環境溫濕照度之變化關係

觀察蜜蜂進出蜂巢之活動量變化過程中，紀錄器所呈現出城市蜂群之活動量在上午9時以後快速提升，至11-12時最高量，中午則趨緩，下午2時至3時間會有另一波小高峰(圖九)，與安等(2004)所述之蜂群活動高峰期吻合，顯示西洋蜜蜂飼養於城市，其蜂群活動行為之特行不受影響。



圖九、利用活動偵測器紀錄都市蜂群的採集活動情形。

## 肆、 結論

由以上結果之討論與分析，城市養蜂在都會區是可行的，而且高樓的環境也不會影響新蜂后交尾，本研究所呈現的實驗記錄時期僅四個多月，若能有完整的一年甚至長期至三年的觀察時間，其所累積的數據更具有說明城市養蜂的特性。另外，都市綠地面積有限，單一設置點可容許的蜜蜂蜂群數必須考量的，而這也必須設計另一套試驗進行觀察，對於誠實養蜂的規範建立具重要性。

推廣城市養蜂的學者專家認為，城市養蜂可使都會人在繁忙的生活步調中，藉由養蜂過程體驗休閒養蜂的樂趣，也因為環境可提供充足的食物來源，以利蜂群成長，茁壯，甚至可能有蜂產品的收成。其原因如下(Chen,2015)：

1. 農業地區大量施用農藥，城市中的植物的維護則較少使用農藥，蜜蜂發生農藥中毒機率低。
2. 農業生態系是高度變動的生態環境，作物以經濟導向，品種單一，開花時提供大量的蜜粉源，但作物收割後，又如同生態沙漠；相對的，城市裡有許多蜜源，公園、屋頂花園、雜草叢生的荒地、陽臺及露臺上，道路分隔島，雖開花植物多但其是否能夠提供足夠的食物量則有待長時期調查。
3. 城市氣溫平均比農村高2—3°C，蜜蜂的活動時間較長，城市中的蜂群產蜜量幾乎是其農村同類的兩倍。
4. 蜂群可做為環境指標生物，如果某都市地區不利蜜蜂生存，可能代表該地區環境綠化不足，同樣不利人類居住。此外，蜜蜂主要採集食物的範圍集中於蜂巢半徑2公里以內，可以分析蜂花粉的污染物，用以監測環境品質。

養蜂可以很容易地植入到日常城市生活中，所需時間成本低，因為蜜蜂們可以自己覓食，毋需飼養。此外，城市如同蜜蜂的綠洲，如需要可遷移到農業區，彌補授粉蜜蜂的不足，藉以保障農業生產。

全世界的人口比例逐漸邁向老年化之趨勢已非常明顯，對於蜜蜂的生態議題，可納入退休與銀髮族人士，將其結合為『城市休閒養蜂』，不但提供該族群多樣化生活也為蜜蜂與環境生態盡一份心意。

## 伍、參考文獻

- 安奎、何鎧光、陳裕文。2004。養蜂學。華香園出版社。524p。
- 吳登楨、吳輝虎。2000。實用養蜂—蜜蜂授粉 P41-47。行政院農業委員會苗栗區農業改良場編印。
- 王重雄、羅竹芳、乃育昕、王智源、陳韻如、黃偉峰、簡慈盈、吳治宇。2009。蜂群衰竭失調症。台灣昆蟲 29:119-138。
- Chen Y. W. 2015. Urban Beekeeping in Taiwan. 44<sup>th</sup> Apimondia international Apicultural Congress, Korea. 116p.
- Mark L. W. 1987. The biology of the honey bee. Harvard University press. 281pp.
- Jack Phillips. 2015. Radioactive Honey Was Discovered By a Nuclear Power Station in Scotland. Times of London reported.
- De Réaumur, M. (1740). *Mémoires pour Servir à l'Histoire des Insectes*. Imprimerie Royale, Paris.
- Gontarski, (1949). Wandlungsfähige Instinkte der Honigbiene. *Umschau*, 49: 310-312.
- Lindauer, M. (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. vergl. Physiol.*, 34:299-345.
- Rösch, G.A. (1927). Beobachtungen an Kittharz sammelnden Bienen. *B. i. o. Zbl.*, 47: 113-121.
- Seeley, (1983). The ecology of temperate and tropical honey bee societies. *American Scientist*, 71 : 264-272.

# 台灣近年養蜂業發展之成因與隱憂

宋一鑫

國立嘉義大學植物醫學系

電子郵件：ihsinsung@mail.ncyu.edu.tw

通訊地址：嘉義市鹿寮里學府路 300 號

## 摘要

台灣的養蜂業於 1980 年代曾經全盛期，自 1990 年代之後，許多複雜的因素使得台灣的養蜂產業面臨蕭條之勢。然而，近十年來，時空因素轉換，台灣的養蜂產業似乎有復甦之勢，蜂蜜價格年年飆漲，投入養蜂之青年農民亦趨之若鶩，養蜂產業已成為熱門之農業選項。針對 2006~2015 年台灣養蜂產業相關的國家統計數據、輿論與市場概況，分析近年來養蜂產業復甦之可能原因。期間蜂蜜產量高峰位於 2011 年，達 15,089 公噸，其前後年間則呈起伏不定，蜂蜜生產量值則從 2012 年的 73.4 元/公斤，到達 2015 年的 148.1 元/公斤，從產量與生產量值趨勢來看是呈現非量能成長卻造成蜂蜜價格上漲的結果。從蜂產品增值可能因素分析國內景氣面、消費物價、民間推動與政府輔導措施、蜂蜜減產與民眾預期心理、食安疑慮及國際市場等趨勢面向來觀察，發現近十餘年來，台灣養蜂產業的興盛原因，可能是受到蜂蜜價格飆漲，使得投入養蜂產業的青年農民增多。另外，蜂蜜雖可長期保存，近年國內蜂蜜價格的飆漲，與受到蜂蜜減產、消費者預期心理加上食安疑慮的成因可能性較高，復因農民配合政府輔導措施，蜂蜜品質提升，亦有可能。但與國內消費物價上揚及國際市場趨勢關聯性可能較低。長遠來看，台灣的養蜂環境近年並未如 1980 年代的全盛期，因此未來如蜂蜜價格趨穩，養蜂業將受到的挑戰是競爭與成本、用地取得困難與採蜜環境減少、CCD、傳統病蟲害與新興病蟲害，加上極端氣候與氣候變遷的影響，這些複合因素的干擾，都可能持續使蜂群減少與蜂蜜減產，成為未來養蜂產業的隱憂。

(投影片內容置於專刊後面)

# 無螫蜂膠抗發炎及抗腫瘤生理活性探討

陳怡伶<sup>1\*</sup>、余思賢<sup>3</sup>、彭及忠<sup>4</sup>、陳翠瑤<sup>5</sup>、林湘羚<sup>2</sup>、楊久滕<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系教授

<sup>4</sup> 國立虎尾科技大學生物科技系副教授

<sup>2</sup> 生物資源學院碩士在職專班碩士

<sup>5</sup> 國立宜蘭大學食品科學系副教授

<sup>3</sup> 國立宜蘭大學休閒產業與健康促進學系助理教授

<sup>6</sup> 慈濟大學醫學院醫學系急診學科副教授

\*通訊作者：陳怡伶

電子郵件：ylchen@niu.edu.tw

通訊地址：宜蘭縣宜蘭市神農路一段1號

## 摘要

台灣地區原生種無螫蜂早年即為原住民所飼養之主要授粉昆蟲，由於環境變遷，目前僅剩下黃紋無螫蜂 *Trigona ventralis* 這個蜂種，台灣黃紋無螫蜂主要的膠源植物包括羅氏鹽膚木、桑樹、構樹、血桐及阿里山冬青台灣特有植物，但現代人們砍伐山林改種檳榔、茶樹或使用大量化學物品(例如：農藥、殺蟲劑等)，迫使無螫蜂逃離原來之生活環境，目前台灣僅剩約 30 窩無螫蜂窩。亞洲地區之無螫蜂主要分佈於大陸、台灣、越南、泰國、馬來西亞、新加坡及印尼等 7 個國家，*Trigona* 屬的無螫蜂種在印尼及菲律賓國家已經廣泛地應用於溫室植物授粉，對於增進結果量有明顯效果，可見在蜜蜂授粉利用上，無螫蜂具有相當的開發潛力。為了協助復育及保護授粉蜂種，講者國立宜蘭大學生物技術與動物科學系陳怡伶教授將於海拔 294 公尺生活 25 年之無螫蜂連同樹桶移至宜蘭員山平地飼養已達半年，飼養區保留原始林，富有足夠之膠源植物供給無螫蜂飼養環境，進行觀察授粉情形，目前觀察無螫蜂已經能採粉及採膠，平地的膠源植物主要是楓香，蜜源/粉源植物包括咸豐草、月橘及水稻等，生活情況良好，如果族群生長旺盛，可於今年秋天無螫蜂秋繁的季節進行人工分蜂，增加蜂群數量，期望能協助果農運用於溫室授粉。此外值得一提的是，無螫蜂膠的產量為義大利蜂的 8-10 倍，若能有效開發為保健產品具有很高的經濟潛力，目前講者實驗結果顯示馬國無螫蜂膠具有抗發炎之能力，在抗攝護腺癌方面，可以達到抑制腫瘤生長的目的，而無螫蜂蜜具有明顯的抗菌及抗氧化效果，對於多重抗藥性細菌也能抑制其生長。綜合上述，無螫蜂蜜及無螫蜂膠對於輔助人類健康具有明顯效果，有趣的是無螫蜂雖然螫針退化，但會使用蜂膠做為防禦武器，在自然界常發現築巢在野蜂附近，協助其對抗胡蜂。由上述可知若台灣原生種的無雖然螫螫蜂若能復育成功，會兼具授粉及休閒農業發展多項用途，是很值得努力與期待之方向。

**關鍵字：**無螫蜂、蜂膠、抗發炎、抗攝護腺癌

## 一、前言

不同於一般蜜蜂，在蜜蜂中有一種無螫刺的蜂，隸屬蜜蜂科 (Apidae)，我們稱為無螫蜂 (Stingless bee)，其特徵為翅脈退化、大顎發達、不具螫針及後足具花粉籃構造 (Pollen basket)，無螫蜂的體型小，一般只有義大利蜂的十分之一大小。無螫蜂主要分布在東南亞，大陸地區包括海南、西雙版納、廣西、廣東的原始雨林，目前無螫蜂分佈最多為馬來西亞地區，有紀錄的約 30 種，常見的約 10 種，都在平地飼養，主要的蜜源植物是榴蓮樹及大葉相思樹。其中 *Itama* 及 *thoracica* 是他們經常飼養的蜂群，後者體型大、市場而以 *Trigona* 屬種類最多。台灣地區原生種無螫蜂早年即為原住民所飼養之主要授粉昆蟲，都在野地飼養，目前能被觀察到的僅剩一種無螫蜂，學名為台灣黃紋無螫蜂 (*Lepidotrigona ventralis*)，分佈的地點包括：苗栗泰安雪霸國家公園(雪霸國家公園雪見遊憩區標高 1874 公尺)、高雄市那瑪夏區、嘉義縣阿里山區、嘉義縣番路鄉、嘉義縣梅山鄉、南投縣竹山鎮、南投縣集集鎮，海拔為平地到 1874 公尺，台灣黃紋無螫蜂主要的膠源植物包括羅氏鹽膚木、桑樹、構樹、血桐及阿里山冬青台灣特有植物，元兒茶素酸(protocatechuic acid)是其主要有效成分之一，蜜源植物種類繁多，其中我們在平地觀察到的包括水稻及咸豐草，生物技術與動物科學系的陳怡伶教授，目前已經開始與花蓮農改場著手進行相關的復育工作。此外基於對臺灣社會的熱愛與強烈的使命感，我們團隊與基龍米克斯生物科技公司攜手合作，已經完成台灣黃紋無螫蜂全基因體及轉錄體解碼計畫，並於 2017 馬來西亞第一屆銀蜂論壇 (International Meliponine Scientific Conference & Convention & Carnival 2017; IMS3C2017) 進行首次國際間公開發表，其結果的確可與東南亞無螫蜂分佈的國家 (e.g. 印尼、馬來西亞及泰國) 進行蜂種間基因分析比對，進行演化及功能性分析，其結果對於保護及復育台灣原生種無螫蜂應該會有一定程度的貢獻。

值得一提的是，無螫蜂膠的產量為義大利蜂的 8-10 倍，若能有效開發為保健產品具有很高的經濟潛力。蜂膠 (Propolis) 是由蜜蜂藉由採植物之嫩芽、果皮外表分泌物質，加上蜜蜂的唾液酵素混合著蜂蠟而形成，呈現膠狀黏性(Burdock, 1998)。蜂膠的主成分會因為季節或是產地等的變化而有所改變，目前全世界的蜂膠分為五大類，分別為巴西綠蜂膠、楊樹屬(*populous nigra*) 蜂膠、紅色蜂膠、樺樹蜂膠以及太平洋蜂膠，各屬蜂膠的主活性成分多皆以多酚類或生物類黃酮為主(Bankova, 2005)。類黃酮是植物界的次級代謝產物，因其在蜂膠中所佔含量比例高達 23~42%，因此蜂膠的生物活性來源即為類黃酮 (Bankova et al., 1995)。蜂膠原除了是蜜蜂用來修補巢房以避免天敵或微生物的侵犯的建材，已被證實有抗病毒(Shimizu et al., 2008)、抗菌(Drago et al., 2007) 等效果，其他如抗發炎、抗癌(Watanabe et al., 2011; Gribel and Pashinskii, 1990)、保肝 (Chen et al., 2008) 等亦有許多研究報告。本實驗過去兩年與東馬砂勞越公司合作開發蜂膠產品，主分析 *Thoracica* 這個常見品系的蜂膠生理活性。本實驗中，我們透過細胞膜式觀察

無螫蜂膠酒精萃取層是否也具有抗發炎的效果。另為了釐清無螫蜂膠酒精萃取層是否具有透過免疫調節的功能來達到抑制腫瘤生長之目的，我們另外建立以 lipopolysaccharide (LPS) 誘發小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 和細胞培養之體外模式，觀察免疫相關基因的表現情形，其中包括觀察 TNF- $\alpha$  及細胞介白素 (Interleukin) 等免疫調節因子，觀察其抗發炎以及抗攝護腺癌的作用。

無螫蜂是釀蜜蜂種，過去 10 年來南美洲的巴西、拉丁美洲的墨西哥、澳大利洲等國家陸續地有專業團體在研究無螫蜂蜜的醫藥價值後，發現無螫蜂蜜在多種醫療中有突破性發現，尤其是在近期公佈的，手術傷口可以用無螫蜂蜜替代常用抗生素作為復合醫療用品，傷口能快速癒合且不留疤痕。值得一提的是無螫蜂富含多種有機酸，其中包括檸檬酸與蘋果酸，蘋果酸的酸度高過檸檬酸 20%，蘋果酸脫氫酶 (Malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37) 是一種在三羧酸循環 (TCA cycle) 中催化 L-蘋果酸轉變為草醯乙酸 (使用 NAD<sup>+</sup>) 的酶。有別於蘋果酸酶 (Malic enzyme) 是催化蘋果酸變為丙酮酸，產生的是 NADP<sup>+</sup>。人體內若是 L-蘋果酸缺乏會導致三羧酸循環不正常，L-蘋果酸可以用來調節氨基酸液體的 pH 值，臨床上用於治療尿毒症、高血壓等和及化療後的輔助藥物。此外虎尾科大彭及忠老師實驗室最新的實驗結果顯示，馬國無螫蜂蜜具有明顯的抗菌及抗氧化效果，對於多重抗藥性細菌也能抑制其生長。綜合上述，無螫蜂蜜及無螫蜂膠對於輔助人類健康具有明顯效果，也因此台灣原生種的無螫蜂若能復育成功，會兼具授粉及休閒農業發展多項用途，是很值得努力與期待的方向。

## 二、實驗方法

### 一、無螫蜂膠之萃取

本實驗無螫蜂膠以酒精萃取。萃取前處理：將 SP 裝盒放 -20°C 冰箱一天以去除蟎。隔天取出，水洗殘留於蜂膠上之花粉並隔水加熱 15~20 分鐘以去除蜂蠟成為毛膠塊，再將其敲碎冰於 -20°C 冰箱。酒精萃取：取 300g 毛膠塊，浸泡 95% 800g 酒精 3 天，以 1 號濾紙 (孔徑約 5  $\mu$ m) 過濾，再浸泡酒精 300 mL 1 天後再度過濾，混合兩次過濾好的萃取液做為原液。

### 二、無螫蜂膠抗發炎能力分析

#### (一) 細胞存活率

採 MTT 分析法以評估藥物處理前後的細胞存活比例。MTT 的作用原理乃是利用活細胞內的粒線體酵素，將黃色的 tetrazolium salt 代謝成 formazan 紫色針狀結晶。因此 MTT assay 能直接反應細胞粒線體活性，細胞增殖越多顏色越深，反之，當藥物具毒性則細胞增殖會被抑制，顏色會變淡，故 formazan 的生成量與活細胞的數目成正比。接著以 ELISA reader (酵素免疫分析儀) 讀取吸光值，

依據讀值高低以表示活細胞的多寡，吸光值越高表示活細胞數目越多。

實驗步驟：1. 將細胞培養於 96 孔盤 (96-well plate, Nunc) (5000 cells / well) 放置隔天(約 12-16 小時)。2. 依實驗需求給予不同處理並放置 24 小時。3. 移除培養液並於每 well 加入含 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MTT 共 200  $\mu\text{L}$  培養液於每 well，並於 37 $^{\circ}\text{C}$  下作用 1 小時後，將 MTT 培養液吸除。4. 加入 100  $\mu\text{L}$  / well 的 DMSO 將結晶溶解，並使用 ELISA reader 以吸光值 570 讀取。5. 以不添加藥物處理之組別為對照組之吸光值當作 100%，由 3 次獨立實驗來計算細胞在經由藥物處理後的存活率。

### (二) 一氧化氮定量分析 (Nitrite assay)

人體中之一氧化氮 (NO)，通常是由體內一種氧化還原酵素一氧化氮合成酶所產生，其機轉為將 L-arginine(精氨酸) 分解成 NO 及 L-citrulline(瓜氨酸)，而此時的 NO 則因半衰期短故極不穩定，而不穩定的 NO 會很快的在組織中被氧化成為穩定的產物硝酸 (nitrate) 或亞硝酸 (nitrite)，接著再利用 Griess Reagent 型呈色反應。iNOS 主要表現於巨噬細胞中，故當受到刺激時巨噬細胞會被活化進而引發大量 iNOS 表現，進一步產生高量一氧化氮。

實驗方法：將細胞培養於 24 孔盤 (24-well plate, Nunc) ( $1 \times 10^5$  cells / 500  $\mu\text{L}$  / well) 放隔日，接著依實驗需求給予不同濃度藥物處理一小時，而後加入 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  繼續培養 24 小時後，收集上清液，使用 Griess Reagent 測定法將不同的細胞上清液及 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  作為標準曲線置入 96 孔盤中，於每 well 中置入 100  $\mu\text{L}$  樣品，而後加入 50  $\mu\text{L}$  的 1% sulfanilamide solution 並避光反應 5 分鐘，再加入 50  $\mu\text{L}$  的 0.1% NED solution 後，於 550 nm 下讀取其吸光值，利用  $\text{NaNO}_2$  所作之標準曲線，計算出一氧化氮之濃度。

### (三) 西方墨點法 (Western blot)

此實驗用以呈現 COX-2 之表現量。首先，取老鼠巨噬細胞 RAW264.7 以不同濃度的 SP 處理 1 小時後，加入 LPS (100 ng / mL) 的刺激使其發炎反應生成，並在培養 24 小時後抽取細胞內蛋白質，藉由聚丙烯醯胺膠體電泳及西方墨點分析 COX-2 的表現量，觀察 SP 是否具有導致細胞凋零以及抑制發炎之作用。Western blot 是一種結合免疫染色技術及電泳分離技術的蛋白質分析法。在電泳分析時，離子化界面活性劑 (anion detergent) SDS (sodium dodecyl sulfate) 會以其蛋白質與碳氫鏈作疏水性結合，使通點時帶負電的蛋白質往正極移動，並減少了蛋白質本身不同電荷對移動之影響。此外 SDS 亦是一種強解離劑，當與 2-ME (2-mercaptoethanol) 一起加熱蛋白質時，將會斷開蛋白分子之雙硫鍵結合，使蛋白質的次單位被分離，而上述兩種作用可使蛋白質在其電泳時只依其分子量不同而分離，不受蛋白質之結構與帶電之影響。利用形成的網狀聚丙烯醯胺膠體，



使分子量較大的蛋白質移動緩慢，而分子量較小的蛋白質能夠先通過，藉此分層。免疫染色則是將蛋白質轉漬到適當的介質（如 PVDF member 或 nitrocellulose），再利用第一抗體專一的特性認出特定蛋白質後接上含有酵素的第二抗體（此步驟可有放大訊息之作用），最後給予被切割後會產生螢光的受質，計此來比較不同蛋白質樣本中特定蛋白之表現量。

#### 1. 聚丙烯醯胺膠體電泳法

利用聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE) 將蛋白質依照分子量分離。先配製 1.5 mm 厚的 discontinuous acrylamide gel，gel 分為上下兩層，上層的 stacking gel 為 5 % acrylamide 而下層 separating gel 為 12 % acrylamide gel。膠體配製完成後放置於電泳槽內，並加入電泳緩衝液 (running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS)。而後將萃取出來的蛋白質與 4 X protein loading dye 混合液經 95°C 乾浴加熱變性 (denatured) 10 分鐘，在冰浴冷卻後離心。將各樣品及標示標準分子量的 Multimaker 依序注入膠體的孔槽中，通以電壓 80 伏特，等待樣品通過 stacking gel 後電壓調整為 120 伏特，最後當 BPB 染劑到達膠片底部時即可關閉電源。

#### 2. 西方墨點法

取 PVDF membrane 浸泡於 methanol 5 分鐘後，以二次水浸濕，接著將裁好的濾紙與 membrane 先行浸泡在 transfer buffer (50 mM Tris, 40 mM glycine, 0.375 % SDS, pH 9.0-9.4; 20 % methanol) 中。取電泳膠並裁下所要轉漬的區域後，亦浸泡於 transfer buffer 中。轉印石墨板之正極板以 transfer buffer 潤濕後，依序重疊平鋪 3 張濾紙、membrane、gel、3 張濾紙，最後蓋上以 transfer buffer 潤濕的負極石墨板，設定電流為 140 毫安培，通電流經 45 分鐘後將 membrane 取出。取出後浸泡於 5 % non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃至少 30 分鐘。以 TBST buffer (24.22g Tris, 87.75 g NaCl, 10 mL Tween 20, 加水調到 1 L) 清洗 membrane 10 分鐘 3 次，先加入一級抗體，並置於 4°C 下作用一天。隔日先以 TBST buffer 清洗 membrane 10 分鐘 3 次，再加入二級抗體，使在室溫下搖晃作用 1 小時之後，再以 TBST buffer 清洗 10 分鐘 3 次，接著將 membrane 與 ECL (enhanced chemi-luminescence) 反應後，使用全自動冷光分析儀偵測反應強度，並以 VisionWorks® LS image acquisition and analysis software 作定量分析。

#### (四) ELISA 測定 TNF- $\alpha$ 及 IL-6

取培養的小鼠巨噬細胞 RAW264.7，以不同濃度之 SP 處理 1 小時後，再加入 LPS (100 ng /mL) 刺激發炎反應的生成，於培養 24 小時後測試培養液中的 TNF- $\alpha$  與 IL-6 的含量。

實驗步驟：將 Capture antibody 依據操作比例和無菌 PBS 混合後，每孔洞

100  $\mu$ L 加入 96-well ELISA plate 孔洞中，而為使抗體能緊密地貼附於孔洞底部，ELISA plate 需避光並置於室溫下至隔天，而後每 well 加入 300  $\mu$ L wash buffer 清洗 3 次後拍乾，接著每 well 加入 300  $\mu$ L Reagent Diluent 置於室溫下一小時，再同樣每個 well 加入 300  $\mu$ L wash buffer 清洗 3 次後拍乾，此時已可放入冰箱短暫保存或直接測試實驗樣品。若要直接測試，可加入已經稀釋的樣品以及標準溶液後，置於室溫下 2 小時，同樣每 well 加入 300  $\mu$ L wash buffer 清洗 3 次後拍乾，再將配置好的 Detection antibody 加入孔洞中，置於室溫下 2 小時，而後每 well 加入 300  $\mu$ L wash buffer 清洗 3 次後拍乾，接著加入 Streptavidin-HRP 並於室溫下避光反應 20 分鐘，而後使用 300  $\mu$ L wash buffer 清洗 3 次後拍乾，再加入 50  $\mu$ L Substrate solution (TMB)，使其在室溫下避光反應 10~20 分鐘，當其呈現明顯的藍色時，立即加入 50  $\mu$ L Stop solution (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 以終止酵素反應進行，而以 450 nm 吸光值讀取數據，並利用標準溶液作為標準曲線來估算其樣品 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的濃度。

### 三、預防攝護腺癌試驗

#### (一) 動物實驗

在本次計畫中，取經無菌培養  $1 \times 10^7$  個 LNCaP 攝護腺癌細胞注射至 Balb/c 免疫不全裸小鼠皮下進行體內腫瘤移植實驗。等老鼠腫瘤生長至 50-100 mm<sup>3</sup> (長 x 寬 x 寬/2) 後開始用針管餵食治療，連續 14 天，每天 1 次。治療組給藥無螫蜂酒精萃取物 (SP)，溶劑組(對照組)則給於 5% 酒精。於第 14 天給藥後連續觀察 33 天，每 3 天測量腫瘤大小及體重。

#### (二) AR、PSA、COX-2 蛋白質之西方墨點分析試驗

進一步以西方墨點法分析 COX-2 蛋白質表現量。首先，於實驗前將小鼠分為三組，進行無螫蜂膠投藥後，犧牲小鼠並手術取下小鼠之腫瘤後，萃取總蛋白質，並取 50 毫克所得蛋白質，以 1.5 毫米厚的不連續聚丙烯醯胺膠體 (discontinuous acrylamide gel) (膠體上層為 5% 丙烯醯胺膠體，下層為 12% 丙烯醯胺膠體) 以 120 伏特電壓下進行電泳分析。接著，將膠體轉漬至 PVDF 膜上，以 TBST 緩衝液 (取 24.22 公克 Tris、87.75 公克 NaCl、10 毫升 Tween 20，加水調至 1 公升) 搖晃清洗 10 分鐘 3 次後，加入一級抗體並置於 4°C 下搖晃反應一天，隔日以 TBST 緩衝液搖晃清洗 10 分鐘 3 次，再加入二級抗體，於室溫下搖晃反應 1 小時後，再以 TBST 緩衝液搖晃清洗 10 分鐘 3 次，接著將 PVDF 膜與增強型化學冷光試劑 (enhanced chemi-luminescence, ECL) 反應後，以全自動冷光分析儀偵測冷光強度，其中以  $\beta$ -肌動蛋白 ( $\beta$ -actin) 作為內控制組。

#### (三) 超氧化物歧化酵素 (Superoxide dismutase, SOD) 活性測量

超氧化物歧化酵素為細胞中去除 ROS 的酵素之一，且在老化的過程中 SOD 的活性會有降低的情形，因此其活性之高低可代表細胞抗氧化的能力以及活體老化的程度，而本實驗使用 superoxide dismutase activity assay kit (biovision) 測量其活性，其測定原理此要是利用 xanthine oxidase 把 xanthine 代謝成過氧化氫及超氧陰離子的反應中，其產生的超氧陰離子可進一步將無色的 WST-1 氧化成黃色 WST-1 Formazan 而在波長 450 nm 有吸光值，而由於 SOD 可將超氧陰離子轉化為過氧化氫及氧氣，此活性將降低 xanthine oxidase 反應產生之超氧陰離子含量，進而抑制 WST-1 的呈色，因此，透過測量 WST-1 Formazan 之呈色被抑制的多寡，即可代表 SOD 的活性高低。同時測量蛋白質含量做為內在定量。

實驗步驟：首先取 20  $\mu$ L 的樣本 (以滅菌水做為 blank) 至 ELISA plate 中，各加入 200  $\mu$ L 的 WST solution 及 20  $\mu$ L 的 enzyme solution，蓋上蓋子，以 parafilm 密封盤子的邊緣，置於 37 $^{\circ}$ C 烘箱中靜置 20 分鐘，之後於 Spectramax M2 測量波長 450 nm 的吸光值，另一方面，同樣以 Bio-Rad Protein Assay Reagent 測量蛋白質濃度，同時以 3 次獨立實驗來計算結果，其最終表示方式為 SOD activity (inhibition rate %) = (Ablank - Asample) / Ablank \* 100% /  $\mu$ g protein。

#### (四) 穀胱甘肽過氧化酶 (GPx) 活性之測量

穀胱甘肽過氧化酶亦為細胞中去除 ROS 的酵素之一，且在老化的過程中，GPx 的活性亦會有降低的情形，因此其活性之高低亦可代表細胞抗氧化的能力以及活體老化的程度，本實驗使用 Glutathione peroxidase assay kit (cayman) 測量其活性，GSH Px 可透過將 GSH 氧化為 GSSH 的反應，同時將過氧化氫類物質 (R-O-O-H) 代謝為無毒的 H<sub>2</sub>O，而同時 GSSH 可再被 Glutathione reductase (GR) 還原為 GSH 循環使用，該反應伴隨著 NADPH 氧化為 NADP<sup>+</sup> 之反應，而 NADPH 氧化為 NADP<sup>+</sup> 時，降低 A340 的吸光值，因此，該測定方法原理為觀察在波長 340 nm 其吸光值在 1 - 2 分鐘內的減少量 (亦即 NADPH 消失的速率) 作為 GSH Px 的活性，同時測量蛋白質含量做為內在定量。

實驗步驟：首先於 ELISA plate 中加入 100  $\mu$ L 的 assay buffer 及 50  $\mu$ L 的 substrate Mix，之後加入 20  $\mu$ L 的樣本 (以 assay buffer 作為 blank)，之後加入 20  $\mu$ L 的 cumene hydroperoxide，然後迅速放入 Spectramax M2 中，每 30 秒測量一次波長 340 nm 的吸光值，共測 5 分鐘，繪製波長 340 nm 的吸光值下降之速率，帶入下列公式求得比活性：

$$\text{IU / ml} = (\Delta 340\text{nm} / \text{min} \div 6.22) / \text{sample volume}$$

比活性 (specific activity) 表示法：GSH Px IU/mg of protein

蛋白質濃度以 BIO-RAD Protein Assay Reagent 測量，同時以 3 次獨立實驗來計算結果。

### 三、結果與討論

我們測定酒精萃取毛膠塊後的總黃酮量為 729.29 mg/100g (表一)，約佔 7.29%，而其總酚含量為 301.09  $\mu\text{g}$  Gallic acid/g (表一)，這個結果顯示馬國膠的類黃酮含量低於市售頂級的巴西綠蜂膠，但其總酚含量大致相同，馬國膠的主要活性成分可能是異於類黃酮物質，值得進一步探討。利用 DPPH 分析方法測其抗氧化能力，DPPH 清除率為 317.81  $\mu\text{g}$  trolox/g (表一)，細胞實驗結果發現濃度 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的馬國無螫蜂膠酒精萃物即可有效抑制 LPS 所誘導產生的一氧化氮 (nitric oxide, NO) (圖一)，並可抑制環氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) (圖二)，另外還能降低腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 及介白素-6 蛋白 (圖三) 之表現。綜合上述實驗結果顯示，馬國蜂膠酒萃物在低劑量 (0.1~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 即具有抗發炎之能力，而較高濃度時會產生毒殺細胞的情形 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，因此在應用日後使用上低劑量應該就可以達到抗發炎的作用，未來應有機會作為抗發炎藥物在治療上。抗攝護腺癌方面，我們取經無菌培養  $1 \times 10^7$  個 LNCaP 攝護腺癌細胞注射至 Balb/c 免疫不全裸小鼠皮下進行體內腫瘤移植實驗。等老鼠腫瘤生長至 50-100  $\text{mm}^3$  (長 x 寬 x 寬/2) 後開始用針管餵食治療，連續 14 天，每天 1 次。治療組給藥無螫蜂膠酒精萃物，溶劑組(對照組)則給於 5% 酒精。於第 14 天給藥後連續觀察 33 天，每 3 天測量腫瘤大小及體重。實驗後腫瘤以 HE 染色及南方墨點分析法 (Western blot analysis) 檢測蛋白質表現情形 (圖四)。實驗結果顯示馬國無螫蜂膠萃物會使雄激素表面接受體 (Androgen receptor) mRNA 及蛋白質表現量均降低 (圖五)。此外也發現無螫蜂膠萃物可以透過提高 caspase-3 的活性誘導細胞凋亡並抑制裸鼠的腫瘤生長。綜合以上結果指出無螫蜂膠萃物可以調控 LNCaP cell 的 AR 基因，達到抑制腫瘤生長的目的。總合上述實驗，證實無螫蜂膠未添加 LPS 組在 SP 濃度高於 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時明顯產生細胞毒性，5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  存活率降低至約 30%。顯示 SP 對 RAW264.7 小鼠巨噬細胞有毒殺作用。添加 LPS 各組細胞存活率顯著提高，顯示 LPS 對細胞有刺激生長作用。對於 NO 的抑制在 SP 濃度為 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時就具有顯著的抑制效果 ( $p < 0.001$ )，並具有劑量依賴性，表示具有抗發炎作用。對 TNF- $\alpha$  的表現量，當 SP 濃度在 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時開始出現非常顯著差異 ( $p < 0.001$ )。對於 IL-6 的表現量，在 SP 濃度為 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時開始出現非常顯著差異 ( $p < 0.001$ )。SP 可以降低 COX-2 之蛋白質表現量，在 SP 濃度為 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時開始出現差異 ( $p < 0.05$ )，在濃度為 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時開始出現顯著差異 ( $p < 0.01$ )，在 SP 濃度為 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時開始出現非常顯著差異 ( $p < 0.001$ )。另外，蜂膠具有許多生物活性，不同地區之蜂膠所含成分與活性物質也有所不同。以巴西膠特有的活性成分 CAPE 為例：CAPE 會經由抑制塵蟎所產生的 IL-10 及 IP-10 來達到治療過敏之作用 (王, 2010)，此外中 CAPE 可以抑制口腔鱗狀細胞癌細胞株 SCC-9 的侵襲能力，藉此作為預防或治療口腔癌轉移的化學治療製劑 (彭, 2013)。CAPE 對中度及低度

分化人類胰臟癌細胞株 BxPC-3 與 PANC-1 具強力的誘導癌細胞株細胞凋亡的活性，細胞死亡的同時也伴隨著粒腺體膜電位的減少及 caspase 的活化 (陳，2006)。在本實驗中，我們發現馬國無螫蜂膠的主要活性成分包括咖啡酸及原兒茶素酸等活性物質，無螫蜂膠酒精萃取物可以透過抑制抗氧化酵素的活性，進而抑制 AR、PSA、COX-2 的 mRNA 及蛋白質的表現量，達到預防攝護腺癌的功效。不過無螫蜂膠 SP 究竟透過何種訊息傳導路徑來達到抑制發炎及預防腫瘤生長，目前尚未釐清，還有待後續進行試驗分析。

#### 四、參考文獻

- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1998;36:347-63.
- Teixeira EW, Negri G, Meira RM, Message D, Salatino A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2005;2:85-92.
- Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm*. 2004;54:65-72.
- Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino ML. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep*. 2011;28:925-36.
- Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;113:278-83.
- Campo Fernandez M, Cuesta-Rubio O, Rosado Perez A, Montes De Oca Porto R, Marquez Hernandez I, Piccinelli AL, et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56:9927-32.
- Li Y, Chen M, Xuan H, Hu F. Effects of encapsulated propolis on blood glyceic control, lipid metabolism, and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2012;2012:981896.
- Zhu W, Li YH, Chen ML, Hu FL. Protective effects of Chinese and Brazilian propolis treatment against hepatorenal lesion in diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2011;30:1246-55.
- Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100:276-83.

- Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer letters*. 2007;252:235-43.
- Altug ME, Serarslan Y, Bal R, Kontas T, Ekici F, Melek IM, et al. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: a biochemical and planimetric study. *Brain research*. 2008;1201:135-42.
- Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo MR. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *Journal of applied microbiology*. 2007;103:1914-21.
- Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral chemistry & chemotherapy*. 2008;19:7-13.
- Silici S, Koc NA, Ayangil D, Cankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;99:39-44.
- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44:230-2.
- Su KY, Hsieh CY, Chen YW, Chuang CT, Chen CT, Chen YL. Taiwanese Green Propolis and Propolin G Protect the Liver from the Pathogenesis of Fibrosis via Eliminating TGF-beta-Induced Smad2/3 Phosphorylation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014.
- Heard TA. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu Rev Entomol*. 1999;44:183-206. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.183. PubMed PMID: 15012371.
- Michener CD, Grimaldi DA. The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(17):6424-6. PubMed PMID: 16593976; PubMed Central PMCID: PMCPMC281984.
- Schorkopf DL, Jarau S, Francke W, Twele R, Zucchi R, Hrncir M, et al. Spitting out information: Trigona bees deposit saliva to signal resource locations. *Proc Biol Sci*. 2007;274(1611):895-8. doi: 10.1098/rspb.2006.3766. PubMed PMID: 17251108; PubMed Central PMCID: PMCPMC2093984.
- Michener CD. *The bees of the world*. 2 ed. Baltimore: John Hopkins University; 2000 May, 2007.
- Heinrich B. *The thermal warriors : strategies of insect survival*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press; 1996. xiv, 221 p., [8] p. of plates p.
- Sakagami SF. Stingless bees. In "Social Insects" (H. R. Hermann, ed.): Academic Press,

New York; 1892.

- Giannini TC, Garibaldi LA, Acosta AL, Silva JS, Maia KP, Saraiva AM, et al. Native and Non-Native Supergeneralist Bee Species Have Different Effects on Plant-Bee Networks. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137198. doi: 10.1371/journal.pone.0137198. PubMed PMID: 26356234; PubMed Central PMCID: PMC4565550.
- Poiani SB, Morgan ED, Drijfhout FP, da Cruz-Landim C. Separation of *Scaptotrigona postica* workers into defined task groups by the chemical profile on their epicuticle wax layer. *J Chem Ecol*. 2014;40(4):331-40. doi: 10.1007/s10886-014-0423-3. PubMed PMID: 24752855.
- Campos JF, Dos Santos UP, da Rocha Pdos S, Damiao MJ, Balestieri JB, Cardoso CA, et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:296186. doi: 10.1155/2015/296186. PubMed PMID: 26185516; PubMed Central PMCID: PMC4491730.
- de Farias JH, Reis AS, Araujo MA, Araujo MJ, Assuncao AK, de Farias JC, et al. Effects of stingless bee propolis on experimental asthma. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:951478. doi: 10.1155/2014/951478. PubMed PMID: 24799946; PubMed Central PMCID: PMC3995315.
- Kustiawan PM, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Palaga T, Arung ET, Chanchao C. Propolis from the Stingless Bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia, Induces In Vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Cancer Cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(15):6581-9. PubMed PMID: 26434878.
- Raetz CR, Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.
- Sweet MJ, Hume DA. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 60, 8-26.
- Doyle SL, O'Neill LA. (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NF-kappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1102-1113.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21, 335-376.
- Zeytun A, Chaudhary A, Pardington P, Cary R, Gupta G. (2010) Induction of cytokines and chemokines by Toll-like receptor signaling: strategies for control of inflammation. *Critical Reviews in Immunology*, 30, 53-67.
- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine*, 17, 179-

188.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464, 1357-1361.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440, 237-241.

Anders HJ, Muruve DA. (2011) The inflammasomes in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22, 1007-1018.

Lee RP, Subeq YM, Lee CJ, Hsu BG, Peng TC: Freshwater clam extract decreased hemorrhagic shock-induced liver injury by attenuating TNF-alpha production. *Biol Res Nurs* 2012, 14(3):286–293.

王秀芳、翟嵩。2010。咖啡酸苯乙酯的藥理作用及機制研究進展。

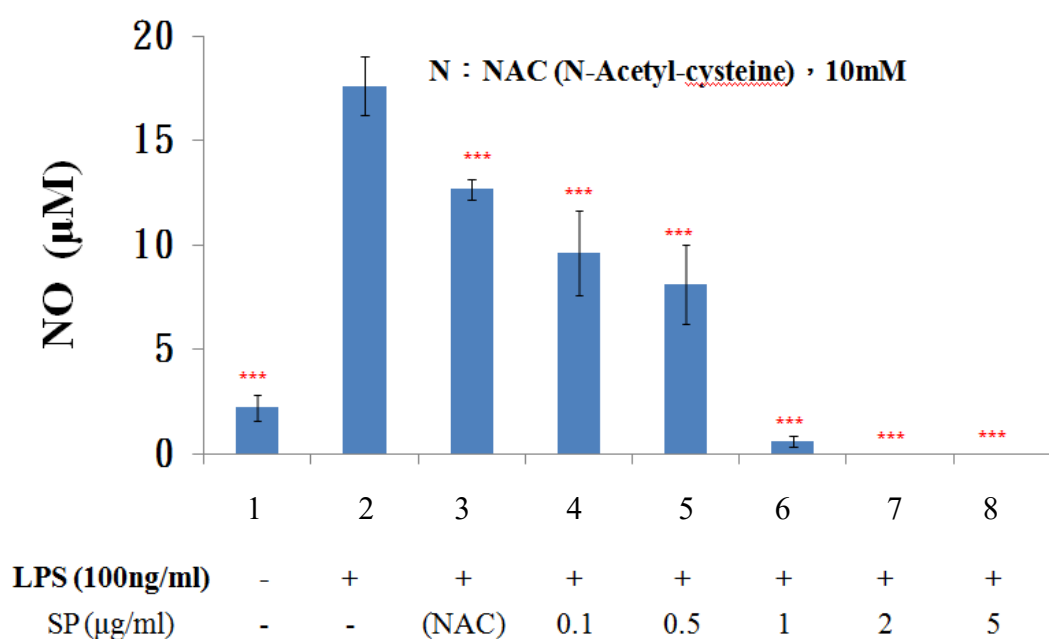
彭芷瑜。2013。咖啡酸苯乙酯抑制口腔癌細胞轉移和侵襲研究。

陳銘仁。2006。咖啡酸苯乙酯誘導人類胰臟癌細胞凋亡之作用及相關機轉。



表一、無螫蜂膠總類黃酮、總酚、抗氧化力含量。

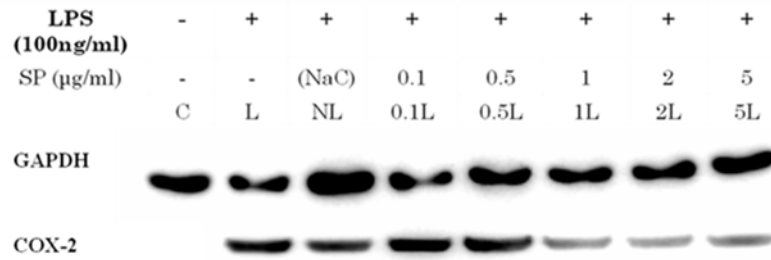
Sample	total flavonoids (mg/100g)	total phenolic content ( $\mu\text{g}$ Gallic acid/g)	DPPH ( $\mu\text{g}$ trolox/g)
<b>Stingless Bee Propolis</b>	729.29 $\pm$ 31.2	301.09 $\pm$ 11.4	317.81 $\pm$ 14.2



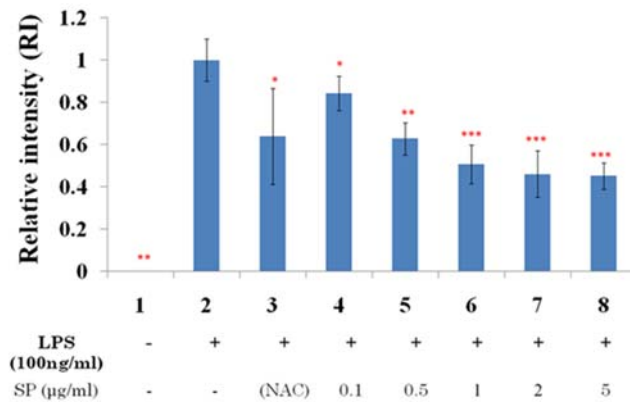
圖一、不同濃度 SP 對於 NO 的抑制效果。

使用  $1 \times 10^5$  cells / mL 小鼠巨噬細胞 RAW264.7 培養至隔天後，分別添加不同濃度 SP (0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$  及 5  $\mu\text{g/mL}$ )，藥物處理 30 分鐘後，再加入 LPS (100 ng/mL) 刺激巨噬細胞產生發炎反應，並於處理 24 小時後收去培養液，接著使用 Griess Reagent 試劑測試其 NO 含量，實驗結果為三次獨立實驗經平均所求得，其結果以平均值標準差 (mean  $\pm$  SD) 顯示，並使用 Student's t-test 統計分析，\*：和 LPS 組比較，\*\*\* $p < 0.001$ 。

(A)



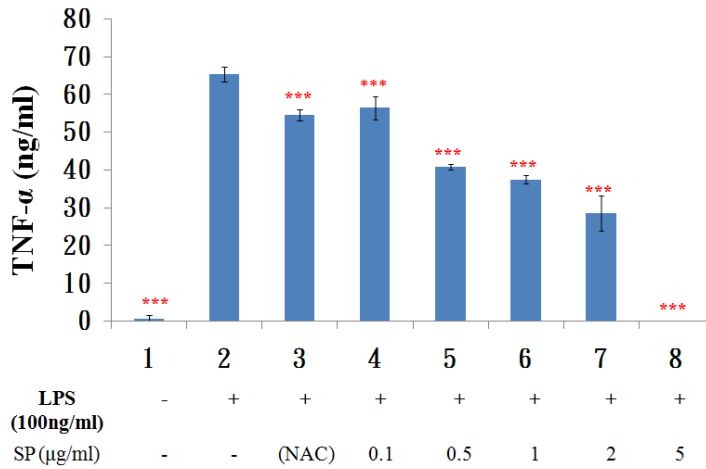
(B)



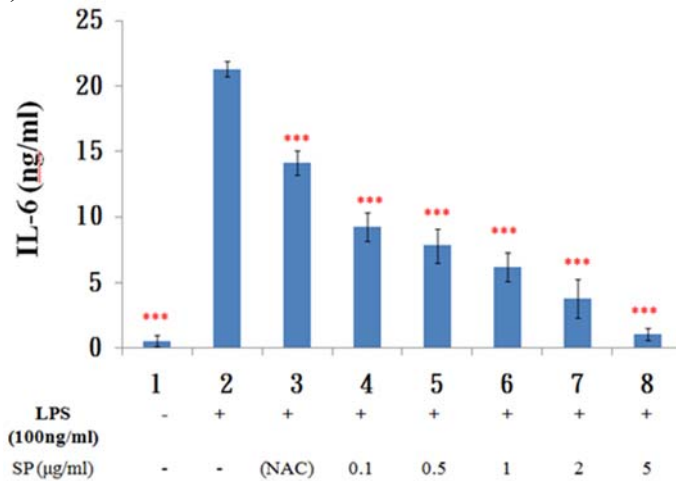
圖二、不同濃度 SP 對於 COX-2 之抑制效果。

使用  $2.5 \times 10^6$  cells/mL 小鼠巨噬細胞 RAW264.7 培養至隔天後，分別添加不同濃度 SP (1 µg/mL、2 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL 及 25 µg/mL)，藥物處理 30 分鐘後，再加入 LPS (100 ng/mL) 刺激巨噬細胞產生發炎反應，並於處理 24 小時後收取細胞；(A) 以西方墨點法，漿蛋白質轉至 PVDF 膜上，使用 5% 脫脂奶進行 block 後，分別加入 COX-2 抗體，於二抗後使用冷光儀進行拍攝並分析。(B) 此圖使用冷光儀進行量化之結果圖，其結果以平均值標準差 (mean ± SD) 顯示，並使用 Student's t-test 統計分析，\*：和 LPS 組比較，\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.01$ ，\*\*\* $p < 0.001$ 。

(A)

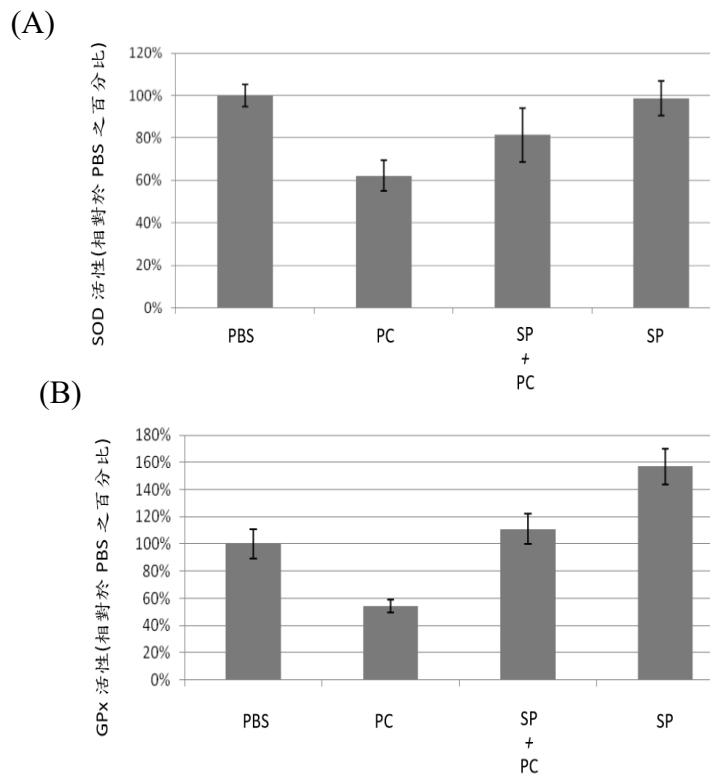


(B)



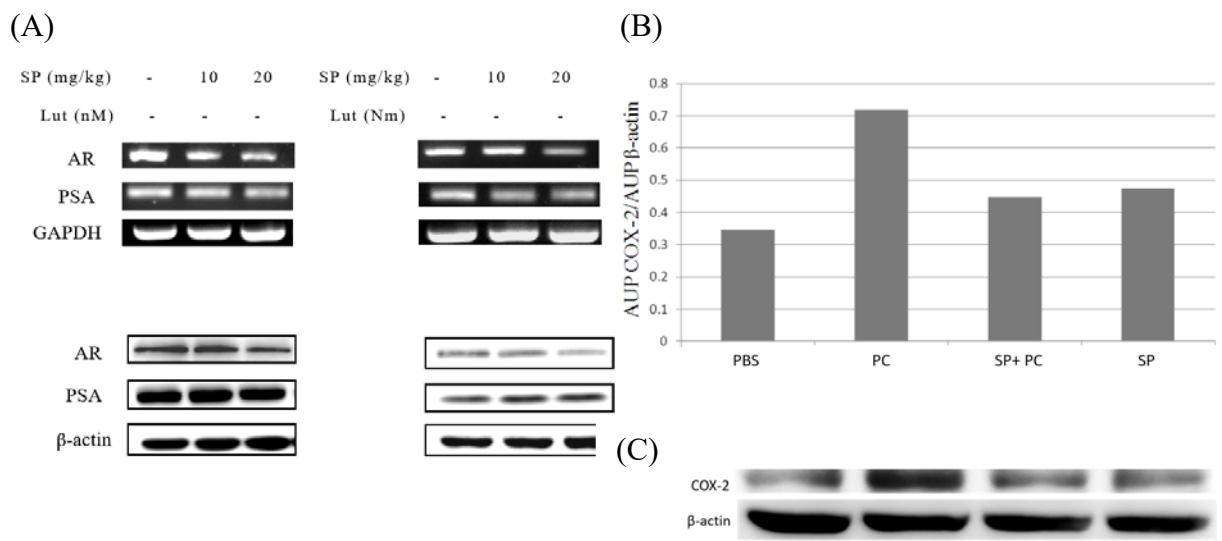
圖三、不同濃度 SP 對於促發炎因子 TNF- $\alpha$  的抑制效果。

使用  $1 \times 10^5$  cells / mL 小鼠巨噬細胞 RAW264.7 培養至隔天後，分別添加不同濃度 SP，0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$  及 5  $\mu\text{g/mL}$ ，藥物處理 30 分鐘後，再加入 LPS (100 ng/mL) 刺激巨噬細胞產生發炎反應，並於處理 6 小時後收取培養液並使用 ELISA 測試其 TNF- $\alpha$  (A) 和 IL-6 (B) 之含量，實驗結果為三次獨立實驗經平均所求得，其結果以平均值標準差 (mean  $\pm$  SD) 顯示，並使用 Student's t-test 統計分析，\*：和 LPS 組比較，\*\*\* $p < 0.001$ 。



**圖四、超氧歧化酶 (SOD)、穀胱甘肽過氧化酶 (GPx) 的表現情形。**

圖 (A) 和(B) 是觀察上述動物實驗血漿中超氧歧化酶 (SOD)、穀胱甘肽過氧化酶 (GPx) 的表現情形，由血漿樣本中顯示，異種皮移植攝護腺癌小鼠 (PC) 確實會降低 SOD 及 GPx 的活性的表現，而在事先針管餵食無螫蜂膠酒精萃取物 (20 mg/kg)，則可提高腎臟受傷小鼠血漿中 SOD 及 GPx 的活性。



**圖五、AR、PSA、COX-2 蛋白質之西方墨點分析試驗。**

結果顯示，相較於未經蜂膠投藥之控制組的小鼠，經蜂膠 (10 mg/kg、20 mg/kg) 投藥之小鼠之 AR、PSA、COX-2 的蛋白質表現程度均明顯降低 (AR 及 PSA 的 mRNA 的表現量也明顯下降)，顯示蜂膠可透過抑制 AR、PSA、COX-2 之蛋白質表現而具有預防攝護腺癌的功效。

# 多元化蜂產品開發

黃俊彥

台灣養蜂協會常務監事

電子郵件：taiwan.bee40@yahoo.com.tw

通訊地址：台中市柳川西路二段 40 之 1 號 2 樓

## 摘要

天然蜂產品，除了蜂蜜，蜂王乳，花粉、蜂膠以外，還有蜂子粉、蜂蠟與蜂毒等，均可作為食用、藥用以及工業用途。隨著生活水準提升，國人重視養生保健，對於各種形式的蜂產品需求量不斷增加，國際上對蜂產品的需求也逐年的在成長，發展潛力大。惟上述蜂產品除了少數達到商品階段，其他的因為研究與開發不足，商品化程度尚未俱足。近年來隨著科技的進步，蜂產品在食品、飲料、化妝品、醫藥的用途上，越來越受到重視。放眼未來，宜加強從蜂產品特性、加工、包裝、行銷等方面研究開發，生產多元商品，提升蜂產品附加價值。

## 前言

天然的蜂產品，除了蜂蜜，蜂王乳，花粉、蜂膠以外，還有蜂子粉、蜂蠟與蜂毒等，均可作為食用、藥用以及工業用途。筆者投入養蜂產業 10 餘年，期間也從事蜂產品加工開發與推廣，從經驗分析，多元蜂產品的開發利用，符合當前消費趨勢，深具市場潛力。

## 蜂蜜

目前在台灣的消費市場以龍眼蜜、荔枝蜜為大宗。其實蜜蜂採集各種植物的花蜜或蜜露，釀造而成各式蜂蜜，各有獨特風味，均有開發價值。根據台灣農業年報統計，本省荔枝栽培面積達 1 萬 2,000 多公頃，與龍眼栽培面積相當，均集中在中南部一帶。文旦柚栽培面積 6,715 公頃，以花蓮、苗栗、台南、宜蘭等縣

較多。洋香瓜栽培面積一、二期作，與裏作合計 7,591 公頃，集中在雲、嘉、南地區。桔橙類栽培面積合計將近 3 萬公頃，分佈全省。這些經濟作物都是蜜源豐富的植物，栽種面積也相當大，均具有蜂蜜採收價值。

其他尚有綠肥作物，以及咸豐草、蔓澤蘭、烏柏、山柏等等各種野生樹木、花草等，也具有豐富的蜜源，過去鮮少被採收利用，其實風味特殊，具在地特色，只要採集推廣，應該能為消費者接受。其中，如宜蘭的金棗蜂蜜，風味酸甜兼具，筆者認為非常具有市場開發價值。

## 蜂王乳

蜂王乳營養價值高，對人體有許多養生保健的好處，但在食用上因為帶有些許獨特的辛辣口味，部分消費者不易接受，影響產品推廣銷售，亟待克服。然而，值得注意的是，近年來市場上已漸有蜂王乳加工產品推出，例如三多利及法國嬌蘭等國際知名廠商，因為蜂王乳的保健功效及市場發展潛力，紛紛投入蜂王乳新商品的開發；部分台灣的蜂友，也突破加工技術，漸次開發出冷凍乾燥蜂王乳膠囊，除了保有蜂王乳營養成分外，也克服蜂王乳原有的辛辣味，食用上的便利性更高，消費市場風評甚佳。

## 蜂花粉

蜂花粉也是主要的蜜蜂產品之一。一般而言，花粉具有維生素、礦物質等 96 種以上的營養素，被科學家譽為「大自然最完美的營養食品」。台灣的蜂花粉，除了最大宗的茶花粉以外，尚有羅氏鹽膚木、油菜花、蓮花、檉木或百花等種類。各種花粉營養價值高、口感各有特色，經過適當的分級包裝，商品化潛力大。除此之外，添加其他保健營養成分的花粉複方產品，也不斷在市場推陳出新，值得產業界關注。

## 蜂膠

蜂膠是蜜蜂採集某些特定植物的樹芽、樹枝、樹皮的脂狀分泌物，混合蜜蜂本身大顎腺的分泌物形成，用來修補蜂巢內縫隙、覆蓋入侵的大型動物屍體，可以達到抑制病原滋生的功效。世界各國諸多文獻指出，蜂膠具有抗氧化、抑菌能力；蜂膠含有豐富的類黃酮，是維護人體健康的重要營養元素。目前開發出來的蜂膠產品形式多元，有液態、錠狀、軟膠囊，內服、外用等各種商品。台灣也有蜂膠生產，一般在4-5月間採集，呈綠褐色，一般以「台灣綠蜂膠」稱之。學者研究，台灣綠蜂膠品質佳，不亞於巴西、紐西蘭、大陸等地生產的蜂膠，雖產量不多，但值得繼續開發加工產品，以滿足保健消費市場的需求。

## 蜂子粉

蜂子含有豐富的動物性蛋白質，是一種很好的營養健康食品。一般可分為雄蜂子與蜂王子兩種，蜂子經適當加工，營養價值高，是近年新興的保健食品，具有市場潛力。

## 麥蘆卡蜂蜜成功行銷的省思

麥蘆卡茶樹，原為紐西蘭原住民使用的傳統醫療原料，做為抑制鎮痛解熱、消毒、治感冒等用途。經學者研究，麥蘆卡蜂蜜對於腸胃潰瘍具有治療效果，同時具有抗菌活性，因而聲名大噪。彼德·莫藍教授發現麥蘆卡蜂蜜的特性後，將之註冊為麥蘆卡獨特因子® (Unique Manuka Factor)，簡稱「獨麥素」(UMF®)。後來，經企業界組成獨麥素認證聯盟(UMFHA)，統一認證麥蘆卡獨特因子的成份與含量。麥蘆卡蜂蜜在獨麥素認證，政府積極保護，以及商業包裝與大力行銷下，在全球各地創造了龐大商機，實在值得台灣養蜂產官學界借鏡。

## 結語



隨著科技的進步，蜂產品的開發與應用，更顯廣泛多元，包括在食品、飲料、化妝品、醫藥等領域上，蜂產品越來越受到重視，也創造更高的附加價值。筆者認為，天然的蜂產品極其珍貴，是不可多得的保健營養產品。未來在蜂產品的開發應用上，可以從蜂產品的特色、加工技術開發、包裝與市場行銷等方面，尋求進一步的強化與提升。此外，加強消費者對蜂產品的認識，以及與其他生技產品跨域結合，開發複方產品等，同樣值得養蜂產業界重視與繼續努力。

# 氣相層析離子泳動光譜分析儀技術應用在 蜂蜜鑑定的研究

魏于凡、陳春廷、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1號

## 摘要

食品摻假一直是食品安全重要的問題之一，蜂蜜的摻假也不例外，從 C<sub>4</sub> 類糖漿到 C<sub>3</sub> 類糖漿的混摻樣品，進口蜂蜜的產地混摻樣品，不同蜜源的混摻樣品，越來越多的蜂蜜摻假樣品不斷增加蜂蜜摻假鑑定的難度。本研究利用氣相層析離子泳動光譜分析儀 (GC-IMS；Flavour Spec<sup>®</sup>)，透過加熱震盪所激發出來的揮發性有機化合物 (volatile organic compounds) 進行分析。在不同的蜜源蜂蜜樣品，透過 GC-IMS 分析之後所得到的訊號有所不同，而利用這些訊號作主成分分析可以得到具區別性的分佈結果；在不同產地龍眼蜜樣品，透過主成分分析所得的分佈圖可以清楚看到台灣龍眼蜜與泰國龍眼蜜區分成兩個區域，且並無交集情形，代表能夠區分其產地的不同。

**關鍵字：**蜂蜜、摻假、氣相層析離子泳動光譜分析儀

## 一、前言

蜂蜜是蜜蜂採集花蜜 (Nectar)、植物外泌液 (Excretion) 或昆蟲蜜露 (Honeydew) 經蜜蜂儲存釀造於蜂巢之天然甜味物質 (安奎等, 2004)。蜂巢中由外勤蜂自蜜源植物的蜜腺吸取花蜜混合下咽喉腺所分泌的酵素存於腹部的蜜胃飛回巢中, 每隻外勤蜂一次只能帶回 20 mg 左右的花蜜, 採集 1 公斤的花蜜外勤蜂需飛行 5~6 萬次, 而生產 1 公克蜂蜜, 外勤蜂需要採集約 1500~1600 朵花的花蜜。

臺灣地區每年 2~5 月因南北地域氣溫的差異, 荔枝與龍眼蜜源具由南往北開花之趨勢, 蜂農逐花而居, 為當年度蜂蜜之主要產期。依蜜源種類區分主要蜜源以龍眼蜂蜜為主, 其產量深受當年龍眼開花、流蜜與天候變化影響; 其它重要的蜜粉源植物有茶花 (10 月~翌年 2 月, 粉源為主)、柑橘類 (2~3 月)、油菜 (12 月~翌年 2 月)、羅式鹽膚木 (10 月, 粉源) 及咸豐草 (全年) 等蜜粉源 (盧美君, 2016)。

在蜂蜜摻假當中常出現的摻假情形大致可分為以下幾種: (一)、人造蜂蜜: 蜂蜜含量非常低, 透過添加一些人工香精、調色劑, 混合糖漿製成。(二)、工廠混摻: 與人造蜂蜜相比蜂蜜含量較高, 透過與糖漿大量混合, 增加產量, 以提高利潤。(三)、糖蜜殘留: 較易發生在頭期蜜, 通常是蜂農餵飼糖水所殘留, 在進入採蜜期時尚未消耗完畢而與採收的蜜混合所殘留。(四)、產地摻假: 在臺灣有不少進口商會進口泰國龍眼蜜, 由於泰國龍眼蜜價格通常比較低, 於是會有用泰國龍眼蜜假冒台灣龍眼蜜的情形, 賺取當中的價差。(五)、蜜源摻假: 龍眼蜜的價格通常高於其他種類蜂蜜; 也有標榜龍眼蜜, 但是其實並非純的龍眼蜜, 混摻其他蜜源的蜂蜜或是根本不是龍眼蜜, 而以龍眼蜜的價格來販賣。

天然食品的鑑別是一個非常複雜的問題, 很難由單獨一種科學分析技術來解決, 在傳統的化學分析中, 樣品的前處理方法是需要耗費時間和耗材成本, 同時有機溶劑的使用對環境也有不良影響。本論文使用的氣相層析離子泳動光譜分析儀結合頂空採樣的系統, 只需將待測樣品秤量所需重量至上機使用的分析樣品瓶中, 設定好分析的條件即可, 樣品不需要任何前處理。透過頂空採樣系統的加熱器進行震盪搖晃及加熱, 將樣品中所含的可揮發性化合物激發出來, 再由自動進樣系統抽取樣品瓶中上端的氣體, 注射進樣到分析系統當中, 具有簡便、快速且耗材低廉的優點。

蜂蜜產地的鑑別, 由於穩定同位素比例分析的技術發展, Kropf *et al.* (2010a) 透過利用  $\delta^{13}\text{C}_{\text{honey}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  等三項穩定同位素因子, 探討鑑別蜂蜜產區與蜜源的可行性; 一共分析 271 件司洛維尼亞的蜂蜜樣品 (2004~2006), 產自四個不同的司洛維尼亞地理區, 七種不同植物蜜源。分析結果顯示穩定同位素技術並無法有效區分蜂蜜的蜜源植物, 但在四個不同地理產區的蜂蜜樣品卻有不同的

同位素特性，使用線性判別分析 (Linear discriminant analysis) 若不考慮蜜源種類，地理產區正確鑑別率達 55% 以上；在已知蜜源的狀況下，洋槐 (black locust) 及萊姆 (lime) 蜂蜜的地理產區正確鑑別率則高達 84.6% 與 88.9%。Kropf *et al.* (2010b) 又利用這項穩定同位素技術探討司洛維尼亞產的洋槐 (black locust)、椴樹 (lime)、板栗 (chestnut) 的蜂蜜樣品共 122 件 (2004~2006)，產地鑑別正確率分別高達 98.2%、100%、94.6%。

由於蜂蜜的風味是消費者對蜂蜜喜好最直觀且重要的關鍵因子，在蜂蜜中的揮發性有機化合物 (Volatile organic compounds) 已有研究顯示可作為區分不同產地蜂蜜的關鍵標記。Stanimirova *et al.* (2010) 利用頂空採樣 (Head-space) 固相微萃取技術 (Solid phase microextraction) 結合二維氣相層析-飛行時間質譜儀 (two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry) 用於分析科西嘉島與非科西嘉島不同產地間蜂蜜樣品 (2006~2007) 的 26 種揮發性有機化合物，再透過不同的統計方法分析，結果顯示可區分科西嘉島上與非科西嘉島不同產地之蜂蜜。

除了以上的研究方法可用於鑑別蜂蜜產地之外，另外也還有許多不同分析儀器用於蜂蜜產地的區分，例如：Batista *et al.* (2013) 利用感應耦合電漿質譜儀 (Inductively coupled plasma mass spectrometry) 分析了 57 件來自巴西 24 個不同城市的蜂蜜樣品並進行區分。Consonni & cagliani (2008) 和 Consonni *et al.* (2013) 利用核磁共振光譜儀 (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) 分別對不同國家的蜂蜜樣品進行分析區別。

## 二、材料與方法

### 一、樣本資訊

編號	樣品名稱	生產年份	蜜源
*TWLG-01~15	*台灣龍眼蜜	2014	龍眼
TWLG-22	台灣龍眼蜜	2015	龍眼
TWLG-23~24	台灣龍眼蜜	2016	龍眼
TWLG-25	台灣龍眼蜜	2017	龍眼
*THLG-01~12	*泰國龍眼蜜	2016	龍眼
NLG-01	台灣百花蜜	2015	百花
NLG-02	台灣東方蜂紅淡蜜	2016	紅淡比
NLG-03	台灣荔枝蜜	2017	荔枝
MKT-06	泰國龍眼蜜	2016	龍眼

MKT-08	台灣咸豐草蜜	2016	咸豐草
MKT-09	台灣百花蜜	2015	百花
MKT-10~11	台灣柳丁蜜	2017	柳丁
MKT-12	台灣荔枝蜜	2016	荔枝
MKT-13	台灣荔枝蜜	2017	荔枝
MKT-16	麥盧卡蜂蜜	2014	澳洲茶樹

\* 標示為選作標準參考品的樣品

TWLG 編號為確定台灣龍眼蜜源的樣品；NLG 編號為確定非龍眼蜜源的樣品  
 THLG 編號為泰國龍眼蜜的樣品；MKT 編號為市售樣品。

以上蜂蜜樣品皆為宜蘭大學蜜蜂與蜂產品研發中心收集分析用，保存方式為存放在-20°C的冷凍櫃中，需要時取用。

## 二、GC-IMS 儀器相關資訊

### 1. 儀器規格與耗材

儀器名稱：Gas Chromatograph Ion Mobility Spectrometer (GC-IMS)

儀器型號：Flavour Spec<sup>®</sup>

製造廠商：G.A.S. Dortmund, Germany

常用耗材為 99.9995% 氮氣、20 mL 分析用玻璃樣品瓶。

### 2. 儀器分析方法條件

頂空採樣加熱器：15min；60°C

頂空採樣取樣體積：600μL

注射器溫度設定：80°C

進樣孔端溫度設定：80°C

氣相層析分離管柱溫度設定：40°C

離子泳動飄移管溫度設定：45°C

載氣氣體：99.9995% 氮氣，2~25 mL/min；0~10min 梯度流量

25~75 mL/min；10~20min 梯度流量

150 mL/min；20~25min 固定流量(沖洗)

飄移氣體：99.9995% 氮氣，150 mL/min；0~20min 固定流量

50 mL/min；20~25min 固定流量(沖洗)

訊號紀錄時間：0~20min

蜂蜜樣品皆取 1g 至樣品瓶中進行分析。每個樣品皆進行三重複分析。

### 3. 數據分析軟體：原始數據分析皆使用原廠提供的分析軟體。

主程式 LAV software version 2.0.0 (G.A.S. Dortmund, Germany)：

色譜圖輸出 Topographic view output

訊號的指紋圖譜輸出 Fingerprint plot output  
主成分分析 Principal components analysis (PCA)

三、蜜源種類的鑑別

使用樣品為台灣龍眼蜜 (TWLG-22、24、25) 三件，台灣荔枝蜜 (NLG-03、MKT-12、13) 三件，台灣柳丁蜜 (MKT-10、11) 兩件，台灣百花蜜 (NLG-01、MKT-09) 兩件，台灣咸豐草蜜 (MKT-08) 一件，台灣東方蜂紅淡蜜 (NLG-02) 一件，澳洲麥盧卡蜂蜜 (MKT-16) 一件，共 13 件樣品進行蜜源種類的鑑別分析。

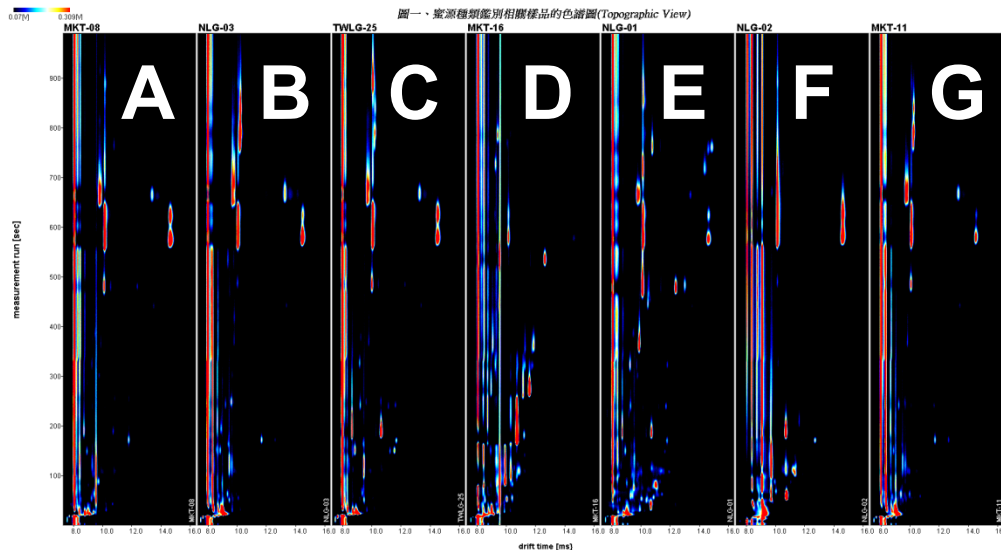
四、龍眼蜜的產地鑑別

使用樣品為台灣龍眼蜜 (TWLG-01~15、22、24) 十七件，泰國龍眼蜜 (THLG-01~12、MKT-06) 十三件，共 30 件樣品進行龍眼蜜的產地鑑別分析。

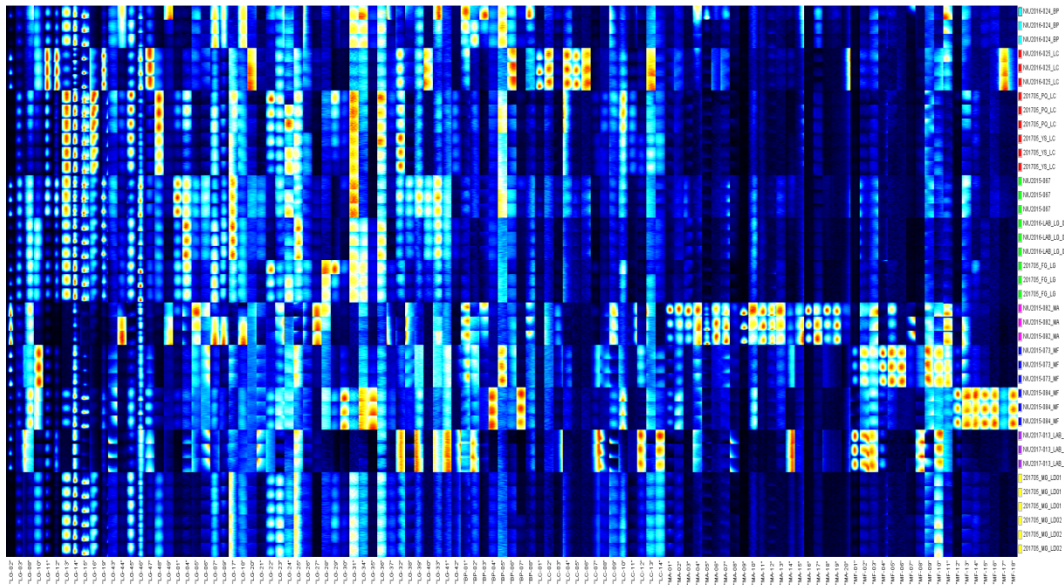
三、結果

一、蜜源種類的鑑別結果

不同蜜源種類蜂蜜樣品經 GC-IMS 分析所得色譜圖 (Topographic View) (圖一)，當中 A~G 圖分別為咸豐草蜜 (MKT-08)、荔枝蜜 (NLG-03)、龍眼蜜 (TWLG-25)、麥盧卡蜜 (MKT-16)、百花蜜 (NLG-01)、紅淡蜜 (NLG-02)、柳丁蜜 (MKT-11)。根據 13 件蜜源蜂蜜樣品分析所得色譜圖，選取各樣品訊號利用分析軟體產生訊號的指紋圖譜 (圖二)，透過指紋圖譜能夠更清楚看到選取的訊號在各蜜源樣品間產生的差異。

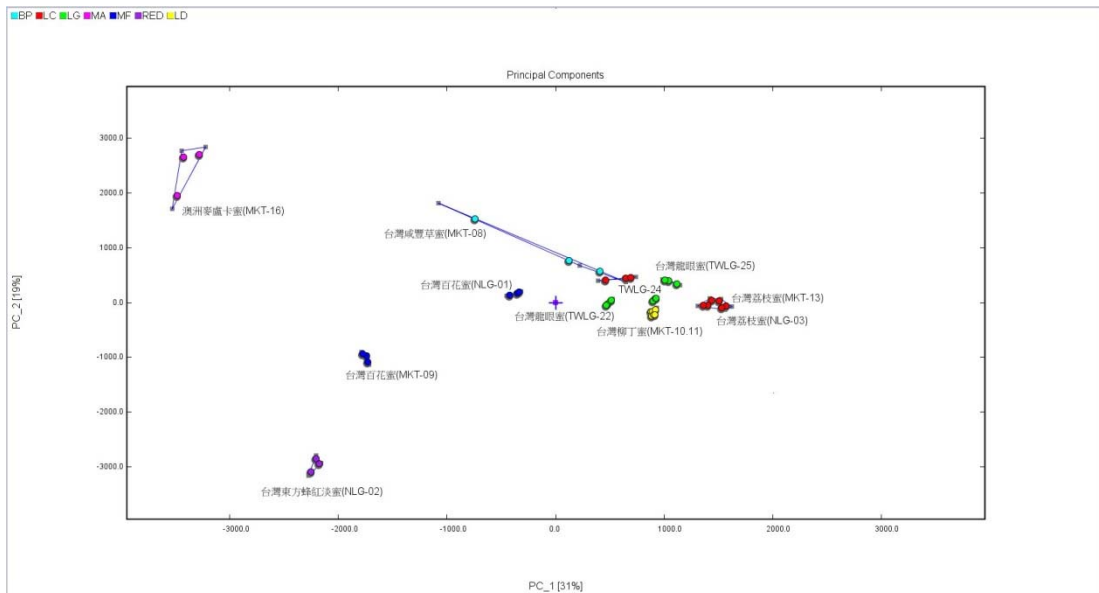


圖一、蜜源種類鑑別相關樣品的色譜圖 (Topographic View)：A~G 圖分別為咸豐草蜜、荔枝蜜、龍眼蜜、麥盧卡蜜、百花蜜、紅淡蜜、柳丁蜜的色譜圖。



圖二、蜜源種類鑑別樣品的指紋圖譜：右方由上而下依顏色分為咸豐草蜜、荔枝蜜、龍眼蜜、麥盧卡蜜、百花蜜、紅淡蜜、柳丁蜜。

再依據選取的訊號作主成分分析，結果如圖三，由圖上各種不同蜜源樣品分佈情形沒有重疊，代表能夠區分出各蜜源的不同。其中龍眼蜜 (TWLG-22、24、25)、荔枝蜜 (NLG-03、MKT-12、13) 為比較相近的蜜源 (無患子科)，所以位置上比較接近，柳丁蜜 (MKT-10、11) 也在分佈上與龍眼蜜較為相近；而百花蜜 (NLG-01、MKT-09) 和咸豐草蜜 (MKT-08) 則是差異性較大所以分佈不一，澳洲的麥盧卡蜜 (MKT-16) 與紅淡蜜 (NLG-02) 則是明顯與其他蜜不同。

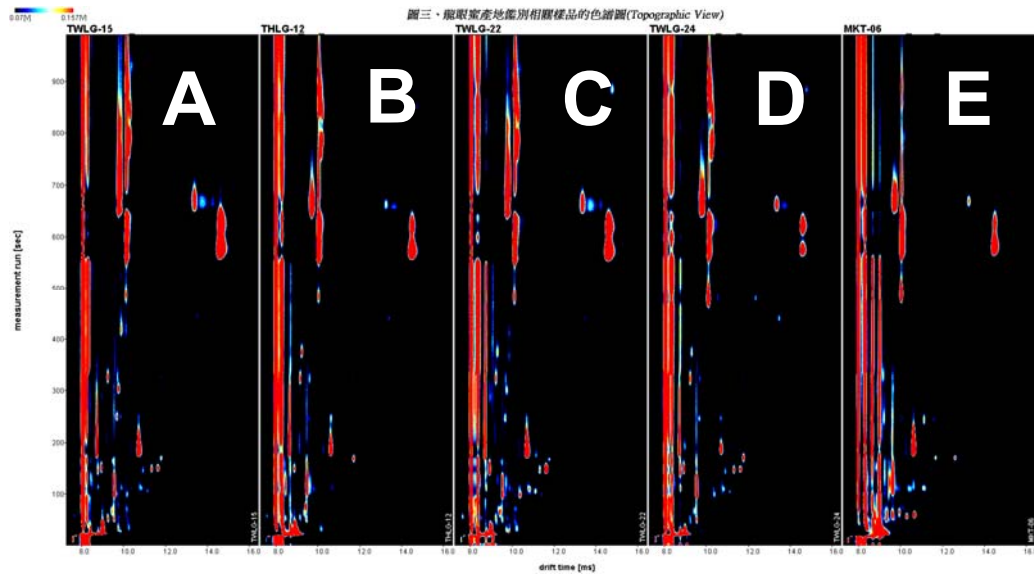


圖三、蜜源種類鑑別的主成分分析結果。

由以上結果可以瞭解在不同的蜜源蜂蜜樣品，透過 GC-IMS 分析之後所得到的訊號有所不同，而利用這些訊號作主成分分析可以得到具區別性的分佈結果。

## 二、龍眼蜜的產地鑑別結果

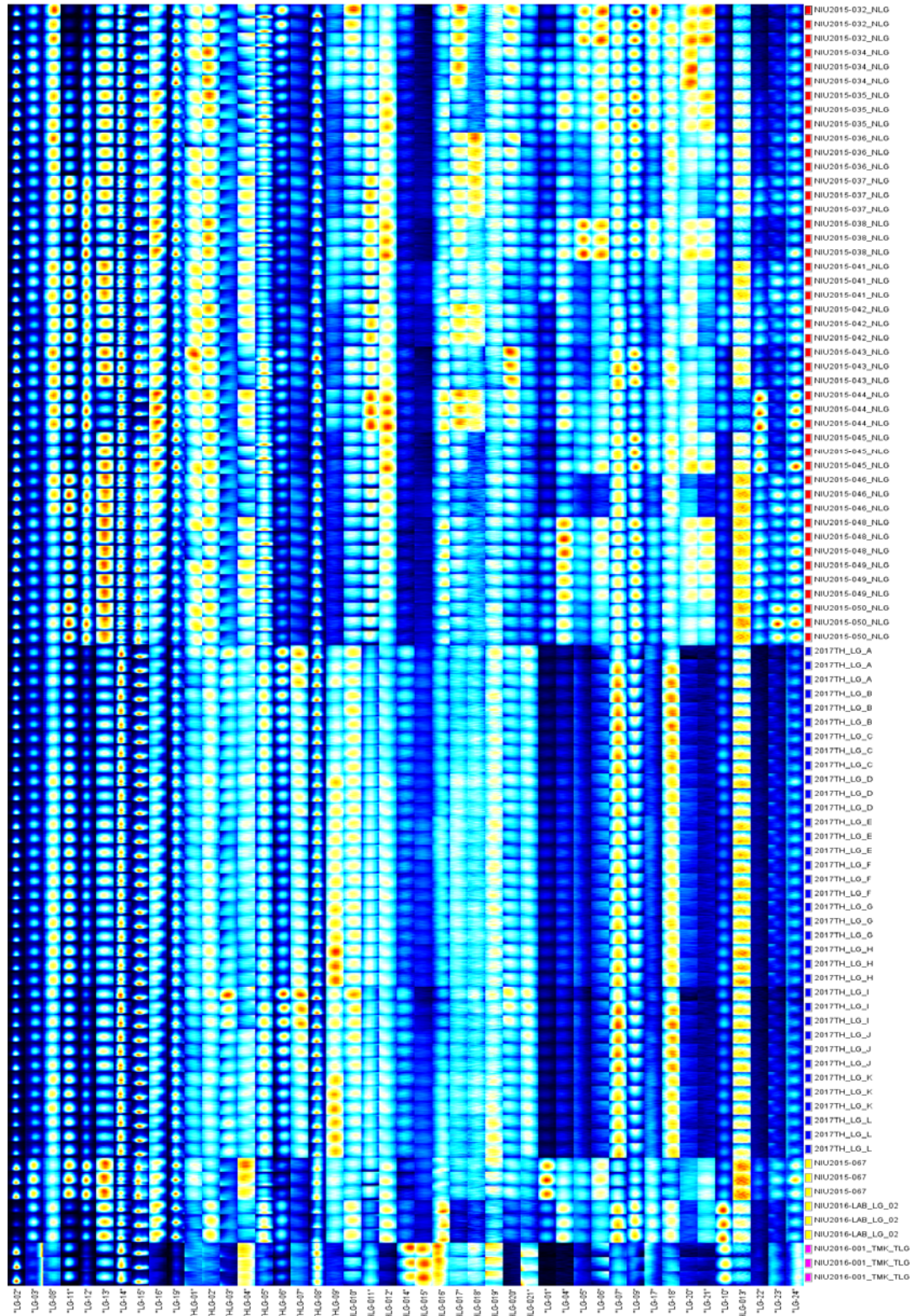
將台灣與泰國產龍眼蜜相關樣品利用 GC-IMS 分析所得色譜圖 (Topographic View) 如圖四所示，A. 為台灣龍眼蜜 (TWLG-15)，B. 為泰國龍眼蜜 (THLG-12)，C. & D. 為宜大驗證龍眼蜜 (TWLG-22、24)，E. 為泰國當地市售龍眼蜜 (MKT-06)，即使都是龍眼蜜但是分成上下兩個部份來觀察，可以發現部份訊號有所不同。



圖四、龍眼蜜產地鑑別相關樣品的色譜圖 (Topographic View)：A. 為台灣龍眼蜜，B. 為泰國龍眼蜜，C. & D. 為宜大驗證龍眼蜜，E. 為泰國當地市售龍眼蜜。

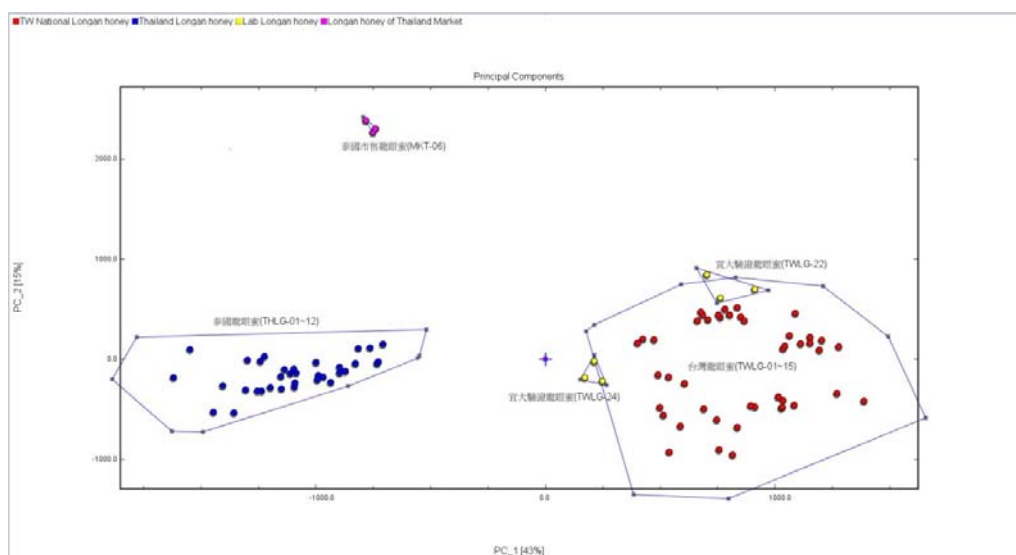
以台灣龍眼蜜 (TWLG-01~15) 和泰國龍眼蜜 (THLG-01~12) 作為標準參考品產生的訊號為主要選取的訊號，利用分析軟體產生訊號指紋圖譜 (圖五)，右方由上而下依顏色分為台灣龍眼蜜 (TWLG-01~15)、泰國龍眼蜜 (THLG-01~12)、宜大驗證龍眼蜜 (TWLG-22、24) 及泰國當地市售龍眼蜜樣品 (MKT-06)，下方為選取作分析的訊號編號。透過指紋圖譜更容易觀察訊號在不同群體間的差異，證明雖然都是龍眼蜜但是產地不同，訊號確實會有一些差異存在。





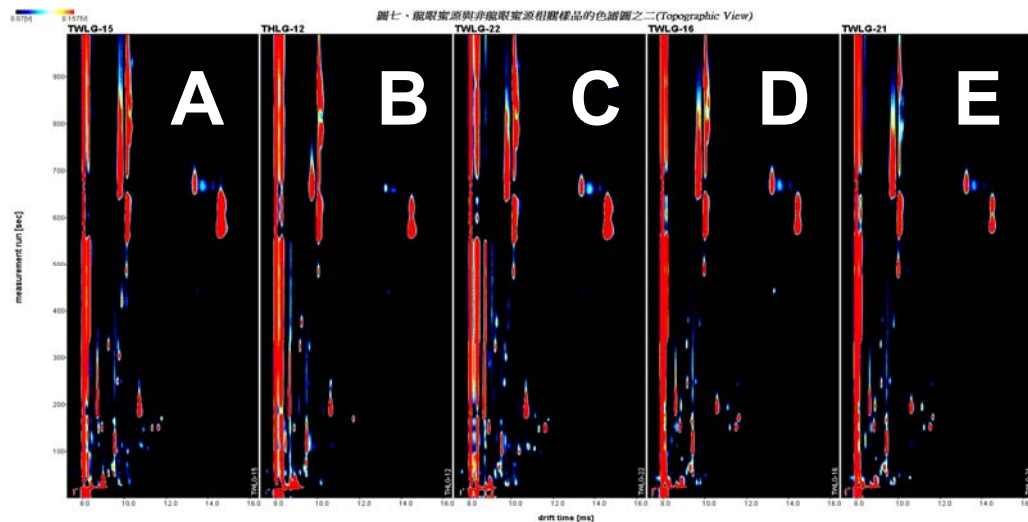
圖五、龍眼蜜產地鑑別相關樣品的指紋圖譜：右方由上而下依顏色分為台灣龍眼蜜、泰國龍眼蜜、宜大驗證龍眼蜜及泰國當地市售龍眼蜜樣品，下方為選取作分析的訊號編號。

最後將選取的訊號進行主成分分析，結果如圖六，由主成分分析所得的分佈圖可以清楚看到台灣龍眼蜜 (TWLG-01~15) 與泰國龍眼蜜 (THLG-01~12) 區分成兩個區域，且並無交集情形，代表能夠區分其產地的不同。兩個宜大驗證龍眼蜜 (TWLG-22、24) 則與台灣龍眼蜜 (TWLG-01~15) 處在相近一個區域中，代表屬於該群體品質相似的樣品，泰國當地市售龍眼蜜樣品 (MKT-06) 則不屬於任何一方，代表與參考品皆不相同。透過以上分析，與參考品比對能夠快速的初步對未知樣品作出區別，瞭解其產地身分的所屬。



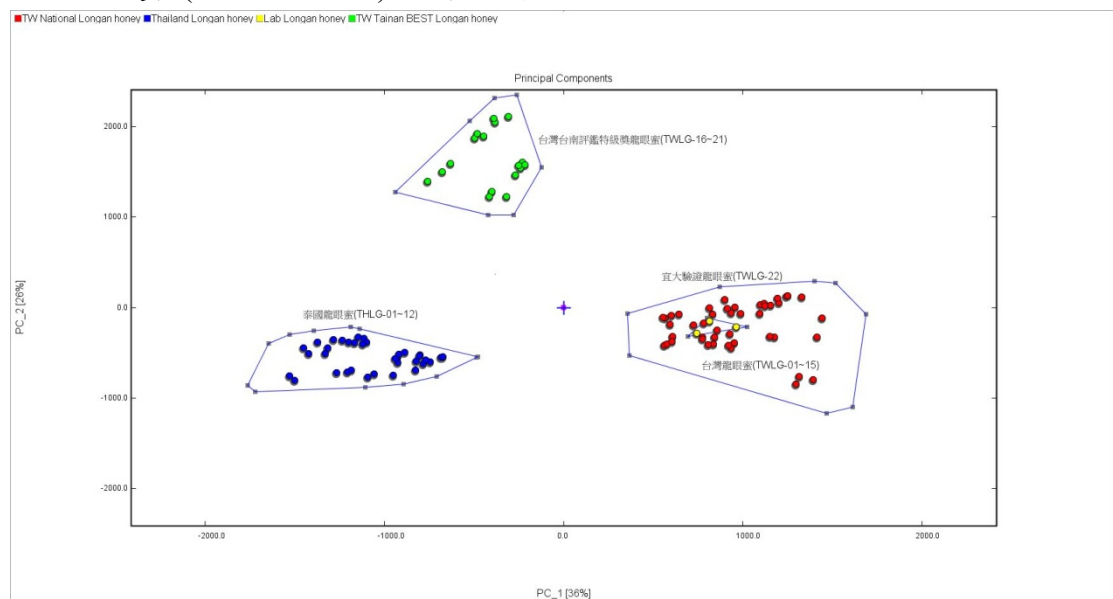
圖六、龍眼蜜產地鑑別的主成分分析結果。

另外六件龍眼蜜源樣品取自 2017 年台南市舉辦的龍眼蜜評鑑獲得特級獎的蜂蜜樣品，經 GC-IMS 分析所得色譜圖如圖七所示，A. 為台灣龍眼蜜 (TWLG-15)、B. 為泰國龍眼蜜 (THLG-12)、C. 為宜大驗證龍眼蜜 (TWLG-22)、D. & E. 為台南評鑑特級獎龍眼蜜 (TWLG-16、21)，由於都是龍眼蜜樣品，從色譜圖觀察是非常相像的。



圖七、龍眼蜜源與非龍眼蜜源相關樣品的色譜圖 (Topographic View) 之二：  
A.為台灣龍眼蜜、B.為泰國龍眼蜜、C.為宜大驗證龍眼蜜、D. & E.為台南評鑑特級獎龍眼蜜。

使用取自標準參考樣品群的訊號為代表，產生的訊號指紋圖主成分分析結果如圖八，結果顯示龍眼蜜蜜源的台南評鑑特級獎龍眼蜜 (TWLG-16~21) 樣品六件皆無接觸到台灣龍眼蜜參考樣品群的範圍。此結果與同為龍眼蜜源樣品的宜大驗證龍眼蜜 (TWLG-23~25) 結果相同。



圖八、龍眼蜜源與非龍眼蜜源鑑別的主成分分析結果圖之二：原本預期龍眼蜜蜜源樣品台南評鑑特級獎龍眼蜜六件應該在台灣龍眼蜜參考樣品的範圍內，但是由 PCA 分析結果並非如此。

## 四、討論

### 一、蜜源種類的鑑別

在前言所述台灣主要的單一蜜源蜂蜜為龍眼與荔枝蜜，其他種類的蜜源約占 10%左右，由於台灣地處溫帶與亞熱帶，氣候適合各種作物栽種，於是也產生各



式各樣的特色蜂蜜，雖然占整體蜂蜜的比例不高，但對於這些特色蜜該如何判別，也是一個待解決的問題。以蜂農在採蜜時，如果方圓 3 公里內該單一蜜源的作物量夠多、生長正常且開花情形良好，採蜜的蜜蜂數量適中，在採蜜期內無特別不良氣候影響，綜合以上條件方能得到純度、品質都好的單一蜜源蜂蜜。

因為影響因素眾多，對於單一蜜源的純度是比較難以定義其標準的，但若是比較不同蜜源間的差異，利用本實驗方法則能夠依據不同蜜源所產生特殊的氣味，透過 GC-IMS 分析後以色譜圖呈現其揮發性有機化合物所產生訊號分佈的情形，再經由選取訊號進行主成分分析來加以區別，是能夠辨別不同蜜源蜂蜜間的差異。

## 二、龍眼蜜的產地鑑別

龍眼蜜的產地鑑別主要針對泰國的龍眼蜜與台灣的龍眼蜜作區別，原因為台灣主要的蜂蜜進口國為泰國，從市面販賣的蜂蜜也能看到不少標示為泰國產地的蜂蜜，除了泰國之外還有越南為蜂蜜第二大進口國，但龍眼蜜為主的進口蜜還是泰國產居多，因此對泰國龍眼蜜與台灣龍眼蜜作產地的區別分析，結果也顯示泰國產的龍眼蜜與台灣產的龍眼蜜可以利用 GC-IMS 技術鑑別之。

## 五、參考文獻

- 安奎、何鎧光、陳裕文。2004。養蜂學。二版。台北：華香園。
- 盧美君(苗栗區農業改良場)。2016 年 8 月第 290 期。行政院農委會農業出版品農政與農情：台灣蜂產業發展及挑戰之因應策略簡介。
- Batista, B. L., Da Silva, L. R. S., Rocha, B. A., Rodrigues, J. L., Berretta-Silva, A. A., Bonates, T. O., Gomes, V. S. D., Barbosa, R. M. & Barbosa, F. (2012). Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International*, 49, 209-215.
- Consonni, R., Cagliani, L. R. (2008). Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6873-6880.
- Consonni, R., Cagliani, L. R., Cogliati, C. (2013). Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control*, 32, 543-548.
- Kropf, U., Golob, T., Nečemer, M., Kump, P., Korošec, M., Bertonec, J., & Ogrinc, N. (2010a). Carbon and nitrogen natural stable isotopes in Slovene honey: adulteration and botanical and geographical aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12794-12803.

- Kropf, U., Korošec, M., Bertoneclj, J., Ogrinc, N., Nečemer, M., Kump, P., & Golob, T. (2010b). Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. *Food Chemistry*, *121*, 839-846.
- Stanimirova, I., Üstün, B., Cajka, T., Riddelova, K., Hajslova, J., Buydens, L. M. C., & Walczak, B. (2010). Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. *Food Chemistry*, *118*, 171-176.

# 台灣北部野蜂養殖現況

陳柏融

## 川樹蜜蜂生態農場

這是一篇讓人心痛的報告，從去年夏天北部中蜂中囊病爆發到今天為止，中蜂蜂群的損失超過九成(表一)，其他倖存的少數蜂群病毒也沒有消失，中囊病的RNA病毒，就像人類愛滋病毒類型一樣，難以克制，這幾年北部的中蜂養殖技術在蘇清吉理事的指導下逐漸成熟正在大量擴大蜂群數量之際，沒想到從大陸傳染過來的中囊病，讓蜂群在短短的半年內就幾乎全軍覆沒，這不但是蜂農的損失也是生態的浩劫。

表一、野生蜜蜂養殖戶現況調查

姓名	去年蜂群	現有蜂群
蘇理事	50	1
黃圳來	50	4
陳添丁	40	5
吳志立	30	6
翁毓麟	20	1
陳福來	30	0
陳泰霖	80	5
吳興得	15	0
潘先生	40	6
廖先生	20	0
黃皇龍	50	6
吳先生	20	0
陳柏融	70	2

### 中囊病防治的經過

中囊病去年在北部爆發之後，每個蜂農都全力投入抗病的行列，目前所知的藥物幾乎都已用上，例如：奈米銀，金剛乙胺，大陸抗中囊病藥物及中草藥配方等等幾乎全部用上，最後都宣告失敗，汐止五指山有位潘先生完全不投藥防治，但結果和其他人差不多。

至於我的防治過程和其他人不太一樣，我的蜂群在北部全面爆發的時候也有採樣送驗，沒有驗不出病毒，這段時間我請教了一些醫學界的病毒專家，瞭

解 RNA 病毒的特性之後採取了下列的防治步驟：

1. 蜂具用次氯酸鈉全部消毒
2. 全面防止盜蜂
3. 加強防止虎頭蜂及螞蟻等外敵的侵擾
4. 將抗病毒藥物加入花粉團及糖水讓工蜂餵食蜜蜂幼蟲，主要是抑制水平感染

採取上述四項措施其實效果是不錯的，但到了去年底做錯了決定，加入抗生素餵食蜂群使得蜂群在半個月內全面崩潰，造成無法挽回的傷害，整個防疫的作戰以慘烈的結果告終。

### 野生蜜蜂的未來

雖然整個中囊病的防疫作戰如此慘烈，但是希望大家不要對野生蜜蜂的未來絕望，因為以野生蜜蜂的韌性來說假以時日一定會出現抗病毒的蜂種，因此在此呼籲大家用心照顧儘存的蜂群，不要去捕捉野外的蜂群，讓野生蜜蜂在大自然的環境中產生抗體，待抗病毒蜂群出現才有種蜂可以大量繁殖，最後希望國家及學術單位能投入資源進行基礎研究，謝謝大家。

# 畸翅病毒對西洋蜂幼蟲的影響

## The influence of deformed wing virus (DWV) on honey bee larvae

許博雅<sup>1</sup>、黃鈺峰<sup>2</sup>、陳裕文<sup>1\*</sup>、乃育昕<sup>1\*</sup>

1. 生物技術與動物科學系，國立宜蘭大學
2. 基因體中心，中央研究院

\*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

畸翅病毒 (Deformed wing virus, DWV) 為常見感染西洋蜂 (*Apis mellifera*) 的病毒，屬 Iflaviridae，正單股 RNA 病毒。其感染方式可由垂直及水平方式傳播。由於帶原 DWV 之內勤蜂仍需哺育巢內幼蟲，故亦可能將帶原之 DWV 傳播至幼蟲體內，且由於幼蟲對 DWV 耐受性較高，且無明顯的病徵判定，因此難以判定 DWV 對幼蟲的影響。本實驗利用人工感方式，藉此了解 DWV 對幼蟲的影響；定量病毒液接種於 3 日齡幼蟲食物，觀察蜜蜂幼蟲的生長與病毒量變化，結果顯示，感染組幼蟲期的死亡率於感染後第 9 天後開始上升至化蛹階段。感染組幼蟲體內帶原病毒量於感染後第 3、6 及 9 天均較對照組高；蛹期病毒量檢測結果發現對照組在第 9 天時病毒有下降趨勢，但感染組則是持續上升。此外，感染 DWV 後，羽化蜂后形態畸形比例較對照組高。推測 DWV 感染可能對蜜蜂生理、發育方面有多方面影響；為更清楚釐清 DWV 感染幼蟲後基因之調控，取對照組與感染組之 7 日齡幼蟲進行轉錄子分析；初步分析結果顯示對照組及感染組單獨表現的基因數量為 1701 以及 871；此外，就高差異表現基因方面，目前預估有 180 個，154 個為下調，26 個為上調基因。進行 KEGG Pathway 分析結果顯示，共有 22 有基因涉及 7 種不同的生理代謝途徑之調控。未來將繼續完成轉錄子數據分析，並進行基因差異表現實驗驗證。

**關鍵字：**畸翅病毒、西洋蜂、人工幼蟲感染、轉錄子分析



## 一、前言

蜜蜂通常指的是屬於節肢動物門 (Arthropoda)、昆蟲綱 (Insecta)、膜翅目 (Hymenoptera)、蜜蜂科、蜜蜂屬 (*Apis*) 下的蜜蜂種類，其成員包括：小蜜蜂 (*A. florea*)、大蜜蜂 (*A. dorsata*)、東方蜂 (*A. cerana*)、以及西洋蜂 (安等, 2004)。在蜜蜂種類中，以西洋蜂 (*Apis mellifera*) 最廣為人知，而全世界蜂場大多以飼養較溫馴的西洋蜂為主，在台灣常見的品種包含東方蜂及西洋蜂兩種。正常蜂群組成由一隻蜂王、數百隻雄蜂、和數千隻工蜂組成，為社會性昆蟲。工蜂會在不同階齡所擔任的工作不同，初羽化工蜂首要任務為清掃巢房，接著照護幼蟲、修建巢房、擔任守衛蜂，至二十日齡後則成為外勤蜂，擔任在外採集花蜜及花粉，是支撐著蜂群的重要角色；而蜂王在交尾後，終其一生擔任產卵繁衍後代的角色。

就蜂產品而言，西洋蜂產蜜量高於其他蜜蜂品種且多樣性高，所生產的蜂產品價格亦甚高，包含蜂蜜、蜂花粉、蜂王乳、蜂蠟、蜂膠等。除蜂產品外，西洋蜂本身也是開花植物繁殖所需主要授粉昆蟲，全世界約有 80% 以上的開花植物需要藉由西洋蜂授粉，更有高達 90% 以上是屬於人類食用的糧食作物，若缺少了蜜蜂授粉，則會間接或直接影響到人類的蔬果來源，全球藉由蜜蜂授粉所生產的經濟作物價值已經超過 2,150 億美金每年 (Škubník *et al.*, 2017)。

然而，近十至二十年來蜂群大量異常的死亡，從 1994 年歐洲發生蜂群失調崩解症候群 (Colony collapse disorder, CCD) 警訊後，更於 2006 年在美國出現蜜蜂大幅度的消失 (Stokstad, 2007)。而造成 CCD 最受關注的兩大原因為『農藥施用與殘留』以及『蜜蜂寄生生物與疾病』(Underwood *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2008; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010)。近年來，有機無毒農業以及友善環境的觀念興起，許多國家開始注意農藥使用相關議題，減少甚至禁止施用特定農藥；屏除農藥對於蜜蜂的影響，蜜蜂的寄生性疾病亦為一重要議題。目前蜜蜂的疾病主要包含：寄生生物、真菌、細菌、以及病毒等類型，其中以病毒性疾病最為難以根治。

蜜蜂病毒種類繁多，目前已知蜜蜂病毒約有 24 種 (De Miranda *et al.*, 2013)，最早於 1963 年在蜜蜂身上隔離出慢性麻痺蜜蜂病毒 (Chronic bee paralysis virus, CBPV) 以及急性麻痺蜜蜂病毒 (Acute bee paralysis virus, ABPV) (Bailey *et al.*, 1963)，而 2006 至 2007 年在美國境內所發生的 CCD，當時證實可能與以色列急性麻痺病毒 (Israeli acute paralysis virus, IAPV) 有關 (Cox-Foster *et al.*, 2007)。目前在台灣常見的蜜蜂病毒包含：ABPV、BQCV、CBPV、DWV、IAPV、KKV、SBV、VDV-1 等 8 種病毒 (王等, 2009；及 盧等, 2010)。在西洋蜂病毒中，以 DWV 最為普遍且全年皆可帶原，尤其好發於春秋兩季，不論蜂群強弱，一年四季中蜂群內所帶原 DWV 的成蜂比例不少於 20% (Di Prisco *et al.*, 2011)。

DWV 屬於微小 RNA 病毒 (Picornavirus)，黃病毒科 (Iflaviridea)，其病毒顆粒大小為 30nm、二十面體 (Icosahedral) 的病毒顆粒，基因體為正股單股 RNA (ssRNA positive-strand RNA)，長度為 10.14 kb。蜜蜂感染 DWV 後的較明顯之病徵為翅膀畸形及腹部腫脹短小，而感染後死亡率也會提高，嚴重感染時，容易導致蜂巢崩解。DWV 之傳播方式可經由垂直及水平方式傳播；水平方式主要以蟹蟎 (*Varroa destructor*, Mite) 為媒介傳播或口糞傳播 (Rosenkranz *et al.*, 2010)；以蟹蟎攜帶傳播發生病癥的機率較高，因此蜂場多半於春秋兩季防治蟹蟎，也一同防治其他蟹蟎可能帶原的病毒。而口糞傳播應與帶原病毒之內勤蜂交哺幼蟲有極大關聯。垂直帶原通常是透過已受到 DWV 感染的蜂王卵巢或雄蜂的精子將可能潛伏在內的 DWV 帶給新生蜂群。

許多研究主要探討蛹期及成蜂感染 DWV 後的死亡率、致病力及行為能力上的影響，進行 DWV 感染多以人工注射方式感染 (Bailey and Gibbs., 1963; Graystock *et al.*, 2015; Benaets *et al.*, 2017)；而注射劑量方面，蟹蟎感染 DWV 至成蜂體內，以  $10^8$  GE (Genome equivalents) 注射可全身性感染，口餵為  $10^8$  GE 時能造成局部腸道感染，蛹期對病毒的敏感度較高，少量病毒注射就能夠產生病徵 (Möckel *et al.*, 2011)。相較之下，由於幼蟲對於病毒的耐受性較高，口服感染所需病毒劑量亦較高，約  $10^{10}$  GE，且早期感染無明顯病徵，因此很難以判定 DWV 對幼蟲的影響 (Ryabov *et al.* 2016)。然而，西洋蜂屬於完全變態昆蟲，進入各個不同階段對蟲體而言都是巨大的改變，幼蟲期專注於進食及快速增長，而前蛹期則是進入昆蟲變態的過程，因此我們設計在幼蟲早期感染定量 DWV 進行觀察並及基因表現差異分析，期能在此階段找出 DWV 對蜜蜂幼蟲生長之基因調控。

本實驗將透過建立幼蟲感染 DWV 系統，釐清 DWV 在幼蟲不同階段時病毒量的差異，以及死亡的時間點等，以微觀的角度去探討 DWV 對蜂群幼蟲的影響；因此在實驗室內恆溫恆濕飼養，減少外界環境影響，排除蟹蟎或其他接觸性疾病的感染，於幼蟲約 3 日齡時給予定量 DWV，觀察在幼蟲至羽化階段內的病毒量複製、死亡率及成蜂形態差異；為瞭解 DWV 感染後幼蟲體內基因表現之調控，我們利用次世代定序技術進行 DWV 感染幼蟲後的轉錄子分析，探討這些差異性表現基因是否與生長相關調控有關。

## 二、材料方法

### 1. 實驗蜂群及幼蟲取樣

本次實驗動物皆來自國立宜蘭大學蜂場內所飼養的西洋蜂 (*A. mellifera*)，試驗蜂群皆有正常產卵能力的蜂王且無明顯特殊病原的蜂群，作為實驗用樣本來

源。幼蟲收集部分取約一日齡的幼蟲進行飼養，實驗分為對照組及感染組，每組 150 隻幼蟲，其中 50 隻為取樣組，100 隻為死亡率、生長狀況、成蜂畸翅率以及階級紀錄觀察組。本實驗進行三重複實驗。

## 2. 幼蟲飼養系統建立及感染

基本幼蟲飼糧配製 (Basic Larval Diet, BLD) 參考 Crailsheim *et al.*, 2013 以及 Aupinel *et al.*, 2005 中的幼蟲飼養方式，基本幼蟲飼糧配方主要以蜂王乳為主，佔 50%，另外再加入 D-葡萄糖 (6%)、D-果糖 (6%)、酵母萃取物 (1%) 以及乾淨二次水 (37%)。幼蟲飼養及管理條件參考 Di Prisco *et al.*, 2011，溫度範圍在  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  左右，而濕度則是 95% RH，進入前蛹期後調至 70% RH。實驗餵飼採任食方式，每日更新基本幼蟲飼糧。人工幼蟲飼養。一日齡的幼蟲於取出巢箱後，前兩日以每格 10 隻幼蟲的方式飼養於 24 孔盤，每日更換飼糧，第 3 日置換為每格 5 隻飼並養接種病毒；感染組幼蟲加入定量 DWV 之飼糧，對照組則加入等量之 PBS 緩衝溶液；病毒接種後 3、6、9 日於各組收集三隻幼蟲樣本置於  $0.1\times\text{PBS}$  溶液，放置  $-80^{\circ}\text{C}$  保存，以後續實驗使用；轉錄子分析之樣則於接種病毒後第 4 日取樣。實驗過程中，每日紀錄死亡率；幼蟲進入前蛹期則將剩餘飼糧移除，並移至 12 孔盤（每格一隻）待其羽化，羽化之成蜂，以鑷子夾出，比較成蜂階級及外部型態並記錄之。

## 3. DWV 病毒樣本檢測及製備

病毒樣本採集由幼蟲或蛹各收集 10 隻，將樣本加入  $0.1\times\text{PBS}$  均質，取 200 $\mu\text{l}$  以 TRIzol 進行 RNA 萃取，RNA 萃取方法參考使用手冊；其餘樣本則放置於  $-80^{\circ}\text{C}$  保存備用。RNA 樣本利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 檢測病毒帶原；反轉錄參考商品使用手冊以 Super Script III Reverse transcriptase 及 Oligo-dT 進行，合成 cDNA。cDNA 樣品稀釋 10 倍後進行 PCR 反應偵測病毒帶原以 Bata-actin 為內控制組，反應樣本以 DNA 電泳分析，並記錄病毒帶原種類。本實驗所使用配置基本幼蟲飼糧亦一併加入檢測。

檢測為 DWV 陽性反應之樣本，進一步使用 Thermo scientific DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR kit / Applied Biosystems StepOne™ Real-time PCR systems 檢測其 DWV 病毒之拷貝數 (Copy number of DWV)，以供病毒定量感染使用。

## 4. 轉錄子分析

## 4.1 蜜蜂轉錄子定序

為釐清 DWV 感染後是否會造成幼蟲基因上的差異，利用次世代定序方式 (NGS) 比較兩者的差別，由樣本 RNA 萃取、Illumina library 製備、定量至 Illumina MiSeq 上機實驗流程請參考 (附錄一)。數據分析部分可利用 NCBI 蜜蜂基因體資料庫 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/48>)，其提供全基因體序列以及全轉錄體序列資料，藉由將讀長序列分別與全基因體序列以及全轉錄體序列進行比對後，相關配對到的基因資訊將可進一步瞭解本研究在基因表現上的差異狀況。

## 4.2 Raw Data analysis

此次 DNA 定序是利用 Illumina MiSeq 對兩個基因體建庫(實驗組與對照組)進行定序，採行 Paired-end 定序技術，而讀取的序列長度為 300bp 長。DNA 定序完成後，我們將取得 FASTQ 格式的檔案，亦即定序片段兩端的讀長序列(R1: 5'-與 R2: 3'-)。接著將進行讀長序列的品質檢測，由於在定序建庫的過程中加入了 PhiX control，因此必須將可能殘留的 PhiX control 讀長從 FASTQ 資料中移除。移除的方式是透過將所有的 Paired-end 讀長序列利用 Bowtie2 對 PhiX 基因體進行比對，比對到的 Paired-end 讀長將從序列資料中移除。接著將對每條讀長序列進行 sequencing adapter 的片段移除，經由使用 cutadapt 將 sequencing adapter (Index adapter 與 universal primer)於讀長序列中裁切，保留下來的就是真正屬於 RNA 資訊的讀長序列。位於 5'與 3'端的 polyN 序列也會將其於讀長序列中切除。由於對於讀長序列的品質保證，包含單一核酸以及整段讀長序列，PRINSeq 與 NGS QC Toolkit 將分別將 quality value 較差的單一核酸或片段進行裁切。最終，讀長至少須留有 30bp 長的讀長序列將作為最終高品質的讀長序列。這些高品質的讀長序列接著將以 Bowtie2 分別進行全基因體與全轉錄體的讀長序列比對，比對的條件為單一配對位置以及 R1 與 R2 讀長序列方向須為 FR。

## 4.3 Difference Expression Gene, DEG

使用 Integrative Genomics Viewer (v 2.3.97) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/home>) 將樣本與 NCBI 上的基因資料庫做對比，分別找出 genomic DNA 以及 mRNA 在染色體以轉譯修飾後相符的位置。比較方式分為：獨立表現的基因，其中一方有表現，另一方並無基因表現；以及兩者皆有表現的基因。在皆有表現的群組中，分出可能為 housekeeping gene 作為穩定檢測標準的依據；另外，以定序深度最高值互相比較，挑選出超過 200 以上的差值，並找出其基因名稱，比對為上調或下降，以及其功能。此外，我們亦採用了 *de novo* transcriptome assembly 進行表現差異基因的研究，將組裝

好的轉錄體序列與西洋蜂的全轉錄體序列進行配對，進一步了解在實驗組與對照組間的差異表現。此一分析可做為 validation。

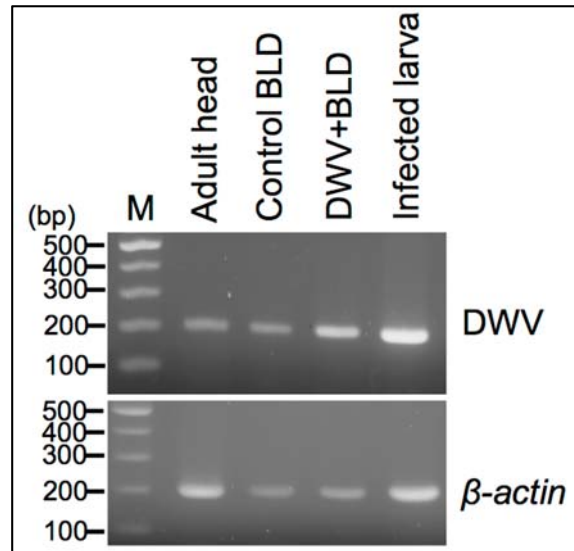
#### 4.4 KEGG Pathway 分析

將上述所得有差異表現的基因列表以 KEGG 所提供的 Pathway mapper (<http://www.genome.jp/kegg/mapper.html>) 可以搜尋到基因所在的 Pathway 以及在該 Pathway 中的相關基因組資訊。此外，透過 KASS (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>)，可將組裝好的轉錄組序列作為輸入，藉由找尋相關的親近基因 (homologous 或 orthologous gene)，如此可獲得更多相關的 Pathway 資訊。這是因為西洋蜂基因組的註記尚未完整，因此藉由親近基因的查找可增加我們對於相關 Pathway 的瞭解。

### 三、結果與討論

#### 1. DWV 病毒樣本檢測及定量

DWV 病毒檢測結果顯示四個樣本（成蟲頭部、對照組基本幼蟲飼糧、感染組基本幼蟲飼糧、感染之幼蟲）均可檢測出 DWV 病毒帶原（圖一）。由於基本幼蟲飼糧中除蜂王漿外，上具有其他營養物質且濃稠，萃取 RNA 需稀釋，故顯示病毒條帶較弱。針對對照組基本幼蟲飼糧、感染組基本幼蟲飼糧進行其他常見病毒檢測亦發現其中含有 BQCV 以及 KV 兩種病毒（data not shown）。由此結果推測在實驗配置的基本幼蟲飼糧中，所含隻蜂王漿，亦帶有微量 DWV 感染；故在進行病毒定量感染食應將此因素考慮隻實驗結果中。此外，BQCV 以及 KV 兩種病毒亦可被偵測到，是否對實驗造成影響，未來將可進一步調查。將製備好之 DWV 病毒樣本進行絕對定量，以利後續感染實驗，檢測結果顯示原始病毒溶液中每  $\mu\text{l}$  內所含的病毒拷貝數 (Copy number) 為  $4.58 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{l}$ ；感染組幼蟲飼糧病毒量為  $2.59 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{l}$ ，故平均每隻幼蟲可食用病毒總量約為  $5.18 \times 10^9$  copies。由於對照組幼蟲食物中，病毒含量為  $2.64 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{l}$ 。參考 Crailsheim *et al.* 2013，幼蟲期每日最高量可食入基本幼蟲飼糧量為  $160\mu\text{l}$ ，故兩實驗組幼蟲全期中所攝入的病毒總量，對照組約為  $4.22 \times 10^7$  copies，感染組約為  $9.16 \times 10^{10}$  copies，兩者間相差 2169 倍。未來實驗可考慮篩選 DWV 病毒量較低之蜂王漿配置基本幼蟲飼糧，或進行餵食 DWV 之 dsRNA，已排除對照組感染病毒之因素。



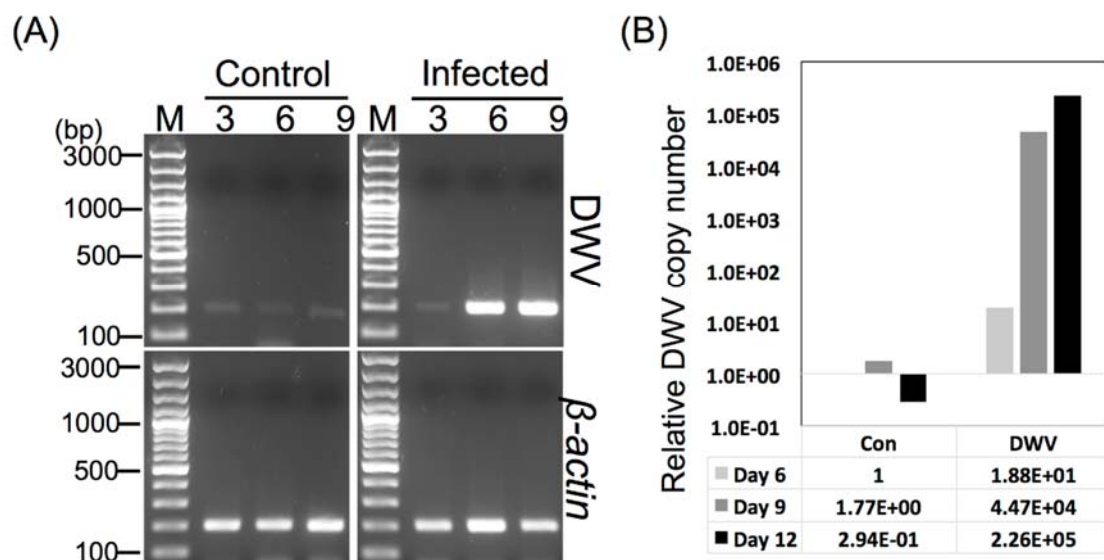
圖一、DWV 病毒檢測。 Adult head= 成蜂頭部； Control BLD= 對照組基本幼蟲飼糧； DWV+BLD= DWV 感染組基本幼蟲飼糧； larva= 感染幼蟲。

## 2. DWV 病毒人工感染試驗

### 2.1 DWV 感染檢測

人工感染幼蟲、前蛹、以及蛹之病毒檢測人工感染三日齡幼蟲後，分別為飼養第 6 日（接種病毒後 3 日）、第 9 日（接種病毒後 6 日）、及第 12 日（接種病毒後 9 日），進行 DWV 檢測與定量（圖二）；結果顯示，對照組中仍有微微的條帶產生代表有輕微 DWV 存在；感染組條帶在感染後有明顯增強，此結果代表 DWV 於人工感染後於幼蟲體內開始大量複製，且在不同發育階段病毒複製也隨之上升。進一步進行病毒絕對定量，結果顯示飼養後第 6、9、12 日的對照組及感染組病毒量分別為  $5.10 \times 10^6$ 、 $9.05 \times 10^6$ 、以及  $1.50 \times 10^6$ ； $9.58 \times 10^7$ 、 $2.28 \times 10^{11}$  及  $1.15 \times 10^{12}$  copies（圖二，B）。圖為以對照組飼養後第 6 日為分母，與對照組本身以及感染組第 6、9、12 日的比值，分別為 1、1.77、0.294 以及 18.8、44700、226000，從中發現在感染組的病毒量亦呈現逐漸增加的趨勢；尤其最後一次取樣（飼養後第 12 日），對照組與感染組病毒量相差高達 77

萬倍。對照組在持續餵飼基本幼蟲飼糧後與上述對照組基本幼蟲飼糧檢測出 DWV 帶原結果相符，即在蜂王漿中帶有微量 DWV，在餵食過程中議會感染幼蟲；在自然蜂巢情況下，此一現象仍無法避免，也再次提供證據證實 DWV 水平傳播之途徑。而感染組為以高劑量隻病毒，感染結果也顯示出病毒量逐漸增加的趨勢，推測由於在進入下一發育階段，生理調控、免疫系統上出現耗弱期，此時病毒便可大量複製造成，此部份可於未來進一步實驗證實。



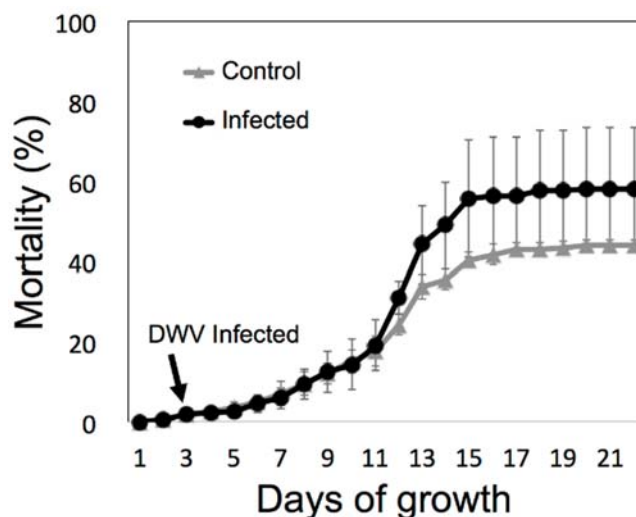
圖二、DWV 感染檢測。幼蟲期：飼養第 6 日 (接種病毒後 3 日)、前蛹期：飼養第 9 日 (接種病毒後 6 日)、蛹期：飼養第 12 日 (接種病毒後 9 日) 進行 DWV 檢測；(A) DWV 感染檢測電泳；(B) qPCR 病毒定量。

## 2.2 幼蟲死亡率觀察

死亡率紀錄結果發現對照組及感染組幼蟲在前期 (約飼養後第 11 日) 的死亡率無明顯差異，對照組以及感染組分別為 5.08%、4.63%。而飼養至第 11 日起 (進入蛹期階段)，感染組逐漸與對照組的死亡率拉開，直到第 15 日死亡率就逐漸趨於穩定，在實驗結束後兩者的死亡率分別為 43.95%、57.89%，兩者之間相差 13.94% (圖三)；由於，三次實驗中，感染組的死亡率變動差異甚大，可以看到在誤差值的數值略高。將對照組與感染組做 t-test 分析，比較發現兩者間死亡率有顯著性差異 ( $p < 0.001$ ) 表示其死亡可能與高劑量的 DWV 病毒感染有關。由死亡率結果觀察發現，幼蟲於前期的死亡率不高，幼蟲感染高劑量 DWV 也不會有立即性的死亡，但進入前蛹期末期時，死亡率就逐漸提高，發現此時期的 DWV 病毒量檢測結果在對照組中病毒量較前兩個時期少，相反的，對照組則是在幼蟲期擁有最高的病毒量。關於 DWV 感染成蜂與前蛹期實驗，Möckel *et al.* (2011) 模擬蟹蟎感染 DWV 至成蜂體內，口餵為  $10^8$  GE 時僅能造



成局部腸道感染，而蛹期對病毒的敏感度較高，少量病毒注射就能夠產生病徵。相較之下，由於幼蟲對於病毒的耐受性較高，Ryabov *et al.*, 2016 指出幼蟲口服感染所需病毒劑量約  $10^{10}$  GE，且早期無明顯的病徵判定，因此很難以判定 DWV 對幼蟲的影響，與實驗結果相符，但進一步檢測病毒量，發現在高劑量感染下會於發育時期轉換時大量複製且隨之而來導致死亡率逐漸升高。

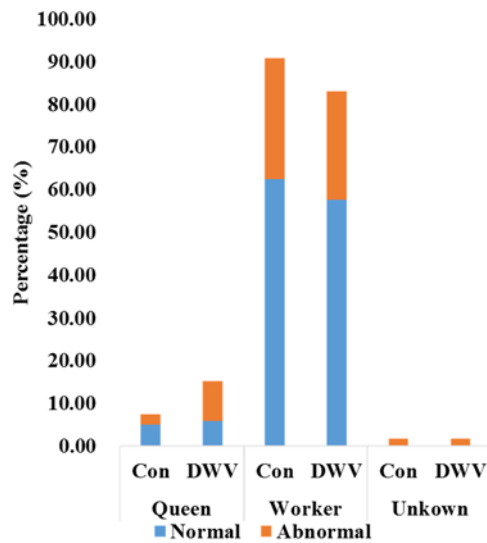


圖三、幼蟲感染 DWV 死亡率統計圖。

### 2.3 成蜂階級及型態異常比例

在人工感染實驗過程中，除記錄絲網率及檢測病毒複製外，我們亦記錄成蜂羽化之階級比例及其型態特徵（圖四），結果顯示對照組蜂王形態正常與不正常的百分比為 5.00% 及 2.50%，感染組為 5.93% 及 9.32%；工蜂形態正常與不正常的百分比，對照組為 62.50% 及 28.33%，感染組為 57.63%、25.42%，感染組具有病癥蜂王的比例為正常蜂王 1.57 倍，對照組則為 0.5 倍，而工蜂的數值兩者接近。在幼蟲前期感染病毒，病毒會將遺傳物質存於幼蟲細胞中進行複製，在幼蟲排便後進入下一發育階段（前蛹期），此時的蟲體不再進食，並且持續消耗能量直至羽化，病毒則會開始與蟲體做能量競爭，變態時期型態會慢慢改變，推測在此時病毒可多方面影響寄主各種代謝調節基因之表現而開始複製病毒，因而使感染組的病毒量平均值遠高於對照組，且進一步造成影響。縱觀上述結果，在病毒複製量、死亡率及成蜂型態，本實驗先進行初步轉錄子分析，已先檢視在幼蟲早期受高劑量 DWV 感染後可能影響之基因調控。





圖四、成蜂階級比例圖。

### 3. 幼蟲於高劑量 DWV 感染之轉錄子分析

#### 3.1 轉錄子定序資料統計

對照組與感染組序列經過篩選後其所得之序列條數分別為有配對(paired)的 5,180,306 及 4,230,676 條以及單邊 (single fragment) 459,665 條及 363,303 條，並進行比對分析。比對分析結果顯示，對照組可與 NCBI 蜜蜂基因體之 mapping rate 為 64.59%；而感染組對於蜜蜂基因體之 mapping rate 為 63.31%，此結果表示定序實驗物種並無其他污染。比對蜜蜂之全基因體 RNA 序列之 mapping rate 對照組為 71.02%，感染組為 74.62%(表一)。

表一、轉錄子定序資料統計

Library	Control		Infected	
	R1	R2	R1	R2
%GC (Raw)	35	35	37	37
Raw	5,720,758	5,720,758	4,664,676	4,664,676
PhiX removal	5,694,965	5,694,965	4,638,992	4,638,992
Index adapter trimming	5,692,771	5,693,232	4,637,426	4,637,643
Base quality checking	5,686,603	5,687,195	4,632,485	4,632,626

PolyN trimming	5,683,745	5,685,969	4,629,709	4,631,160
Read quality checking	5,537,393	5,282,884	4,510,181	4,314,474
Read quality checking (PE/SE)	5,180,306 / 459,665		4,230,676 / 363,303	
%GC (Quality; R1, R2, SE)	35, 35, 36		37, 36, 37	
Mapping rate (genome)	64.59%		63.31%	
Mapping rate (RNA)	71.02%		74.62%	

### 3.2 差異表現基因分析 (Differential expression gene analysis)

結果分成對照組及感染組單獨表現的基因數量為 1701 以及 871，而皆有表現的基因數量為 11,518 個，在這之中表現量差異高達 200 以上的基因數量為 180 個，154 個為下調，26 個為上調基因。KEGG Pathway 分析結果顯示，180 個高差異表現之基因，經由 KEGG mapper 分析結果顯示，共有 22 有基因涉及 7 種不同的生理代謝突進調控；詳述如下：8 個基因涉及代謝相關途徑之調控；有 3 個基因涉及壽命相關途徑之調控；有 3 個基因涉及核糖體相關途徑之調控；有 2 個基因涉及氧化磷酸化相關途徑之調控；有 2 個基因涉及碳代謝相關途徑之調控；有 2 個基因涉及過氧化小體相關途徑之調控；有 2 個基因涉及內質網（蛋白質合成）相關途徑之調控。由感染實驗結果所推測，病毒可多方面影響寄主各種代謝調節基因之表現而開始複製病毒，進一步造成影響。由初步轉錄子分析結果，檢視在幼蟲早期受高劑量 DWV 感染後影響之基因調控可能相當繁複，尤其許多免疫相關基因被調控，此部分結果尚在分析階段，未來將再做進一步分析及實驗驗證確認。

#### 四、結論

由本實驗結果發現，高劑量及低劑量的 DWV 感染幼蟲，在病毒複製、死亡率及發育為蜂后之形態上，確實造成一定程度之差異；由此實驗也證實 DWV 對於蜜蜂之影響不僅在成蜂，其所影響時間點可進一步追溯至幼蟲時期，經由帶原病毒之內勤蜂互相交哺開始。經轉錄子初步分析結果顯示，幼蟲早期感染病毒確

實可多方面影響寄主各種代謝調節基因之表現，進而造成生長發育之影響，此部分結果未來仍須進一步確認。

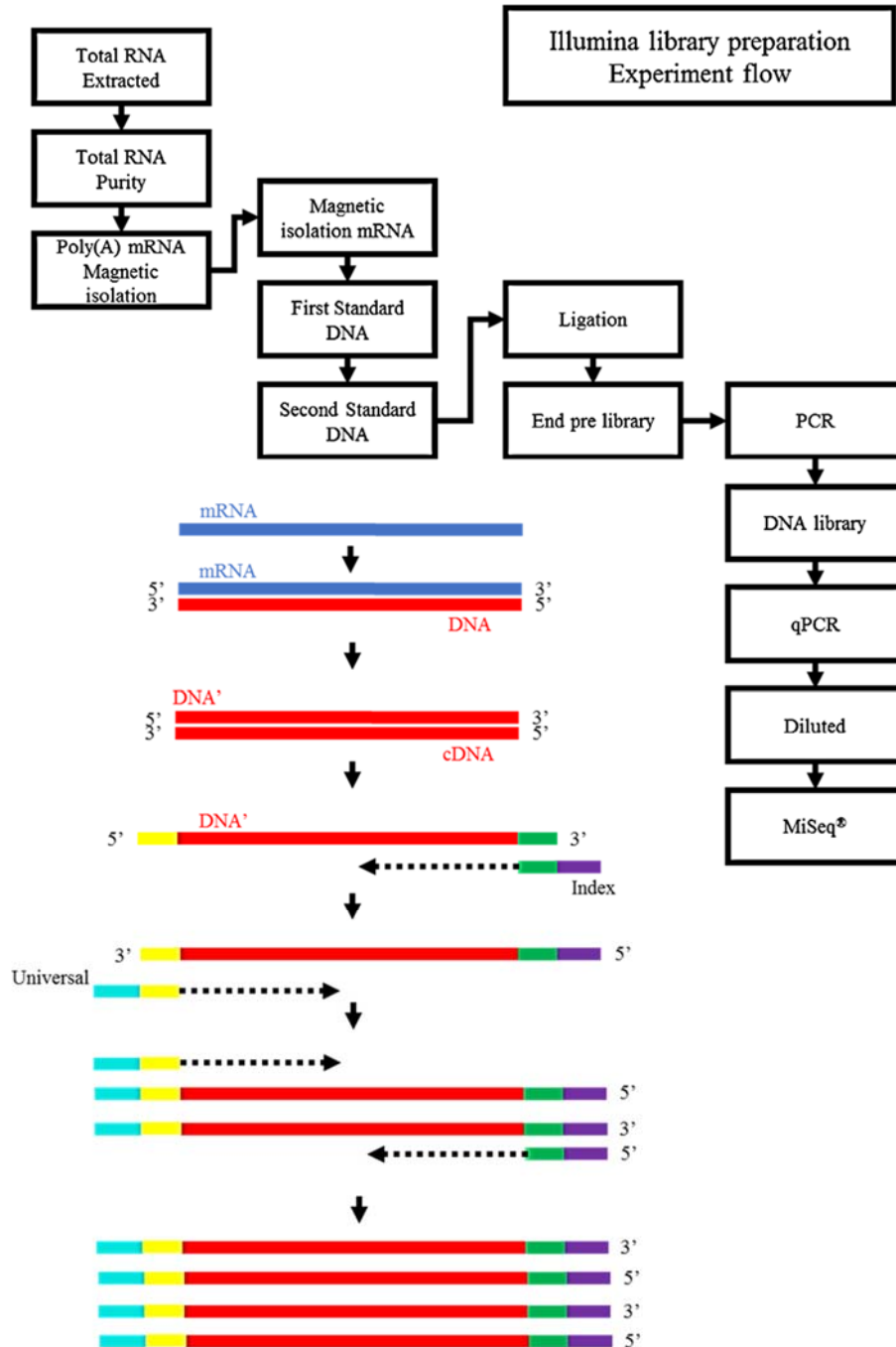
### 五、參考文獻

- 安奎、何鎧光、陳裕文。2004。養蜂學。國立編譯館主編。華香園出版社列印
- 王重雄、羅竹芳、乃育昕、王智源、陳韻如、簡慈盈、吳治宇。2009。蜂群衰竭失調症。台灣昆蟲。29:119-138。
- 盧美君、吳輝虎、侯鳳舞。2010。台灣地區蜜蜂病毒監測。苗栗區農業專訊。51:1-2。
- Aupinel, P., D. Fortini, H. Dofour, J.-N. Tasei, B. Michaud, J.-F. Odoux, and M.-H. Pham-Delegue. 2005. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae Bull. Insectology 58(2):107-111.
- Bailey, L., A. J. Gibbs, R. D. Woods. 1963. Two viruses form adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virol. 21:390-395.
- Benaets, K., A. V. Geystelen, D. Cardoen, L. D. Smet, D. C. de Graaf, L. Schoofs, M. H. D. Larmuseau, L. E. Brettell, S. J. Martin, and T. Wenseleers. 2017. Covert deformed wing virus infection have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. Proc. R. Soc. B 284:20162149.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD et al. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318:283-287.
- Crailsheim, K., R. Brodschneider, P. Aupinel, D. Behrens, E. Genersch, J. Vollmann, and U. Riessberger-Gallé. 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. J. Apic. Res. 52(1):<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.05>
- De Miranda, J. R., L. Bailey, B. V. Ball, P. Blanchard, G. Budge, N. Chejanovsky, Y.-P. Chen, L. Gauthier, E. Genersch, D. 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. Apic. Res. 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/Ibra.1.52.4.22>
- Di Prisco, G., X. Zhang, F. Pennacchio, E. Caprio, J. Li, J. D. Evans, G. DeGrandi-Hoffman, M. Hamilton, and Y. P. Chen. 2011. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. Viruses 3:2425-2441.
- Graystock, P., I. Meeus, G. Smagghe, D. Goulson, and W. O. H. Hughes. 2015. The effects of single and mixed infections of *Apicystis bombi* and deformed wing virus in *Bombus terrestris*. Parasitology 143:358-365.
- Johnson, R. M., M. D. Ellis, C. A. Mullin, and M. Frazier. 2010. Pesticides and honey bee toxicity - USA. Apidologie 41:312-331.
- Möckel, N., S. Gisder, and E. Genersch. 2011. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bee (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. J. Gen. Virol. 92:370-377.
- Rosenkranz, P., P. Aumeier, and B. Ziegelmann. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103:S96-S119.
- Ryabov, E. V., J. M. Fannon, J. D. Moore, G. R. Wood, and D. J. Evans. 2016. The iflaviruses sacbrood virus and deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission. PeerJ 4:e1591.
- Škubník, K., J. Nováček, T. Füzik, A. Přidal, R. J. Paxton, and P. Plevka. 2017. Structure of deformed wing virus, a major honey bee pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. 114:3210-3215.

- Stokstad, E. 2007. The case of empty hives. *Science* 316:970-972.
- Underwood, R. M., and D. VanEngelsdorp. 2007. Colony Collapse Disorder : Have We Seen This Before ? *Bee Cult.* 35:13-18.
- vanEngelsdorp, D., J. Hayes, R. M. Underwood, and J. Pettis. 2008. A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE* 3(12):e4071.
- vanEngelsdorp, D., J. D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B. K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D. R. Tarpy, and J. S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One.* 4:e6481.

## 六、附錄

### 附錄一、Illumina MiSeq 上機實驗流程



# 台灣東方蜂中囊病之流行率調查

柯仲宇<sup>a</sup>、陳裕文<sup>a\*</sup>、乃育昕<sup>a</sup>、徐培修<sup>b</sup>、蔡文錫<sup>c</sup>、宋一鑫<sup>c</sup>

<sup>a</sup> 國立宜蘭大學 生物技術與動物科學系

<sup>b</sup> 行政院農業委員會苗栗區農業改良場

<sup>c</sup> 國立嘉義大學 植物醫學系

\*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1號

## 摘要

根據目前研究發現，自 2015 年以來，台灣的東方蜂 (*Apis cerana*) 已經引入了中蜂囊狀病毒 (*Apis cerana* Sacbrood, AcSBV) 分離株，導致嚴重的囊狀病毒病。本研究中，在 2016 年的 9 月至 12 月期間，分別對 *A. cerana* 和部分 *Apis mellifera* 蜂群進行了病徵調查和 AcSBV 病的分子鑑定。系統發育分析顯示，台灣大多數的 AcSBV 與中國的 SBV-FZ 和 SBV-JL 較為接近，而其中一個樣本 (N15-5-1) 被分為不同的族群，較為接近來自中國的 SBV-LN (95.8%)。AcSBV 流行率調查結果顯示，AcSBV 疫情除了花蓮和屏東縣外均有爆發。AcSBV 在 *A. cerana* 中的平均流行率為 61.1%。另於地區性調查中顯示，台灣北部 (91.3%) 和台灣中部 (57.9%)，台灣南部 (47.6%) 和東台灣 (22.2%) 之間發現了最高的 AcSBV 流行率。值得注意的是，AcSBV 流行率在 4 個月內從 47.1% 升至 69.6%。此外，根據這些數據，在 *A. mellifera* 中的 AcSBV 流行率平均為 37.5%，也被鑑定為台灣的組別。在 2017 年北部的調查中顯示，AcSBV 有稍微提昇的趨勢，於 *A. cerana* 中的感染率平均為 65.33%，*A. mellifera* 中平均為 45.28%，並且飼養群數大量的下降，北部區域由 2016 年尚有 8 場飼養近 50 群至 2017 年時全部少於 10 群。我們推測，*A. mellifera* 可能成為 AcSBV 感染的儲層。此外，AcSBV 也可能通過其他寄生蟲在 *A. cerana* 的垂直和水平通路中傳播和傳播。此些結果將提供有關流行病學及往後深入研究的資訊。

**關鍵詞：**東方蜂囊狀幼蟲病、東方蜂、西洋蜂

## 前言

蜜蜂是為野生植物和農作物授粉服務的重要授粉者 (Klein 等, 2007)。東方蜂 (*Apis cerana*) 是亞洲國家常見的蜜蜂種類, 其分佈範圍由東至東南亞均有 (Oldroyd 和 Wongsiri, 2006)。另一種常見的蜜蜂種類, 西方蜂 (*Apis mellifera*), 被亞洲國家引進以有許久的歷史 (Crane, 1999)。 *A. cerana* 和 *A. mellifera* 在蜂產品的商業利用和生態系統中作為重要傳粉者的相關作用有很大的貢獻 (Crane, 1999; Oldroyd 和 Wongsiri, 2006)。

最近, 全球授粉昆蟲受到許多的壓力導致下降或損失已受到人們極大的關注 (Vanbergen et al., 2013)。在這些壓力之中, 已知病毒性病原體會導致嚴重的蜂群損失 (Manley 等, 2015)。由於病毒的分佈很廣泛, *A. cerana* 和 *A. mellifera* 兩個物種均有被檢測到混合感染 (Chen et al., 2004)。

病毒性疾病值得注意的是, 若是由囊狀病毒 (Sacbrood, SBV) (單鏈, 正股 RNA 病毒, Iflaviridae: Iflavirus) 感染所引起的 (King 等, 2012), 會導致大量的蜂群和蜂蜜收穫損失 (Rana et al., 1986; Verma et al., 1990; Kim et al., 2008)。SBV 可以通過死亡變形的幼蟲症狀來鑑定, 其具有充滿液體的囊, 有時具有酸性。有許多研究表明, *A. cerana* 蜂群對 SBV 具有高度的敏感性 (Bailey 1969; Yan et al., 2009; Gong et al., 2016), 其中它引起了 *A. cerana* 蜂群中大量的幼蟲死亡, 中國, 印度, 韓國, 泰國和越南均有報導大量蜂群損失 (Rana et al., 1986; Verma et al., 1990; Kim et al., 2008; Ma et al., 2011; Nguyen and Le, 2013)。相比之下, 較少在 *A. mellifera* 蜂群中發現異常, 可見 SBV 在 *A. cerana* 和 *A. mellifera* 之間顯示出不同的毒力 (King 等, 2012)。

自 2016 年以來, 台灣的許多養蜂人發現, 他們的 *A. cerana* 蜂群以類似 SBV 感染的症狀而迅速損失及下降。先前的研究表明, 大陸的 SBV 分離株對台灣產生重大的影響 (Huang et al., 2017)。2016 年 9 月開始, 由台灣政府主導的 SBV 疾病大規模調查, 以分子鑑定初步結果表明, 目前全台灣疫情爆發。在本研究中, 我們調查了 *A. cerana* 以及少部分混何飼養 *A. mellifera* 中的 SBV (AcSBV) 流行率, 以提供台灣這種疾病的現狀。

## 材料與方法

### 田間記錄與採樣

2016 年 9 月至 2017 年 7 月間, 共對台灣 90 個受訪位置進行了調查, 其中包括 *A. cerana* 的 72 個蜂場和 *A. mellifera* 的 18 個蜂場, 其中包含有 18 個野生蜂群(表)。蜂巢中的巢片被取出以檢查是否有囊狀病毒的明顯症狀(正(+))

/陰性 ( - ) ) ; 此外, 隨機由蜂巢門口取樣 50 只成年工蜂, 並每 10 隻作為一個樣品, 而樣本樣品保存於 1mL RNA 保存溶液中, 並儲存在, 並保存在 -20°C 條件下直至使用。

### RNA 的萃取、反轉錄以及定序

使用 TRIzol 試劑 (Invitrogen, US) 從收集的樣品中提取總量 RNA。提取的 RNA 用 DNase I (Roche Molecular Biochemicals, CH) 處理。然後將總量 RNA 用隨機引子 oligo dt, 並用 SuperScript III (Invitrogen, US) 在 42°C 反轉錄 1 小時, 然後在 70°C 停止反應。對於 RT-PCR, AcSBV 引物 (VP1-F/VP1-R) (Ma 等, 2011) 和蜜蜂  $\beta$ -actin ( $\beta$ -actin-F/ $\beta$ -actin-R) (Chen 等, 2006) 作為內控制。如下在 Primus 96 Plus 熱循環機 (MWG-Biotech, DE) 上進行 PCR 擴增。熱循環機在 95°C 預熱 5 分鐘, 然後在 95°C 45 秒, 50°C 45 秒, 72°C 1 分鐘進行 35 個循環, 隨後在 72°C 最終延伸 10 分鐘並儲存在 20°C。通過在 1×TAE 緩衝液中的 2% 瓊脂糖凝膠上電泳分析 PCR 產物。對於病毒基因組 RNA 分子鑑定, 使用引子對 VP1-F/VP1-R 的 one step RT-PCR 試劑盒 (GeneMark, Taiwan) 擴增部分病毒 cDNA。然後將 RT-PCR 產物進行商業定序。通過 BLASTn 搜索 GenBank 對病毒 cDNA 序列進行比對。再從 NCBI-GenBank 檢索到 SBV cDNA 序列後, 通過使用 Clustal W 法 (DNASTAR) 的 MegAlign 軟件將新鑑定的病毒 cDNA 序列成對比較。分子進化遺傳學軟件版本 7.0 用於具有最大復合似然法和 1000 次重複的病毒 cDNA-A 的系統發育分析 (Kumar 等, 2016)。

### 結果與討論

由蜂群逐一的檢視中發現, 被 AcSBV 嚴重感染的蜂群有出現典型的癥狀。嚴重感染的蜂群會缺少清潔能力, 就可以看見許多死亡在巢房內的幼蟲 (圖 1A)。受感染的幼蟲會無法進入前蛹期, 即無法封蓋、或是死亡後封蓋被咬開 (圖 1C)。當幼蟲死亡後其體壁會變得堅韌, 且體內的臟器會開始腐爛而形成一個如水袋般的囊狀物 (圖 1B)。這些病徵都符合典型的囊狀病毒病的病徵。這種病毒主要是造成蜜蜂幼蟲的死亡 (Gong et al., 2016; Nguyen and Le, 2013)。

從 2016 年的觀測值中可以發現, 檢查了 48 個 *A. cerana* 蜂場, 其中除花蓮縣和屏東縣以外, 其餘行政區域中的 *A. cerana* 樣品有 61.1% 呈現陽性感染 (表一)。目前台灣的北部區域發現最高的 AcSBV 流行率 (91.3%), 其次是台灣中部 (57.9%) 和台灣南部 (47.6%)。台灣東部則具有最低的流行率 (22.2%)。根據觀察結果, 可以發現 AcSBV 在台灣的蜜蜂族群中被傳播並成為流行病; 例如, 在 N-13 和 N-15 的蜂場, 11 月份沒有明顯的 AcSBV 症狀的幼蟲, 但是在 12 月份檢查了 AcSBV 症狀; 另外在 S-37 號蜂場, AcSBV 在 9 月份時無法由 RT-PCR 檢測到病毒存在, 但進入 10 月份時即檢測到。此外, 依月



份來看(圖 2A), AcSBV 感染率從 9 月份(47.1%)上升至 12 月(69.6%); 顯然, 台灣的 AcSBV 呈現高程度的增長(圖 3B)。Chen 和 Siede (2007) 指出, SBV 的傳播是多樣的, 它可以水平, 垂直或混何兩者來感染蜜蜂。中國和韓國均有報告顯示, SBV 感染引起的大規模的蜂群損失(Zhang and Han, 2008; Kim et al., 2008)。根據目前的數據, 我們推測目前台灣疫情正在爆發。不幸的是, 到目前為止, 尚無良好的防治策略(Liu et al., 2010); 往後研究的重點應關注在如何阻止 AcSBV 傳播途徑來保護台灣原生的 *A. cerana*。

另外在 2017 年目前僅有台灣北部上半年的數據, 首先可以發現的是, 蜂群數量已大幅減少, 在原有的訪查者中, 已經沒有超過 10 箱的養殖戶(表二)。而蜂群受到 AcSBV 感染的程度率則由 1 月份的 66.7% 稍微的下降至 7 月份的 63%, 有稍微下降的趨勢(圖 2B)。其中 5 月份時, 高達 100%, 的感染率是因為樣本採集的問題, 主要是因為今年的東方蜂樣本難以取得, 當時僅找到 3 組人為飼養東方蜂之樣本。在東方蜂的飼養上, 夏季本來就屬於東方蜂族群的消滅期, 無論在野外或是人工飼養上, 常常都有族群消退的現象。樣本之調查尚需有全年且數量足夠的樣本, 所以本篇文章中在 2017 年的樣本僅做為一個趨勢值, 還得依靠下半年度的數據作分析。

## 參考文獻

- Bailey, L., 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann Appl Biol* 63, 483-491.
- Brutscher, L. M., McMenamin, A. J., Flenniken, M. L. 2016. The buzz about honey bee viruses. *PLoS Pathog* 12(8), e1005757.
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H.T., Evans, J., Feldlaufer, M. 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol.* 87, 84-93.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., Feldlaufer, M. F. 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol.* 72, 606-11.
- Chen, Y. P., and Siede, R., 2007. Honey Bee Viruses. *Adv Vir Res.* 70, 33-80.
- Council of Agriculture, Executive Yuan (COA), 2015. Annual Report on Agricultural Statistics. available from <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>
- Crane, E., 1999. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. Gerald Duckworth & Co. Ltd, London.
- Gong, H. R., Chen, X. X., Chen, Y. P., Hu, F. L., Zhang, J. L., Lin, Z. G., Yu, J. W., Zheng, H. Q. 2016. Evidence of *Apis cerana* Sacbrood virus Infection in *Apis mellifera*. *Appl Environ Microbiol.* 82, 2256-2262.

- Huang, W. F., Mehmood, S., Huang, S., Chen, Y. W., Ko, C. Y., Su, S. 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.
- Kim, H. K., Choi, Y. S., Lee, M. L., Lee, M. Y. 2008. Detection of sacbrood virus (SBV) from the honeybee in Korea. *Korean J Apic* 23, 103-109.
- King, A. M.Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (ed). 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, Philadelphia, PA.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* 274: 303-313.
- Li, Z. G., Huang, S. K., Huang W. F., Geng, H.Y., Zhao, Y. Z., Li, M., Chen Y. P., Su, S. K., 2016. A scientific note on detection of honeybee viruses in the darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*, Coleoptera: Tenebrionidae), a new pest in *Apis cerana cerana* colonies. *Apidologie*, 47(6), 759-761.
- Liu, X., Zhang, Y., Yan, X., Han, R. 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Curr Microbiol.* 61, 422-428.
- Ma, M., Ma, C., Li, M., Wang, S., Yang, S., Wang, S. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. *J Virol Methods.* 176, 115-119.
- Manley, R., Boots, M., Wilfert, L., 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *J Appl Ecol* 52, 331-340.
- Nguyen, N. T., Le, T. H., 2013. Complete Genome Sequence of Sacbrood Virus Strain SBM2, Isolated from the Honeybee *Apis cerana* in Vietnam. *Genome Announc.* 1(1), e00076-12.
- Oldroyd, B. P., Wongsiri, S., 2006. *Asian Honey Bees. Biology, Conservation and Human Interactions.* Harvard University Press, Cambridge, Ma., p. 340.
- QGIS Development Team. 2009. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. URL <http://qgis.osgeo.org>.
- Rana, B. S., Garg, I. D., Khurana, S. M. P., Verma, L. R., Aggarwal, H. O. 1986. Sacbrood virus of honeybees (*Apis cerana indica* F) in north-west Himalayas. *Indian J Virol.* 2, 127-131.
- Vanbergen, A. J., The Insect Pollinator Initiative, 2013. Threats to an ecosystem service:

- pressures on pollinators. *Front Ecol Environ* doi:10.1890/120126.
- Verma, L. R., Rana, B. S., Verma, S., 1990. Observations on *Apis cerana* colonies surviving from Thai Sacbrood Virus infestation. *Apidologie*. 21, 169-174.
- Yan, X., Chen, J. H., Han, R. C. 2009. Detection of Chinese Sacbrood Virus (CSBV) in *Apis cerana* by RT-PCR Method. *Sociobiology* 53(3), 687-694.
- Zhang, G., Han, R., 2008. Advances on sacbrood of honeybees. *China J Biol Control* 24, 130-137.

**Table 1.** Sampling sites of *Apis cerana* apiaries and their results of visual symptom checks and molecular identifications in 2016.

Area-apiary index*	Apiary scale (beehives)	City/County	Village/Township/District	No. of sample for AcSBV detection	Collection month	Symptom <sup>‡</sup>	AcSBV detection result <sup>¶</sup>
E-1	<10	Hualien County	Ji'an Township	1	November	Un	-
E-1			Ji'an Township	1	December	Un	-
E-2	<10	Ilan County	Dongsha Township	1	November	-	+
E-3	<10		Dongsha Township	1	November	Un	+
E-4	<10		Ilan University	1	October	Un	-
E-5	<10		Sanxing Township	1	December	Un	-
E-6	<10		Taipingshan	1	November	Un	-
E-7	<10		Wujie Township	1	December	Un	-
E-8	<10		Zhuangwei Township	1	December	Un	-
N-9	<50	Keelung City	Qidu Dist.	2	October	+	+
N-10	<50		Qidu Dist.	2	October	+	+
N-11	<50		Qidu Dist.	1	November	+	+
N-11			Qidu Dist.	1	December	+	+
N-12	<10	Taipei City	Shilin Dist.	1	October	+	+
N-13	<10		Wenshan Dist.	1	November	-	+
N-13			Wenshan Dist.	1	December	+	+
N-14	<50	New Taipei City	Pinglin Dist.	1	November	-	+

N-14			Pinglin Dist.	1	December	-	+
N-15	<50		Shuangsi Dist.	1	November	-	+
N-15			Shuangsi Dist.	1	December	+	+
N-16	<50		Shuangsi Dist.	2	December	+	+
N-17	<50		Shuangsi Dist.	1	December	+	+
N-18	<10		Xindian Dist.	1	October	-	+
N-19	<10		Xindian Dist.	1	November	Un	+
N-20	<10		Xizhi Dist.	1	December	+	+
N-21	<10	Taoyuan City	Bade Dist.	1	September	-	-
N-21			Bade Dist.	1	September	-	+
N-22	<10		Xinwu Dist.	1	September	Un	-
N-23	<50	Hsinchu County	Guanxi Township	1	September	+	+
C-24	<10	Miaoli County	Tongxiao Township	1	December	-	+
C-25	<50		Zhuolan Township	4	December	+	+
C-26	<10		Zhuolan Township	1	December	Un	+
C-27	<10	Taichung City	Dadu Dist.	1	December	-	+
C-28	<10		Dadu Dist.	1	December	+	+
C-29	<10		South Dist.	1	November	Un	+
C-30	<10		Fengyuan Dist.	1	November	-	-
C-31	<10		Taiping Dist.	4	September	-	-
C-32	<10	Nantou County	Puli Township	2	October	-	+
C-33	<10		Puli Township	3	December	Un	-

S-34	<10	Chiayi County	Dalin Township	1	September	+	+
S-34			Dalin Township	1	September	Un	+
S-35	<10		Shuesheliao	2	October	Un	-
S-36	<10		Zhuqi Township	1	September	Un	-
S-37	<10	Chiayi City	Chiayi University	1	September	Un	-
S-37			Chiayi University	1	October	Un	+
S-38	<10	Tainan City	Anding Dist.	2	November	-	-
S-39	<10		Baihe Dist.	1	September	Un	+
S-40	<10		Houbi Dist.	1	September	Un	+
S-41	<10		Rende Dist.	1	September	+	+
S-42	<10		Shanhua Dist.	1	September	+	+
S-43	<10		Xinhua Dist.	1	October	-	-
S-44	<50		Yujin Dist.	2	October	Un	+
S-45	<10	Kaohsiung City	Gangshan Dist.	1	October	-	-
S-45			Gangshan Dist.	1	October	-	+
S-46	<10		Liugui Dist.	1	October	Un	-
S-47	<10		Qishan Dist.	1	October	-	-
S-48	<10	Pingtung County	Wanluan Township	1	September	-	-

\* Area symbols: C, Central; E, eastern; N, Northern; S, Southern.

‡ Larvae conditions were checked; “Un” = Unknown; “+” = Larvae with AcSBV symptoms; “-“ = No obvious symptom.

¶ AcSBV detection was performed by RT-PCR; “+” = sample with AcSBV infection; “-“ = N. D.

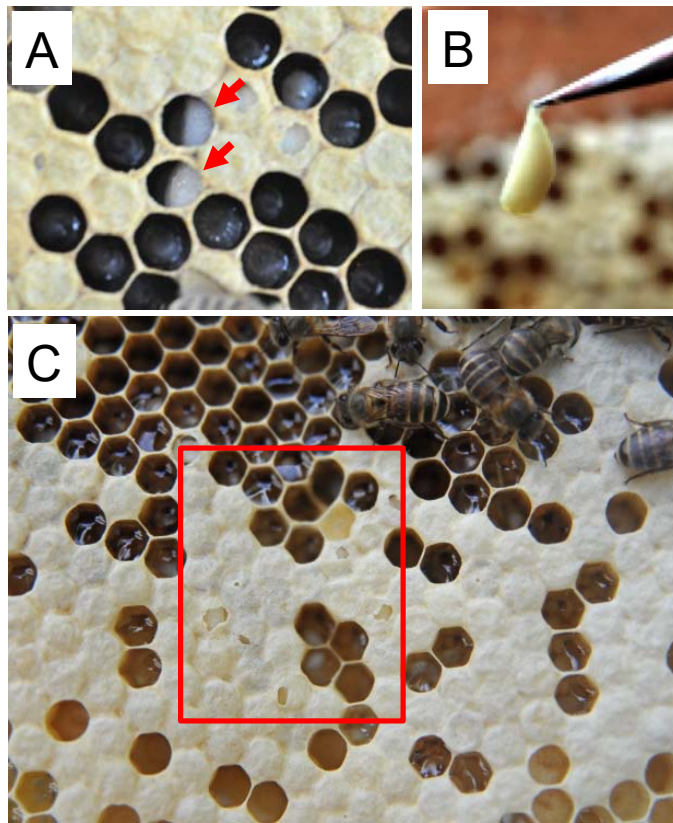
**Table 2.** Sampling sites of *Apis cerana* apiaries and their results of visual symptom checks and molecular identifications in 2017.

Area-apiary index <sup>a</sup>	Apiary scale (beehives)	City/County	Village/Township/District	Collection month	No. of sample for AcSBV detection	Symptom <sup>b</sup>	AcSBV detection result <sup>c</sup>	species
E-1	---	花蓮	玉里	1	2	UN	+	<i>A. cerana</i>
E-2	---	花蓮	玉里	1	2	UN	+	<i>A. cerana</i>
E-3	<10	宜蘭	大進	3	4	-	-	<i>A. cerana</i>
E-4	---	宜蘭	福山植物園	3	2	UN	+	<i>A. cerana</i>
E-5	<10	宜蘭	大進	4	2	-	-	<i>A. cerana</i>
E-6	---	宜蘭	三星	4	2	UN	-	<i>A. cerana</i>
E-7	<10	宜蘭	大進	6	3	-	-	<i>A. cerana</i>
E-8	---	宜蘭	五結	6	3	UN	-	<i>A. cerana</i>
E-9	---	宜蘭	太平山	6	2	UN	+	<i>A. cerana</i>
E-10	---	花蓮	吉安	7	1	UN	+	<i>A. cerana</i>
N-1	<10	基隆	七堵	1	3	+	+	<i>A. cerana</i>
N-2	---	台北	陽明山	2	2	UN	+	<i>A. cerana</i>
N-3	<10	新竹	關西	4	3	+	+	<i>A. cerana</i>
N-4	<10	新北	石碇	4	3	+	+	<i>A. cerana</i>
N-5	<10	基隆	七堵	4	2	+	+	<i>A. cerana</i>
N-6	<10	基隆	七堵	5	2	+	+	<i>A. cerana</i>

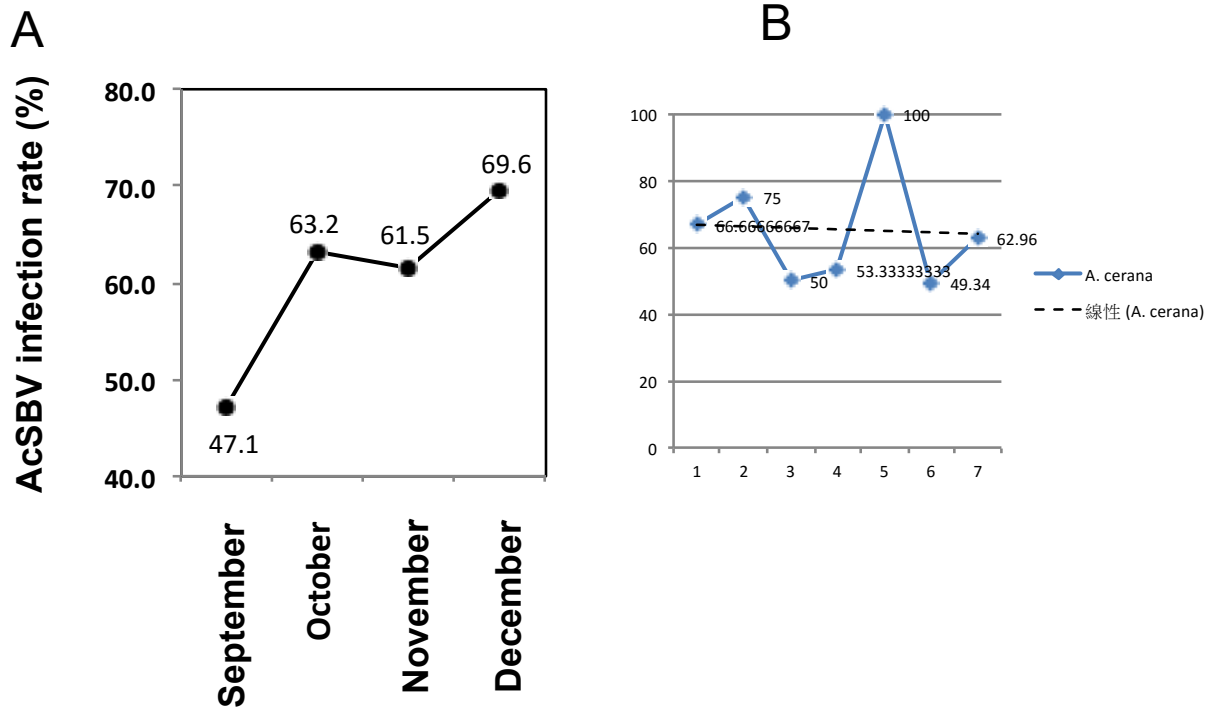
N-7	<10	新北	坪林	6	8	+	+	<i>A. cerana</i>
N-8	<10	新北	石碇	6	7	+	+	<i>A. cerana</i>
N-9	<50	新北	貓空	6	8	+	+	<i>A. cerana</i>
N-10	<10	基隆	七堵	6	5	+	+	<i>A. cerana</i>
N-11	<10	基隆	七堵	6	4	+	+	<i>A. cerana</i>
N-12	<10	基隆	七堵	7	3	-	-	<i>A. cerana</i>
N-13	<10	新北	貓空	7	9	+	+	<i>A. cerana</i>

---





**Figure 1.** Sign and symptoms of diseased-infected larvae in *A. cerana* colonies. (A) larvae with serious infections showed upright along the cell walls (red arrows); (B) Infected larva showed watery and cased by the tough skin and formed fluid-filled sacs; (C) Sign of initial infection showed punctured capping.



**Figure 2.** Investigation of AcSBV prevalence rates during experimental period in Taiwan. (A) temporal survey of AcSBV prevalence rates in Taiwan in 2016.(B) temporal survey of AcSBV prevalence rates in Taiwan in 2017.

# 蜂毒抗菌胜肽對多重抗藥性菌株之抑菌作用 與應用潛能

林峻賢、杜武俊\*

國立中興大學昆蟲學系

\*通訊作者：杜武俊

電子郵件：tuujiun@gmail.com

通訊地址：台中市南區興大路 145 號

## 摘要

近年來，由於人類在醫療及動物疫病防治上過度使用抗生素，致使病原菌產生抗藥性的情況日趨嚴重，進而導致多重抗藥性病原菌之發生，在台灣常見之院內感染抗藥性細菌以金黃色葡萄球菌、鮑氏不動桿菌、大腸桿菌、綠膿桿菌、克雷白氏肺炎菌等為主，而上述病原菌在醫療上幾乎面臨無藥可用之窘境。因此，為了延緩抗藥性發生之問題，除了審慎使用現有抗生素之外，開發新型抗菌藥劑或是發展抗菌藥劑合併療法都是解決抗藥性問題的方法之一。蜂毒抗菌胜肽(Mastoparan, MP)為 14 個胺基酸組成之陽電性小分子胜肽，對革蘭氏陽性菌與陰性菌皆具抗菌效能，本研究分別以田間分離之大腸桿菌以及臨床分離之鮑氏不動桿菌為試驗菌株，探討黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌胜肽(Mastoparan-AF, MP-AF)對多重抗藥性病原菌之抑菌效能，同時探究與臨床常用抗生素合併使用後對多重抗藥性病原菌是否具協同抗菌效能，以評估其在抗菌醫療之應用潛力。與臨床常用抗生素相較之下，蜂毒抗菌胜肽對於多重抗藥性大腸桿菌與多重抗藥性鮑氏不動桿菌皆能發揮良好抗菌效能，其最低抑菌濃度分別介於 4-256  $\mu\text{g/ml}$  與 2-16  $\mu\text{g/ml}$ 。而在抗菌藥劑合併使用試驗結果亦顯示蜂毒抗菌胜肽與特定抗生素合併使用，對於某些多重抗藥性分離株可以發揮協同抗菌效能。顯示蜂毒抗菌胜肽單獨使用或與特定抗生素合併使用在抗菌醫療上具研發潛力，或許可以成為對抗多重抗藥性病原菌之替代方案。

**關鍵詞：**蜂毒抗菌胜肽、多重抗藥性菌株、抑菌作用

(本文數據已發表於 Peptides, Saudi Journal of Biological Sciences)

抗生素的問世無疑是 20 世紀醫學史上的重要發現。然而，抗生素除了應用於人類醫療，更廣泛使用於畜牧業、水產養殖與農業。大量使用抗生素致使病原菌衍生出抗藥性的情況日趨嚴重，而多重抗藥性病原菌的出現已成為全球性問題，在醫療端幾乎面臨無藥可用之窘境，因而亟待開發新型態之抗菌藥劑或是發展有效之替代方案。而從昆蟲分離出抗菌胜肽或是將其與不同作用機制之抗菌藥劑合併使用不啻為解決多重抗藥性病原菌難題的解決方法之一。虎頭蜂蜂毒為虎頭蜂用以抵禦外來入侵者之主要武器，富含許多具有生物活性之分子。蜂毒抗菌胜肽 (Mastoparan, MP) 為蜂毒內含量最高之小分子胜肽 (Nakajima, 1984; Palma, 2006)，最早於 1979 年自黃胡蜂 (*Vespula lewisii*) 蜂毒中分離出來 (Hirai et al., 1979)，爾後陸續自其他種類胡蜂毒液中分離出蜂毒抗菌胜肽類似分子。蜂毒抗菌胜肽由 14 個胺基酸組成，組成胺基酸包含 2 至 4 個陽電性 lysine 及 7 至 10 個疏水性胺基酸，且在 C 端胺基酸醯胺化 (amidation) 修飾 (Nakajima, 1984)，於適當環境下會形成兼具親水性 (hydrophilic) 與疏水性 (hydrophobic) 之雙極性  $\alpha$  螺旋構型 (amphipathic  $\alpha$ -helical conformation) (Lin et al., 2011)，陽電性 lysine 會分布於  $\alpha$  螺旋構型親水性側，此一結構特性使得蜂毒抗菌胜肽具有抗菌活性，可以靜電作用力與帶陰電性的病原菌細胞膜作用，接續再藉由疏水性作用力使其鑲嵌於細胞膜內，形成穿孔，造成物理性損傷，進而改變其通透性及滲透壓，致使細胞內容物外漏，最終致使標的病原菌死亡 (Zaslloff, 2002; Brogden, 2005)。由於蜂毒抗菌胜肽是利用物理性作用與病原菌細胞膜結合，不需要特定受體，因此病原菌不易透過基因突變產生抗藥性。此外，先前研究顯示蜂毒抗菌胜肽除了對革蘭氏陽性菌和陰性菌皆能發揮廣效性抗菌效能，更能在短時間內有效抑制或殺滅病原菌 (Lin et al., 2011, 2012)。因此本試驗探討黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌胜肽對多重抗藥性病原菌之抗菌效能，以及其與臨床常用抗生素合併使用後對多重抗藥性病原菌是否可發揮協同抗菌效能，以評估蜂毒抗菌胜肽在抗菌醫療之應用潛力，期望藉以找到解決多重抗藥性病原菌面臨無藥可用之替代方案，並為昆蟲生物資源開發創新領域。

### 黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌胜肽 MP-AF 與臨床上常用抗生素對多重抗藥性大腸桿菌臨床分離株抗菌效能之探討

MP-AF 與六種臨床上常用抗生素對多重抗藥性大腸桿菌之最低抑菌濃度如表一所示。MP-AF 濃度於 4-32  $\mu\text{g/ml}$  對於 21 株大腸桿菌中有 15 株具抑菌效能，有 3 株菌於濃度 64  $\mu\text{g/ml}$  才能抑菌效能，而其餘 3 株菌則於濃度 192-256  $\mu\text{g/ml}$  下方能抑制其生長。Ampicillin 濃度於 1-16  $\mu\text{g/ml}$  僅對於 9 株具抑菌效能，而其餘 12 株於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  時，仍然無法抑制其生長。Cephalothin 濃度於 8-128  $\mu\text{g/ml}$  對 14 株具抑菌效能，而其餘 7 株於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  時，仍然無法抑制其生長。Chloramphenicol 濃度於 2-128  $\mu\text{g/ml}$  對 17 株具抗菌效能，有 1 株於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  方能抑制其生長，而有 3 株於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  時，仍然無法抑制其生長。

Gentamicin 濃度於 2-16 µg/ml 對 16 株具抗菌效能，有 2 株於濃度 256 µg/ml 方能抑制其生長，此外，尚有 3 株濃度於 256 µg/ml 時，仍然無法抑制其生長。Neomycin 濃度於 8-32 µg/ml 對 12 株具抗菌效能，而有 9 株於濃度 256 µg/ml 時，仍然無法抑制其生長。Tetracycline 濃度於 0.5-192 µg/ml 對 14 株受試菌株具抗菌效能，有 2 株於濃度 256 µg/ml 方能抑制其生長，而有 5 株於濃度 256 µg/ml 時，仍然無法抑制其生長。

### **黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌肽 MP-AF 與不同作用機制之抗生素合併使用對多重抗藥性大腸桿菌臨床分離株協同抑菌效能之探討**

本試驗選取四株具抗藥性之大腸桿菌等臨床分離株 PFL6、PFH1、PFH12、PFH13 與標準株 ATCC 25922 進行試驗，以不同濃度之 MP-AF 分別與六種抗生素合併使用，試驗結果如表二所示。對於標準株 ATCC 25922，MP-AF 分別與 Cephalothin、Chloramphenicol、Gentamicin 及 Neomycin 合併使用，其 FIC 指數分別為 0.313、0.313、0.313 及 0.375，顯示合併使用後具協同抑菌效能，而與 Ampicillin 及 Tetracycline 合併使用，其 FIC 指數皆為 0.563，顯示合併使用雖然不具協同抑菌效能，但抗菌藥劑使用劑量降低；對於分離株 PFL6，MP-AF 分別與 Cephalothin 及 Gentamicin 合併使用，其 FIC 指數分別為 0.375 及 0.281，顯示合併使用後具協同抑菌效能，而與 Ampicillin、Chloramphenicol、Neomycin 及 Tetracycline 合併使用，其 FIC 指數分別為 1.031、0.75、0.563 及 0.75，亦顯示合併使用不具協同抑菌作用，但使用劑量降低；對於分離株 PFH1，MP-AF 分別與 Ampicillin、Cephalothin、Chloramphenicol、Gentamicin、Neomycin 及 Tetracycline 合併使用，其 FIC 指數分別為 1.001、0.563、0.563、0.563、2.002、0.563，顯示合併使用皆不具協同抑菌作用，其中，僅 MP-AF 與 Neomycin 合併使用之使用劑量並未降低，其餘使用劑量皆降低；對於分離株 PFH12，MP-AF 分別與 Ampicillin、Cephalothin、Chloramphenicol、Gentamicin、Neomycin 及 Tetracycline 合併使用，其 FIC 指數分別為 1.002、1.002、1.004、2.002、2.002、0.625，顯示合併使用皆不具協同抑菌作用，而 MP-AF 與 Gentamicin、Neomycin 合併使用之使用劑量並未降低，其餘使用劑量皆降低；對於分離株 PFH13，MP-AF 分別與 Cephalothin 與 Gentamicin 合併使用，其 FIC 指數分別為 0.313 及 0.396，顯示合併使用具協同抑菌作用，而與 Ampicillin、Chloramphenicol、Neomycin 及 Tetracycline 合併使用，其 FIC 指數分別為 1.002、0.563、2.002 及 0.75，顯示合併使用皆不具協同抑菌作用，而 MP-AF 與 Neomycin 合併使用之使用劑量並未降低，其餘使用劑量皆降低。

### **黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌肽 MP-AF 與臨床上常用抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株抗菌效能之探討**

MP-AF 與九種臨床上常用抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之最低抑菌濃度如表三所示。MP-AF 於濃度 4-16  $\mu\text{g/ml}$  對於 7 株臨床分離株皆可發揮良好抗菌效能。Ampicillin、Cephalothin、Gentamicin 於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  時，仍然無法抑制其生長。Ciprofloxacin 於濃度 64  $\mu\text{g/ml}$  時僅對 E0407 具抑菌效能，而其餘 6 株則於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  仍無法抑制其生長。Neomycin 於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  時，對 E0469 與 E0948 具抑菌效能，其餘 5 株則仍無法抑制其生長。SXT 於濃度 64  $\mu\text{g/ml}$ 、256  $\mu\text{g/ml}$  分別可抑制 E0682 與 E0407 之生長，其餘 5 株則於 256  $\mu\text{g/ml}$  仍無法抑制其生長。Tetracycline 於濃度 128  $\mu\text{g/ml}$  可抑制 E0407、E0469、E0948 之生長，於濃度 256  $\mu\text{g/ml}$  則可抑制 E0528、E0682 之生長，而仍無法抑制 E0158 與 E1359 之生長。Colistin 於濃度 1-4  $\mu\text{g/ml}$  對於 7 株分離株即能發揮良好抑菌效能。Tigecycline 為受試 9 種抗生素中，抑菌效能最佳者，於濃度 0.0625-0.5 即能有效抑制 7 株分離株之生長。對於標準株 ATCC 15151，MP-AF 與 9 種抗生素皆於低濃度即可有效抑制其生長。而由試驗結果顯示，多數一線抗生素於濃度高達 256  $\mu\text{g/ml}$  仍無法有效抑制多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之生長，而 MP-AF 於濃度 4-16  $\mu\text{g/ml}$  對於臨床分離株即可發揮良好抑菌效能，顯示 MP-AF 在對抗多重抗藥性鮑氏不動桿菌之感染具有開發潛力。

#### **黃腰虎頭蜂蜂毒抗菌胜肽 MP-AF 與不同作用機制之抗生素合併使用對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株協同抑菌效能之探討**

以不同濃度之 MP-AF 分別與 8 種抗生素合併使用，其抑菌效能如表四所示。當 MP-AF 分別與 Ampicillin、Cephalothin、Gentamicin、Neomycin 合併使用時，對所有受試分離株之抗菌效能顯示沒有差異。與 Ciprofloxacin 合併使用時，對於 E0528 與 E0948 可發揮協同抑菌效能，對其餘分離株則沒有差異。與 Colistin 合併使用時，對於 E0158、E0407、E0469、E0528、E0948 與 E1359 皆能發揮協同抑菌效能，僅對 E0682 顯示沒有差別。MP-AF 與 SXT 合併使用時抑菌效能最佳，對於 E0158、E0407、E0469、E0528、E0948 與 E1359 皆能發揮協同抑菌效能，對 E0682 亦可發揮部分協同抑菌效能。與 Tetracycline 合併使用，僅對 E0407 具部分協同抑菌效能，對於其餘分離株則沒有差別。

上述試驗結果顯示，蜂毒抗菌胜肽單獨使用或是與特定抗生素合併使用皆可對多重抗藥性大腸桿菌或是多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株發揮抗菌效能。值得注意的是，與蜂毒抗菌胜肽合併使用具協同抗菌效能者，表示其使用濃度至少分別降為其最低抑菌濃度的四分之一以上，可有效降低抗生素之使用劑量，延緩抗藥性之發生，同時降低抗生素之副作用，進而提高抗菌藥劑合併使用之安全性。然而，多重抗藥性病原菌所攜帶之抗藥性基因將影響合併療法抗生素之選擇，故若能進一步發展病原菌抗藥性基因即時診斷方法，未來在治療病原菌感染上不

僅可以提供更精確之診斷依據，更有助於最適抗菌藥劑合併療法之選擇，將使得蜂毒抗菌胜肽在抗菌醫療更具發展潛力。

## 參考文獻

- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* 3: 238-250.
- Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M, Kitada C. 1979. A new mast cell degranulating peptide "Mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem Pharm Bull* 27: 1942-1944.
- Lin, C.H., Tzen, J.T.C., Shyu, C.L., Yang, M.J., Tu, W.C., 2011. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. *Peptides* 32, 2027–2036.
- Lin, C.H., Hou, R.F., Shyu, C.L., Shia, W.Y., Lin, C.F., Tu, W.C., 2012. *In vitro* activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals. *Peptides* 36, 114–120.
- Nakajima T. 1984. Biochemistry of vespid venoms. In: Tu AT, editor. *Handbook of Natural Toxins*, vol. 2. New York: Marcel Dekker. p 109-133.
- Palma MS. 2006. Insect venom peptides. In: Kastin AJ, editor. *Handbooks of Biologically Active Peptides*. Oxford: Academic Press. p 389-396.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

表一、蜂毒抗菌胜肽與臨床上常用抗生素對 21 株大腸桿菌之最低抑菌濃度

<i>E. coli</i> isolate/strain	Median MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	MP-AF	AMP	CF	CHL	GEN	NEO	TET
CLS4	192	>256	128	128	8	32	128
CLS10	4	>256	>256	6	8	32	2
CLS11	256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
CLS12	32	4	64	8	8	24	256
PFL1	4	8	64	16	8	16	4
PFL6	8	16	128	16	16	16	>256
PFL7	64	>256	32	>256	$\geq 256$	24	256
PFH1	4	>256	64	256	8	>256	>256
PFH2	12	>256	64	32	8	>256	128
PFH3	16	6	64	48	8	>256	1
PFH4	4	>256	>256	8	8	32	2
PFH7	4	4	32	16	8	>256	>256
PFH10	256	>256	>256	8	>256	>256	128
PFH11	4	4	32	8	8	32	192
PFH12	4	>256	>256	>256	$\geq 256$	>256	128
PFH13	4	>256	128	8	12	>256	>256
PFH14	64	>256	>256	64	>256	>256	128
PFH15	64	4	64	4	8	24	64
<i>E. coli</i> BL21	4	1	8	2	2	8	0.5
<i>E. coli</i> JM109Amp <sup>R</sup>	8	>256	>256	8	2	8	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16	8	64	16	8	32	2

Median MIC 為抗菌藥劑對大腸桿菌分離株最低抑菌濃度之中位數。中位數數值取決於三個獨立試驗，每一獨立試驗進行兩重複。縮寫：蜂毒抗菌胜肽 MP-AF, Mastoparan-AF; AMP, Ampicillin; CF, Cephalothin; CHL, Chloramphenicol; GEN, Gentamicin; NEO, Neomycin; TET, Tetracycline。



表二 蜂毒抗菌胜肽與六種臨床上常用抗生素合併使用對大腸桿菌分離株之 FIC 指數

Antibiotics	FIC index, Mastoparan-AF				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> PFL6	<i>E. coli</i> PFH1	<i>E. coli</i> PFH12	<i>E. coli</i> PFH13
Ampicillin	0.563	1.031	1.001	1.002	1.002
Cephalothin	<b>0.313</b>	<b>0.375</b>	0.563	1.002	<b>0.313</b>
Chloramphenicol	<b>0.313</b>	0.750	0.563	1.004	0.563
Gentamicin	<b>0.313</b>	<b>0.281</b>	0.563	2.002	<b>0.396</b>
Neomycin	<b>0.375</b>	0.563	2.002	2.002	2.002
Tetracycline	0.563	0.750	0.563	0.625	0.750

蜂毒抗菌胜肽 Mastoparan-AF 對標準株 ATCC 25922 之試驗濃度為 1 到 128  $\mu\text{g/ml}$ ，對其餘四株分離株之試驗濃度為 0.25 到 32  $\mu\text{g/ml}$ 。六種臨床上常用抗生素對五株大腸桿菌之試驗濃度皆為 0.5 到 256  $\mu\text{g/ml}$ 。FIC 指數定義如下所示： $\leq 0.5$  表示合併使用後具抗菌協力作用； $> 0.5$  to  $< 4.0$  表示合併使用後抑菌效能沒有差別； $\geq 4.0$  表示合併使用後具拮抗作用 (Odds, 2003)。

表三、蜂毒抗菌胜肽與臨床上常用抗生素對鮑氏不動桿菌分離株之最低抑菌濃度

<i>A. baumannii</i> isolates	Median MIC (µg/ml)									
	MP-AF	AMP	CF	CIP	CL	GM	NEO	SXT	TET	TGC
E0158	8	>256	>256	>256	4	>256	>256	>256	>256	0.5
E0407	8	>256	>256	64	1	>256	>256	256	128	0.25
E0469	4	>256	>256	>256	2	>256	256	>256	128	0.25
E0528	4	>256	>256	>256	2	>256	>256	>256	256	0.0625
E0682	4	>256	>256	>256	2	>256	>256	64	256	0.125
E0948	4	>256	>256	>256	1	>256	256	>256	128	0.125
E1359	16	>256	>256	>256	1	>256	>256	>256	>256	0.5
ATCC 15151	2	16	8	0.5	1	1	1	2	4	0.125

Median MIC 為抗菌藥劑對鮑氏不動桿菌分離株最低抑菌濃度之中位數。中位數數值取決於三個獨立試驗，每一獨立試驗進行兩重複。縮寫：蜂毒抗菌胜肽 MP-AF, Mastoparan-AF; AMP, ampicillin; CF, cephalothin; CIP, ciprofloxacin; CL, colistin; GM, gentamicin; NEO, neomycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TGC, tigecycline。

表四、蜂毒抗菌胜肽與臨床上常用抗生素合併使用對鮑氏不動桿菌分離株之 FIC 指數

Antibiotics	FIC index (Conc. MP-AF/Conc. antibiotic), MP-AF						
	E0158	E0407	E0469	E0528	E0682	E0948	E1359
Ampicillin	1.008(8/2)	1.004(8/0.5)	1.008(4/2)	1.002(4/0.5)	1.004(4/1)	1.002(4/0.5)	1.002(16/0.5)
Cephalothin	1.004(8/1)	1.008(8/2)	1.004(4/1)	1.004(4/1)	1.031(4/8)	1.004(4/1)	1.002(16/0.5)
Ciprofloxacin	1.125(8/32)	1.016(8/1)	1.002(4/0.5)	<b>0.375(0.5/64)</b>	1.016(4/4)	<b>0.375(0.5/64)</b>	1.002(16/0.5)
Colistin	<b>0.188(1/0.25)</b>	<b>0.313(0.5/0.25)</b>	<b>0.25(0.5/0.25)</b>	<b>0.25(0.5/0.25)</b>	2(4/2)	<b>0.375(1/0.125)</b>	<b>0.125(1/0.0625)</b>
Gentamicin	2.002(16/0.5)	2.002(16/0.5)	2.004(8/1)	2.002(8/0.5)	1.002(4/0.5)	2.002(8/0.5)	2.002(32/0.5)
Neomycin	2.002(16/0.5)	2.002(16/0.5)	2.002(8/0.5)	2.004(8/1)	2.002(8/0.5)	2.002(8/0.5)	1.004(16/1)
SXT	<b>0.5(2/64)</b>	<b>0.5(2/64)</b>	<b>0.25(0.5/32)</b>	<b>0.25(0.5/32)</b>	0.625(0.5/32)	<b>0.375(0.5/64)</b>	<b>0.5(4/64)</b>
Tetracycline	1.008 (8/2)	0.531 (4/4)	1 (2/64)	1 (2/128)	1 (2/128)	1.004 (4/0.5)	1 (8/128)

縮寫：蜂毒抗菌胜肽 MP-AF, mastoparan-AF; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole。

蜂毒抗菌胜肽 MP-AF 之試驗濃度為 0.5 到 64  $\mu\text{g/ml}$ ，colistin 之試驗濃度為 0.0625 到 32  $\mu\text{g/ml}$ ，其他七種抗生素之試驗濃度皆為 0.5 到 256  $\mu\text{g/ml}$ 。

FIC 指數定義如下所示：FIC  $\leq$  0.5 表示合併使用後具抗菌協力作用；0.5 < FIC < 1 表示合併使用後僅具部分抗菌協力作用；FIC = 1 表示合併使用後具抗菌加成作用；1 < FIC < 4 表示合併使用後抗菌效能沒有差別；FIC  $\geq$  4.0 表示合併使用後具拮抗作用 (Dawis et al., 2003)。

# 台灣西方蜂種原分析與展望

吳明城、呂庭萱、路光暉\*

國立中興大學昆蟲學系

\*通訊作者：路光暉

電子郵件：khlu@dragon.nchu.edu.tw

通訊地址：台中市南區興大路 145 號

## 摘要

由於台灣蜜源植物眾多，以致養蜂事業很興盛。西方蜂(*Apis mellifera*)最早於1911年引進台灣後，隨後陸續又有多種西方蜜蜂亞種引進，截至目前推測台灣西方蜂應屬於多種亞種的混合種。若要進行育種試驗，需要了解該物種種源，也因此我們首先採集台灣各地養蜂場(共33個)之西方蜜蜂樣本(280個)，利用PCR放大粒線體DNA之cytochrome b (Cyt b)、cytochrome oxidase subunit I (COI)、large subunit rRNA (Ls rRNA)和the non-coding region between tRNA<sup>leu</sup> and cytochrome c oxidase subunit II (the intergenic tRNA<sup>leu</sup>-COII region)基因片段，配合限制酶酵素進行蜜蜂種源品系分析。結果發現87%的樣本是屬於C品系，而13%的樣本是屬於Z品系。然而原本有引進紀錄的A與M品系則沒有被偵測到。經由此研究可以確切瞭解現在台灣蜜蜂以C品系為主流，雖說Z品系族群有逐漸擴大，但仍占少數。隨後，更進一步向其中十三個養蜂場購入蜂群進行性狀分析，發現益達胺感受性皆有差異性，半致死劑量最高可達72.5 ng/μL，最低則小於10 ng/μL；蟎害亦有所差異；清潔能力方面，所有蜂群皆能於17小時內清除死蛹，根據上述三種性狀觀察，很明顯可以看出不同基因背景(genetic background)對性狀的影響。上述品系分析與性狀分析研究成果將有助於加速蜜蜂育種計畫。

**關鍵字：**西方蜂、粒線體、益達胺

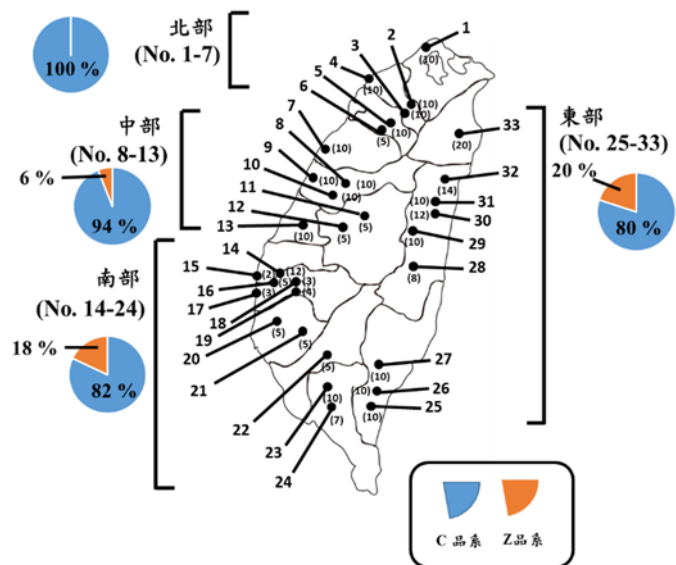
(本文數據部分已發表於 Saudi Journal of Biological Sciences)

## 前言

西方蜂(*Apis mellifera*)扮演重要的農業經濟角色，提供農作物授粉，亦生產蜂產品，如：蜂蜜、花粉、蜂王漿、蜂王子、雄蜂子、蜂膠、蜂毒和蜂蠟等，被廣泛使用於日常生活中，甚至醫療上。但近年來，蜜蜂消失的議題，如：蜂群崩解症候群(Colony Collapse Disorder, CCD)浮上檯面，引起了各界的關注。科學家除了探討蜜蜂消失的原因，亦開始想辦法保留蜜蜂種原，例如：美國農業部與美國華盛頓大學昆蟲系已著手針對美國境內與歐洲大陸的蜜蜂群，進行精子保存的工作，確保優勢種原之存在。

根據蜜蜂形態，全球已有 28 個西方蜜蜂亞種被辨認，它們可以更進一步藉由地理起源而歸納成四個品系，分別為：非洲品系(Africa, A)、西北歐品系(Western Europe, M)、東南歐品系(South-Eastern Europe, C)和中東品系(Middle East, O)。不過，親源地理關係的研究發現形態特徵會因環境適應而有所改變，進而產生誤判品系的結果，也因此多種以 DNA 為基礎鑑定的方法被發展，如：粒線體 DNA (mtDNA)、微衛星 DNA (microsatellites)和單核苷酸多態型(single nucleotide polymorphisms, SNPs)等。粒線體 DNA 是藉由母系遺傳，自 1990 年代開始，已被廣泛應用於鑑定西方蜜蜂種原，經過二十幾年的數據累積，可以區分出五個西方蜜蜂品系，其中粒線體品系 A、M 和 C，可以與根據形態區分的 A、M 和 C 品系大致吻合，但根據形態分類的 O 品系，經粒線體分析後，可以分成兩群，C 與 Z 品系。最後，第五個粒線體品系是 Y 品系，分布於衣索比亞。

台灣西方蜂根據文獻記載指出是在 1911 年被引入台灣飼養，隨後陸續引進多種亞種，如：亞美尼亞亞種、海角亞種、喀尼阿蘭亞種、高加索亞種、塞普勒斯亞種、義大利亞種及歐洲亞種等進行品種優化，不過 1997 年後，就無官方從國外引入蜂種了，推估引進的西方蜂，C 品系佔 76%，Z 品系佔 6%，M 品系佔 6%和 A 品系佔 6%。從 1997 年至今，將近二十年間閉鎖集團式進行選育，台灣現在的西方蜂種推測是各亞種間互相雜交後的混種，且有些蜂農更進一步自行篩選培育高採蜜或產漿種。鑒於國內尚無西方蜂種原分析資料，且形態上也很難區別品系，因此我們進行了台灣西方蜂種原粒線體分析，於 2015 年 9 月到



圖一、西方蜂之採集點與品系分佈比例。  
(摘自 Wu et al. (2017) Saudi J. Biol. Sci. 24: 1069-1074.)

2016 年 2 月期間，分別自台灣北(7 個養蜂場)、中(6 個蜂場)、南(11 個蜂場)和東(9 個蜂場)部，共 33 個養蜂場，採取 280 個蜂群樣本(圖一)。經分析發現 280 個樣本中，245 個樣本是屬於 C 品系，佔全部樣本數 87.5%，分佈於全台各地；35 個樣本是屬於 Z 品系，佔全部樣本數 12.5%，局部分佈於中部，大部分分佈於南部與東部蜂場，相較於引進的數量，是有擴張的趨勢(表一)。

表一、相關蜂場地理位置與西方蜂品系

		蜂場序號	蜂場地理位置	採集樣本數	品系	
					Z	C
西部	北部	1	新北三芝	10	0	10
		2	桃園大溪	10	0	10
		3	桃園平鎮	10	0	10
		4	桃園觀音	10	0	10
		5	新竹關西	10	0	10
		6	新竹關西	5	0	5
		7	苗栗通宵	10	0	10
	中部	8	台中太平	10	0	10
		9	台中外埔	10	0	10
		10	台中霧峰	10	0	10
		11	南投中寮	5	0	5
		12	南投南投市	5	3	2
		13	彰化二水	10	0	10
	南部	14	嘉義新港	12	4	8
		15	雲林口湖	2	0	2
		16	嘉義六腳	5	0	5
		17	嘉義鰲鼓	3	0	3
		18	嘉義鹿草	3	0	3
		19	嘉義鹿草	4	2	2
		20	台南新營	5	0	5
		21	台南楠西	5	0	5
		22	高雄燕巢	5	0	5
		23	屏東屏東市	10	0	10
		24	屏東萬丹	7	5	2
東部	25	台東鹿野	10	0	10	
	26	台東鹿野	10	0	10	
	27	台東池上	10	0	10	
	28	花蓮瑞穗	8	8	0	
	29	花蓮鳳林	10	0	10	
	30	花蓮壽豐	12	3	9	
	31	花蓮壽豐	10	10	0	
	32	花蓮新城	14	0	14	
	33	宜蘭五結	20	0	20	
	<b>總和</b>			<b>280</b>	<b>35</b>	<b>245</b>

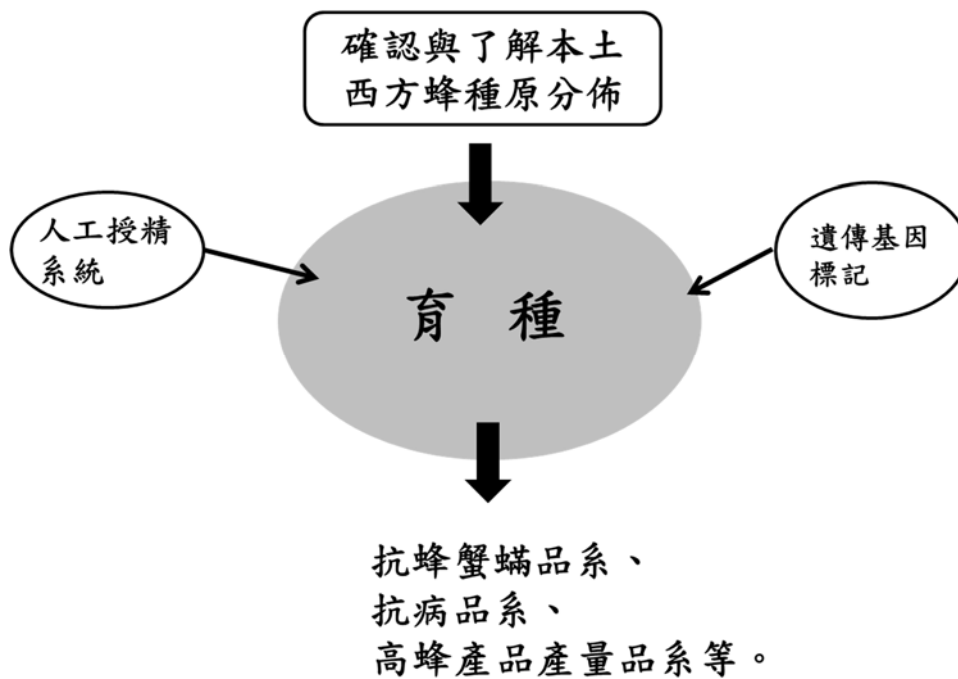
我們更進一步向其中十三個養蜂場購入蜂群進行性狀分析。關於益達胺半致死劑量(LD<sub>50</sub>)分析，發現僅有四個蜂群之LD<sub>50</sub>高於30 ng/μL (LD<sub>50</sub>分別為39.9、41.1、65.2及72.5 ng/μL)，其餘九個蜂群之LD<sub>50</sub>皆低於30 ng/μL (其中三個更低於10 ng/μL) (表二)。至於清潔能力，目前所有蜂群皆有能於一天內清除死蛹的清潔能力，尚未發現如國外研究所述「無清潔能力的蜂群」(超過24小時，才清理不到50%的死蛹)(表二)。

表二、十三群蜂群之性狀分析

蜂群	益達胺感受性 (LD <sub>50</sub> ng/μL)	清潔能力
1	>30	皆於17小時內 清除死蛹
2	<30	
3	<30	
4	<30	
5	>30	
6	<30	
7	>30	
8	<30	
9	<30	
10	<30	
11	<30	
12	<30	
13	>30	

## 展望

繼西方蜂種原品系確認後，且了解相關品系之分佈，我們研究團隊更深入了解品系間的差異，如：台灣西方蜂之C品系與Z品系，針對衛生清潔能力、產漿量、抗病力等性狀進行評估，企圖更深入尋找相關遺傳基因標記，加速未來選育品種之速度。遺傳基因標記在選育品種上扮演重要的工具，例如：高採蜜品種與一般西方蜂種基因組成一定有些微差異，這些差異即可當作所謂的遺傳標記，未來所培育之品種只需鑑定此基因存在與否，即可辨別該品種是否為高採蜜品種，而無須等採完蜜後，藉由蜜產量評估。蜜蜂與一般牲畜豬牛羊等相似，非常重視品種，好的品種較不易生病，經濟產量高，且可用人工授精培育所需之性狀品種，不過蜜蜂的精子採集與保存確有相當的難度，第一、蜂群之成熟雄蜂的數量有限且與環境蜜源、季節相關，每隻雄蜂所產之精液亦非常稀少；第二、蜜蜂之冷凍精子保存液近兩年才開發完成，且正在測試精子儲藏期限，以上兩點增添了蜜蜂人工授精與保種的難度。過去一年我們亦針對雄蜂的養殖嘗試了不同的方法，進行探討，目前已能順利穩定取得蜜蜂精子，不久將進一步進行人工授精培育蜂種試驗(圖二)。



圖二、了解本土西方蜜蜂之種原，做為爾後育種的依據。同時，藉由人工授精系統與遺傳基因標記的協助進而培育各種蜜蜂品系。

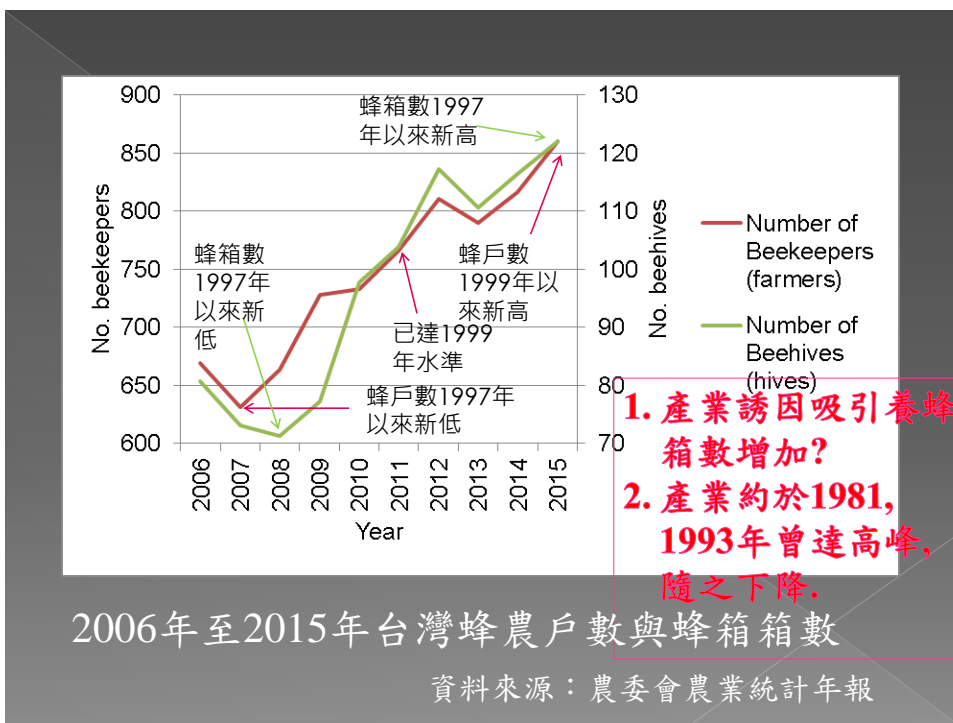
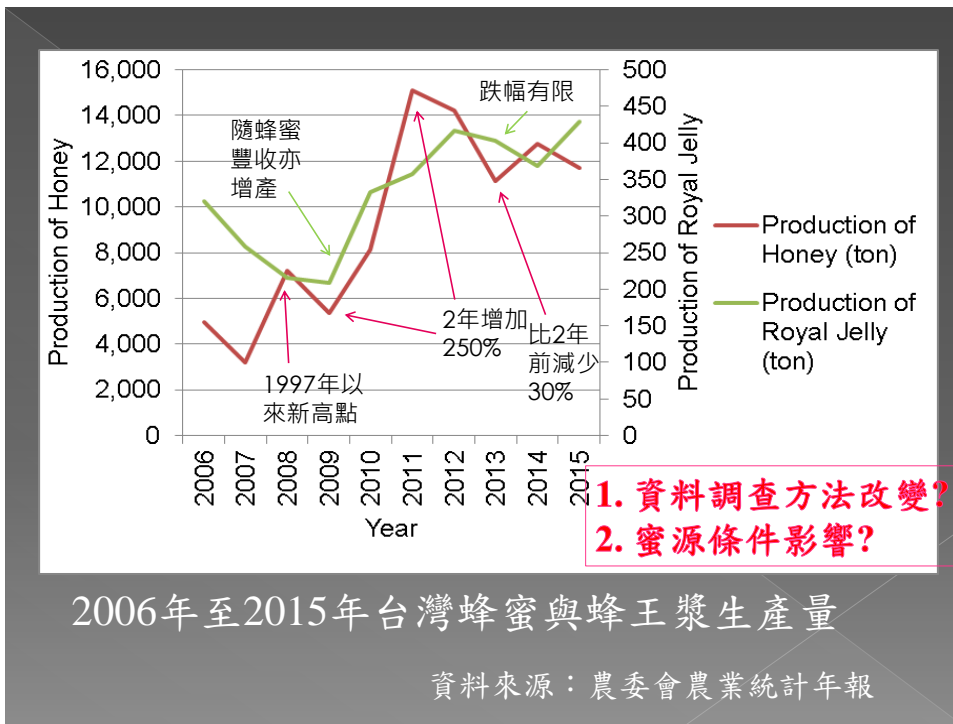


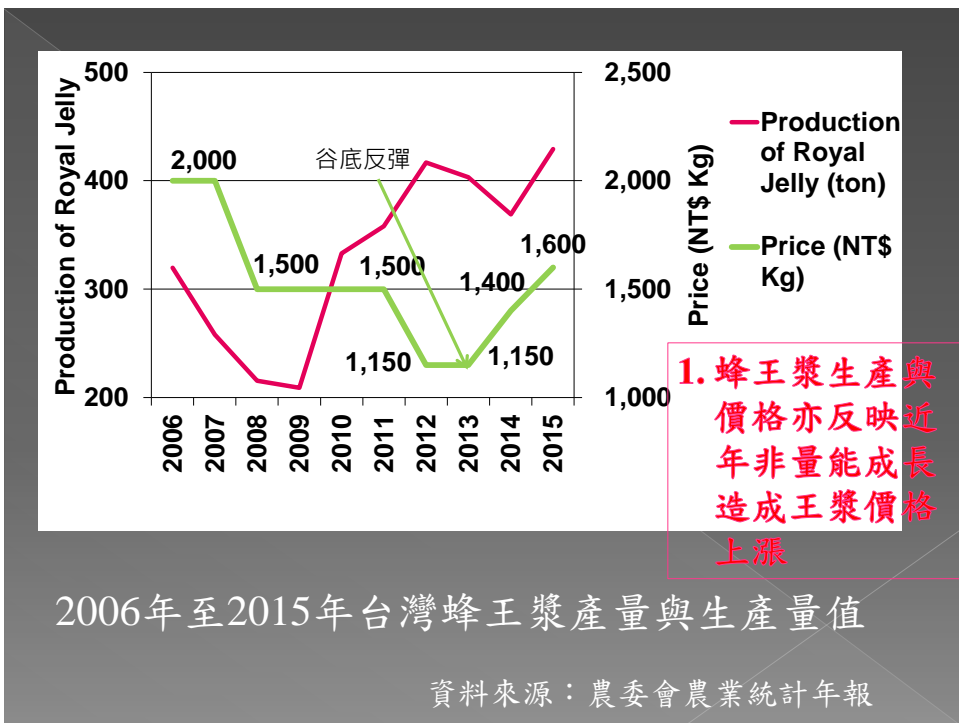
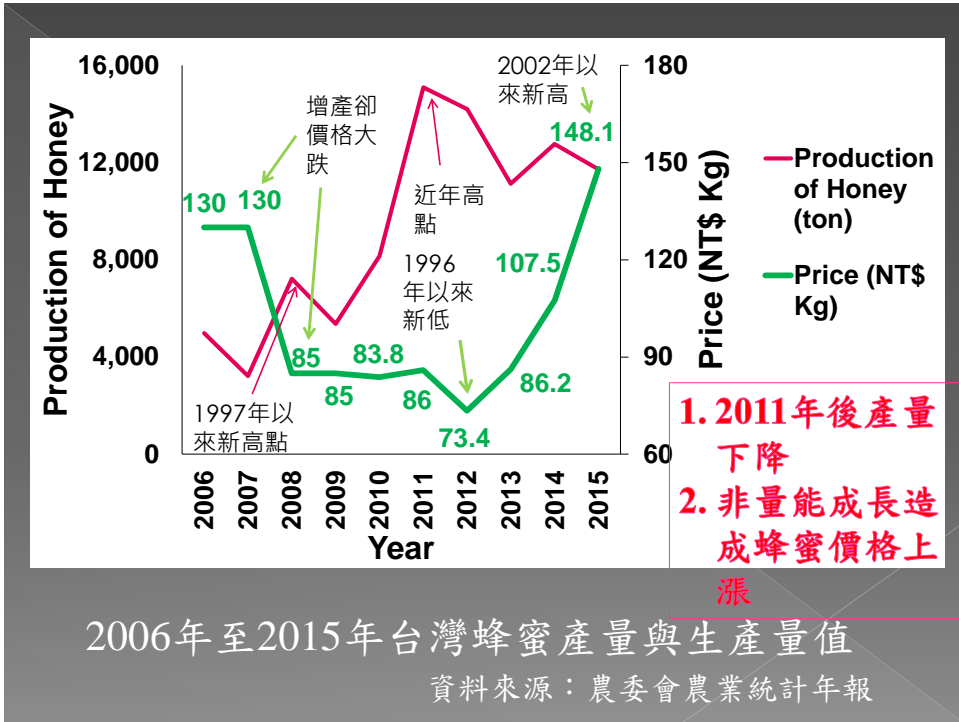
# 台灣近年養蜂業發展之成因 與隱憂

國立嘉義大學植物醫學系  
宋一鑫 助理教授  
2017/9/15

## 前言

- ◎ 台灣曾經是世界上有名的養蜂產業王國，1980年代蜂王漿外銷產業曾讓許多養蜂人家賺滿荷包。自1990年代之後，許多複雜的因素使得台灣的養蜂產業面臨蕭條之勢。
- ◎ 近十年來，時空因素轉換，台灣的養蜂產業似乎有復甦之勢，蜂蜜價格年年飆漲，投入養蜂之青年農民亦趨之若鶩，養蜂產業已成為熱門之農業選項。
- ◎ 本主題針對近年來國家統計數據、輿論與市場概況，分析近年來養蜂產業復甦之可能原因，並探討未來可能影響蜂產業之要因。





## 近年蜂產品增值可能因素

- ◎ 景氣關係
- ◎ 消費物價上揚
- ◎ 民間推動與政府輔導措施
- ◎ 蜂蜜減產與民眾預期心理
- ◎ 食安疑慮
- ◎ 國際市場趨勢

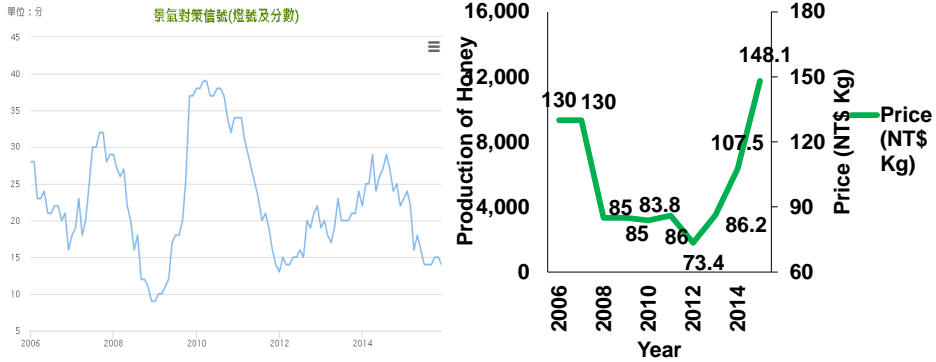
### Scenario 1：景氣關係



2006年至2015年台灣景氣對策信號

資料來源：國發會景氣指標查詢系統

### Scenario 1 : 景氣關係

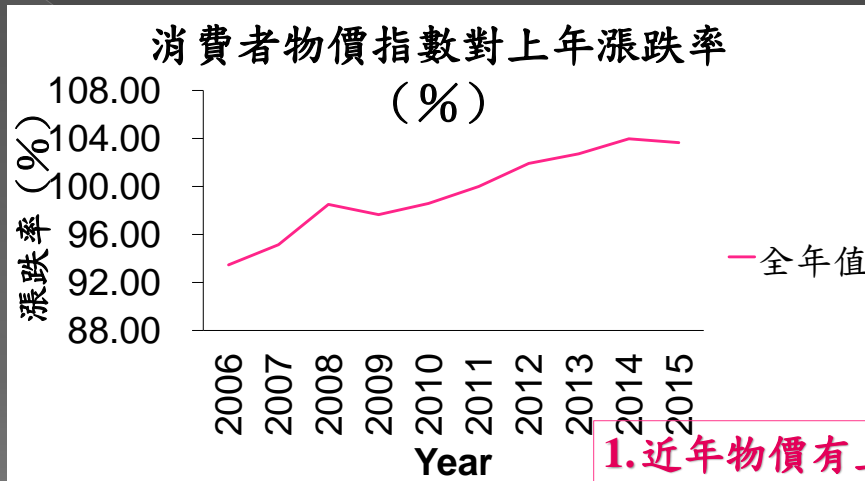


2006年至2015年台灣景氣對策信號

資料來源：國發會景氣指標查詢系統

1. 景氣循環對於蜂蜜價格影響似乎有限

### Scenario 2 : 消費物價上揚

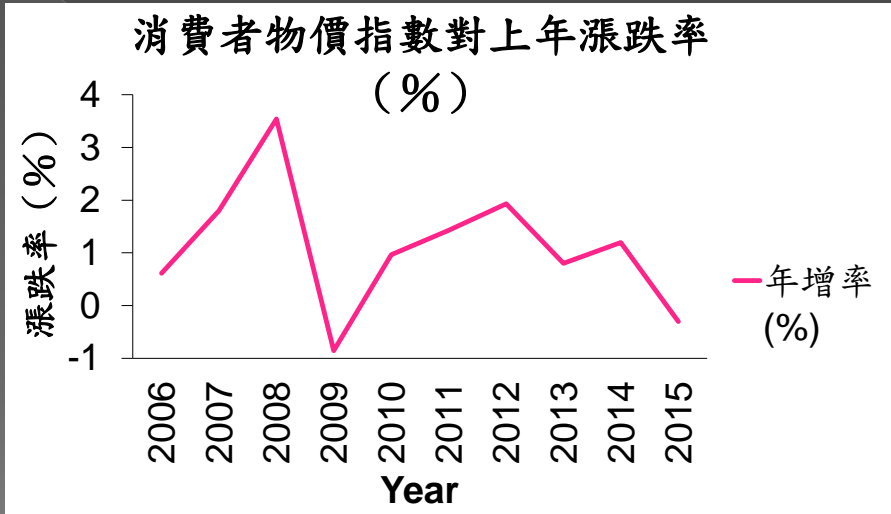


1. 近年物價有上漲趨勢

2006年至2015年消費者物價指數對上年漲跌全年值

資料來源：行政院主計總處統計資訊網

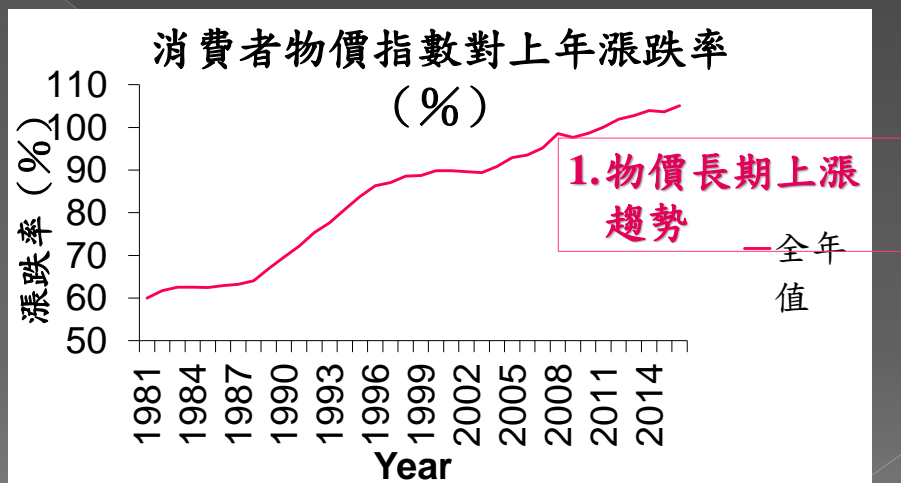
## Scenario 2：消費物價上揚



2006年至2015年消費者物價指數對上年漲跌年增率

資料來源：行政院主計總處統計資訊網

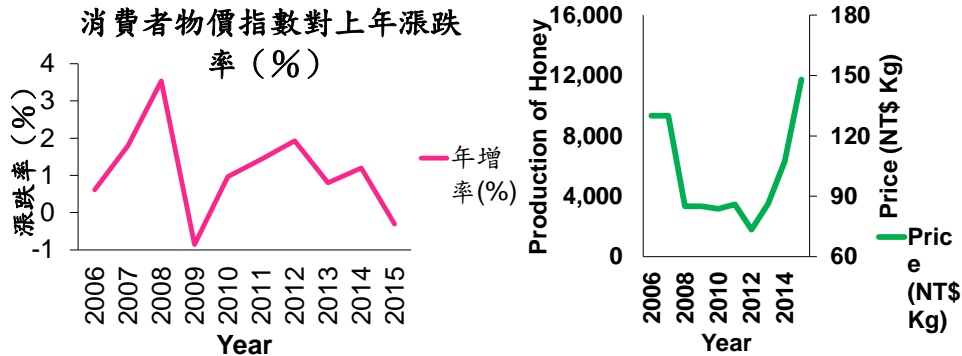
## Scenario 2：消費物價上揚



1981年至2015年消費者物價指數對上年漲跌全年值

資料來源：行政院主計總處統計資訊網

## Scenario 2：消費物價上揚



2006年至2015年消費者物價指數對上年漲跌年增率

資料來源：行政院主計總處統計資訊網

1. 從年增率看上漲趨勢為緩慢漸進式的
2. 期間蜂蜜價格漲跌可見

## Scenario 3：民間推動與政府輔導措施

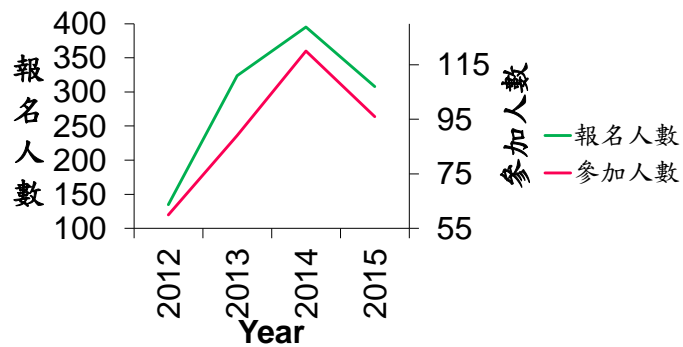
### 協會推動與政府養蜂輔導措施

- ◎ 養蜂輔導工作之策劃、推動及督導-補助養蜂協會辦理蜂蜜驗證
- ◎ 蜂產品評鑑與蜂蜜品質檢驗制度-縣市級與全國性蜂蜜評鑑(2006~年年辦理)
- ◎ 行銷輔導-縣市蜂蜜展售、記者會、頒獎典禮、品牌建立
- ◎ CNS國家標準修訂(2016/6/8)
- ◎ 林地養蜂-國內養蜂產銷班或團體申請臨時使用國有林班地放置蜂箱注意事項 (2016/4/14)
- ◎ 災害救助-農業天然災害救助辦法(2017/5/11修)...

### Scenario 3：民間推動與政府輔導措施

- 農民學院養蜂班：農民學院2011年底成立，2012年陸續辦理養蜂入門班、養蜂初階班、養蜂進階班、蜜蜂授粉班。

2012-2015 農民學院養蜂班開辦情形表

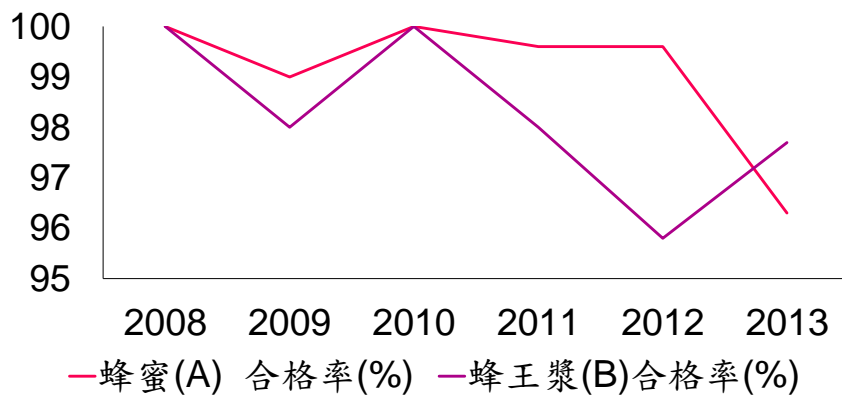


	平均錄取率(%)
2012	44.4
2013	27.5
2014	30.4
2015	31.2
總和	<b>31.4</b>

資料來源：鍾國雄。2015。苗栗區農業專訓 71:11-14。

### Scenario 3：民間推動與政府輔導措施

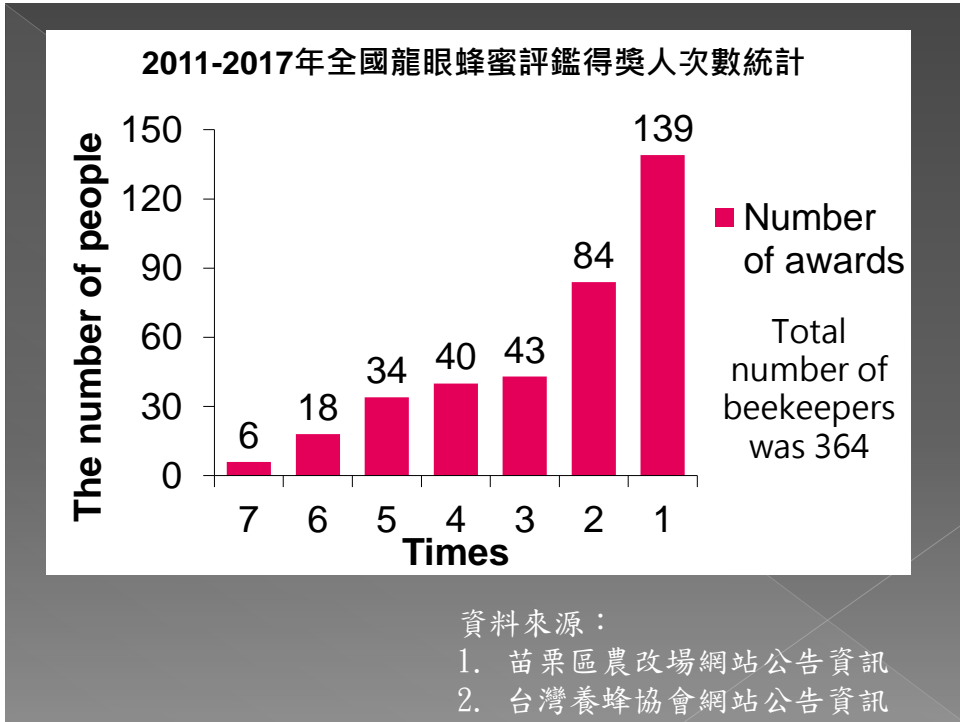
2008-2013 年蜂產品品質管制統計



資料來源：台灣養蜂協會網站資訊

養蜂協會辦理蜂蜜驗證成效





## Scenario 4 : 蜂蜜減產與民眾預期心理

資料來源：

- 公視新聞網 (2012/7/25)
- 農委會農業統計年報

公視新聞網 > 生活財經 > 今年怪天候 全台蜂蜜減產2-3成

晚間新聞 2012-07-25

蜂蜜又香又甜、很多人愛喝，農委會今天也評選出高品質蜂蜜。不過今年受到天候影響，龍眼和荔枝的開花減少，蜂蜜產量大約減少兩到三成，價格可能會上漲一兩成。

濃稠又散發濃郁龍眼香，這就是今年被農委會、評選為特等的蜂蜜。生產出高品質蜂蜜的，就是這位來自台南玉井的農民江順良，每天都要被蜜蜂螫他，卻把蜜蜂當孩子在寶貝，他說當只有蜜蜂很健康，蜂蜜的品質才可能好。

Year	Production of Honey	Price (NT\$ Kg)
2006	130	
2007	130	
2008	85	
2009	85	
2010	83.8	
2011	86	
2012	73.4	
2013	86.2	
2014	107.5	
2015	148.1	

## Scenario 4：蜂蜜減產與民眾預期心理



標題：2013/08/19蜂蜜減產5成 價格漲3成

2013/8/19

自由時報記者葉水蓉〔枋山報導〕受到氣候及農藥影響，今年蜜蜂死亡率增加，蜂蜜減產一半以上，價格也漲了二、三成，枋山鄉養蜂達人陳明旭表示，為提升蜜蜂體力、增加蜂群數量，蜂農會餵食花粉給蜜蜂吃，希望增加蜂蜜產量。

今年蜜蜂死亡率大幅增加，經過專家研究發現與農藥的使用有關，蜜蜂因為吃下農藥造成死亡，使得今年的蜜蜂數量大減，蜂蜜產量也受到影響。

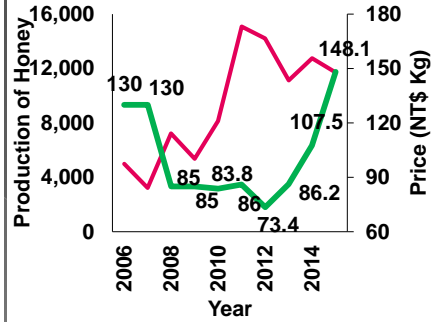
養蜂達人陳明旭表示，今年蜜蜂數量銳減，原本一箱蜂果的有五、六萬隻蜜蜂，現在只剩下三、四萬隻，產量也大幅減少，蜂蜜預估減產一半以上，價格因而上漲了二、三成。

陳明旭說，蜂巢蜜蜂的數量由蜂王決定，蜂王會根據採回來的花蜜、花粉來判斷外在環境好不好，再決定新生蜜蜂的數量，人為操控不易；不過，有經驗的養蜂人都知道提供花粉給蜜蜂食用，這能讓蜜蜂的體力增加，還可借此釋放外在環境良好的訊息，影響蜂王判斷，多生出些卵來轉化成蜜蜂，增加蜂箱內蜜蜂的數量，提高蜂蜜產量，穩定消費市場。

相關連結：養蜂協會活動花絮

資料來源：

台灣養蜂協會  
農委會農業統計年報



標題：2013/08/19蜂蜜減產5成 價格漲3成

2013/8/19

## Scenario 4：蜂蜜減產與民眾預期心理



標題：氣候異常 春不暖花不開 蜂多蜜少

發布日期：2016年4月8日

今年氣候極度異常，年初受到霸王寒侵襲，許多蜜蜂受不了酷寒凍死，加上農曆春節後多次冷氣團陸續南下，除了影響荔枝、龍眼等多種果樹的花期延後，甚至不開花，目前即使有開花的荔枝果樹、龍眼果樹，花苞都很少，流蜜量少，大量的蜂群擠進蜜區，造成蜜蜂採不到蜂蜜，讓蜜蜂白做工導致過勞死，今年蜂蜜產量可能創下歷年新低。

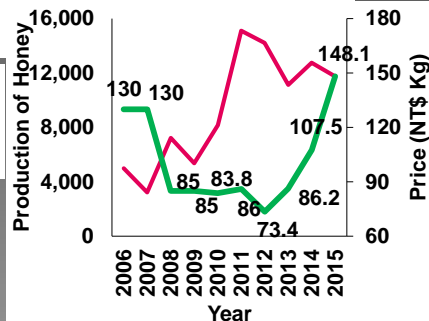
相關連結：養蜂協會活動花絮

標題：氣候異常 春不暖花不開 蜂多蜜少

發布日期：2016年4月8日

資料來源：

台灣養蜂協會  
農委會農業統計年報



## Scenario 4：蜂蜜減產與民眾預期心理

### 蜂蜜減產50年最慘 價格漲5成

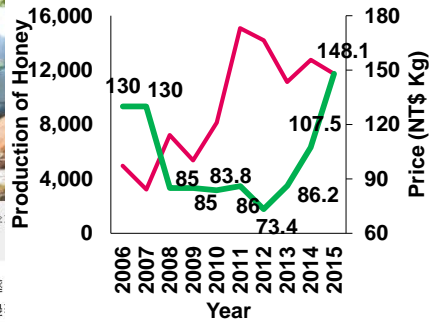
2017年05月16日 04:10 鍾武達 / 彰化報導



二水鄉養蜂人李瑞峰（左）飼養的蜜蜂因農民噴灑農藥導致數量銳減，農會總幹文琳（右）關心現況。（鍾武達攝）

農藥惹的禍？今年疑因農民在龍眼、荔枝開花期間噴灑防治蟲害的農藥「連服」，結果導致彰化縣二水鄉飼養的蜜蜂大量「迷航」或死亡，養蜂

資料來源：  
中時電子報(2017/5/16)  
農委會農業統計年報



## Scenario 5：食安疑慮-蜂蜜真假、成分

- 標題：說我的蜂蜜是假？ 蜂農告消基會

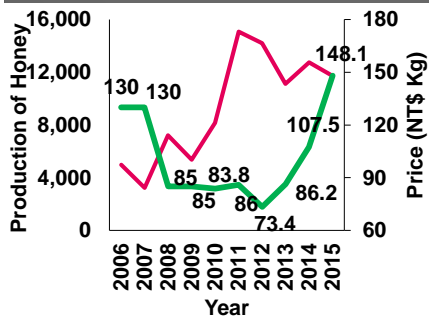
2006/04/21 TVBS 官網

- 標題：蜂蜜是活性產品 含糖量等成份會隨著時間有所變化

2015/1/14 台灣養蜂協會

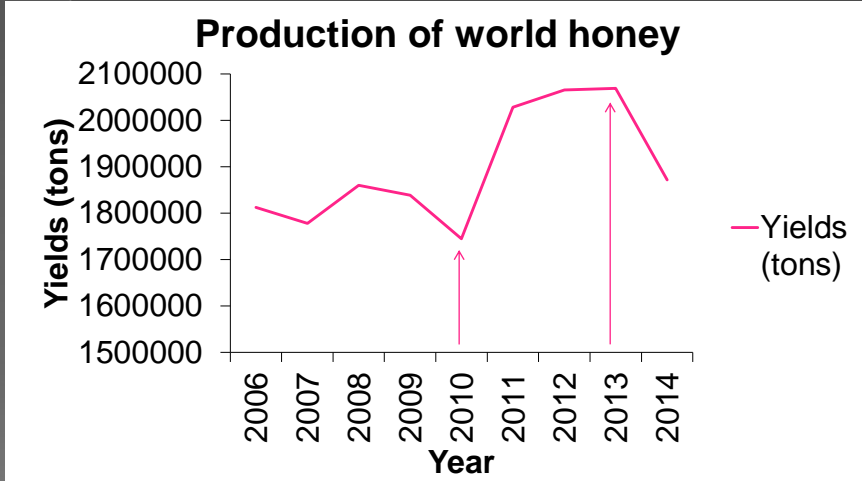
- 標題：50嵐原料又出包 蜂蜜檢出四環黴素

2015/7/5 蘋果日報



資料來源：  
農委會農業統計年報

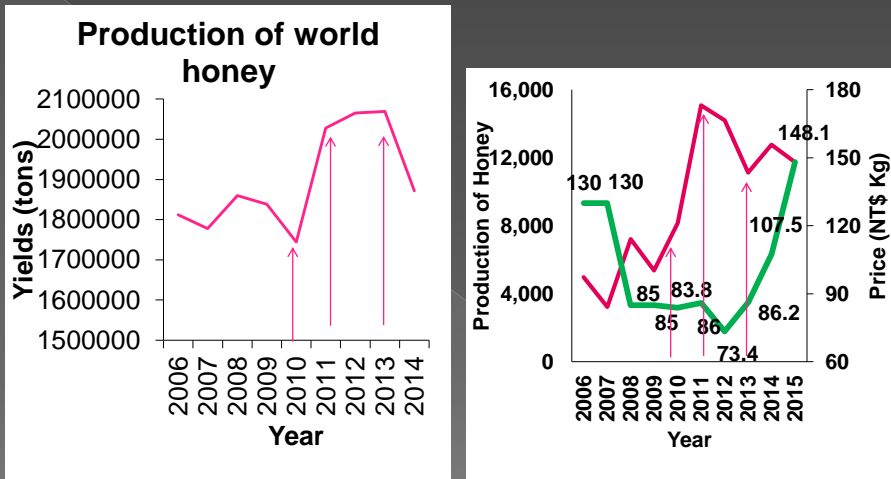
Scenario 6 : 國際市場趨勢



2006-2015年全球蜂蜜產量

資料來源：FAOSTAT

Scenario 6 : 國際市場趨勢



2006-2015年全球與台灣蜂蜜產量趨勢比較

資料來源：

1. FAOSTAT
2. 農委會農業統計年報

## Scenario 6：國際市場趨勢

2006-2015年歐盟蜂蜜輸出與輸入價格趨勢似  
與國內漲跌起伏關係不大（圖表詳簡報報告）

資料來源：  
EU, Honey Market Presentation

小結:(加成 **+** 關聯少 **-**)

- ◎ 景氣關係 → **-**
- ◎ 消費物價上揚 → **+** or **-**
- ◎ 政府輔導措施 → **+**
- ◎ 蜂蜜減產與民眾預期心理 → **+**
- ◎ 食安疑慮 → **+**
- ◎ 國際市場趨勢 → **-**

## 小結:近年蜂產品增值可能形成因素

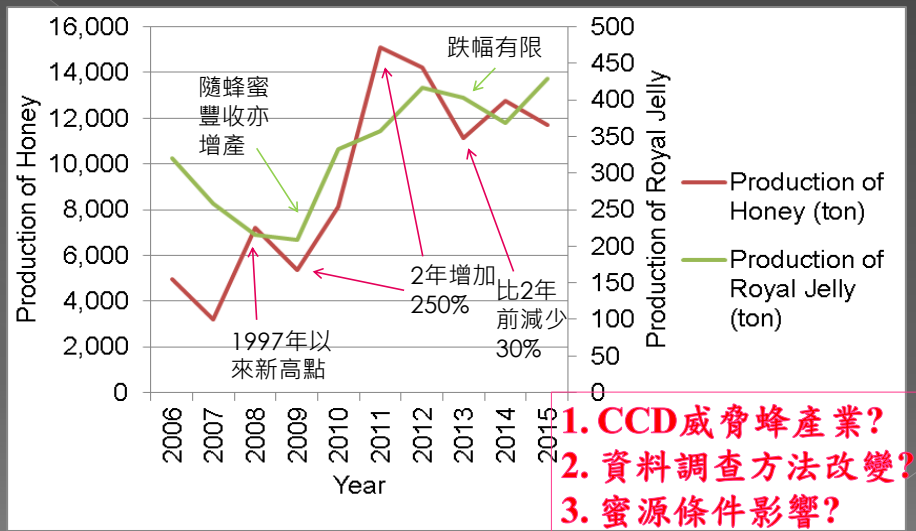
- ◎ 近十年來，台灣養蜂產業的興盛，應是受到蜂蜜價格飆漲，使得養蜂產業成為青年農民青睞的農業選項之一。
- ◎ 蜂蜜可長期保存，近年國內蜂蜜價格的飆漲，與受到蜂蜜減產、消費者預期心理加上食安疑慮的成因可能性較高，復因農民配合政府輔導措施，蜂蜜品質提升，亦有可能。但與國內消費物價上揚及國際市場趨勢關聯性可能較低。

## 未來值得注意之問題

- ◎ 熱度退燒-消費者預期心理、食安疑慮
- ◎ 成本提高-國內與國外競爭、養蜂成本…
- ◎ 都市化養蜂環境的困境-用地取得與採蜜環境
- ◎ CCD的影響-蜂群消失
- ◎ 傳統病蟲害與新興病蟲害的影響-新藥開發不及
- ◎ 極端氣候與氣候變遷的影響-蜂群減少

將導致→蜂群減少與減產

## CCD真的對台灣蜂業威脅少?



2006年至2015年台灣蜂蜜與蜂王漿生產量

資料來源：農委會農業統計年報

## 值得關注傳統、新興蜜蜂病蟲害 相關問題(近年觀察與整理)

- ◎ 囊狀幼蟲病等蜜蜂幼蟲病毒性病害
- ◎ 蜜蜂敵害-中華大虎頭蜂、掠食性螞蟻、東方蜂鷹 (林地養蜂)
- ◎ 蜂蟎的防治
- ◎ 蜂箱甲蟲與無脊椎動物等傳播病毒
- ◎ 雙色虎頭蜂
- ◎ 鬼臉天蛾

(圖表詳簡報報告)

## 值得關注的養蜂環境議題(近年觀察與整理)

- ◎ 蜜源不足
- ◎ 荔枝椿象
- ◎ 都市化
- ◎ 養蜂人口暴增
- ◎ 蜜蜂中毒
- ◎ 採蜜後蜂群生長不良
- ◎ 新式蜂箱
- ◎ 不當引種

(圖表詳簡報報告)

## 值得關注的氣候變遷養蜂議題(近年觀察與整理)

- ◎ 溫暖化
- ◎ 颱風強度增加
- ◎ 極端降雨
- ◎ 連續大雨

(圖表詳簡報報告)