

## 以人工飼育蜜蜂幼蟲法評估羧四環素的藥效

陳裕文 國立宜蘭技術學院應用動物系 宜蘭市 260 神農路 1 號

王重雄 何鏡光\* 國立台灣大學昆蟲學系 台北市 106 羅斯福路 4 段 1 號

### 摘 要

實驗室內人工飼育西洋蜂 (*Apis mellifera*) 1 日齡工蜂幼蟲至羽化成蜂的技術已經建立，羽化率為 57.1%。利用此飼育技術，添加羧四環素 (oxytetracycline, OTC) 5-150 ppm 於配方食物中，評估其對幼蟲發育的影響。結果顯示 25 ppm OTC 對幼蟲的生長發育與存活率並無顯著的影響，但高於此濃度則幼蟲呈現生長延遲或存活率減低的現象。再於配方食物中加入  $4.5 \times 10^5$  spores/ml 的幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae larvae*) 和 0.2-25 ppm OTC，以探討 OTC 對美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 的抑病力。食物中添加 OTC 者，除了 0.2 ppm 處理組出現 1% 的罹病個體，1 ppm 以上的處理組皆可完全抑制 AFB 的發生，顯示 OTC 確可有效防治 AFB。

關鍵詞：羧四環素、美洲幼蟲病、幼蟲芽孢桿菌、蜜蜂、人工飼養。

### 前 言

美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 是西洋蜂 (*Apis mellifera*) 最嚴重的病害，全世界主要養蜂地區皆有美洲幼蟲病的發生 (Matheson, 1995)，台灣於 1967 年首度發現 AFB 後 (Yen and Chyn, 1971)，至今仍嚴重發生於西洋蜂群。美洲幼蟲病的病原為幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae larvae*)，其對蜜蜂幼蟲的致病力與齡蟲的大小關係密切，對西洋蜂 1 日齡幼蟲  $LD_{50}$  為 21 個孢子， $LD_{95}$  為 442 個孢子；對 2 日齡幼蟲的致病力大為減低，接種  $4.5 \times 10^4$  個孢子只引起 37.2% 的

死亡率 (Chen *et al.*, 1997)，而東方蜂 (*A. cerana*) 對本病則具有抗性 (Chen *et al.*, 2000)。感病的幼蟲通常於進入封蓋期 (capping stages) 後才會呈現典型美洲幼蟲病的病徵，但接種高劑量孢子會造成部分幼蟲無法進入封蓋期。

許多抗生素藥劑具有控制 AFB 蔓延的效果 (Moffett *et al.*, 1970)，其中羧四環素 (oxytetracycline, OTC) 對台灣本土蜂群極具防治效果 (Chen *et al.*, 2001)，西洋蜂群餵飼 1 次含羧四環素 125 mg 的糖漿，可完全抑制美洲幼蟲病的發生至少達 9 日，而羧四環素 50 mg 則可完全抑制至少達 3 日。

\*論文聯繫人  
e-mail:kkho@ccms.ntu.edu.tw

蜜蜂為真社會性昆蟲 (eusocial insects)，其幼蟲的食物皆由工蜂中專司飼育的護士蜂 (nurse bees) 提供 (Winston, 1987)，此種高度的親代照顧 (parental care) 雖然提供了幼蟲良好的生長條件，卻也造成蜜蜂幼蟲研究的困難，例如：接種病原體於幼蟲，成蜂可能偵測幼蟲罹病或其它因素而將幼蟲移除，造成病理學研究的困難；防治幼蟲病害的藥劑無法直接施用於幼蟲，必須間接地藉由成蜂傳遞予幼蟲，防治效果因而受蜂群行為的影響甚鉅；幼蟲食物由成蜂餵育，營養成分不易人為的添加或去除，造成蜜蜂營養學研究的困難；上述問題皆因蜂群提供高度的親代照顧所致，若吾人能以人工飼養的方式，排除蜂群照顧所造成的困擾，則諸多研究皆可得到直接且明確的結果。

本研究建立了室內人工飼育蜜蜂幼蟲的技術，並利用此技術將幼蟲芽孢桿菌孢子和羥四環素添加於幼蟲食物中，如此可以更明確地探討羥四環素的對蜜蜂幼蟲的毒性與防治美洲幼蟲病的藥效。

## 材料與方法

### 一、人工飼育技術的建立

#### 1. 食物的製備

參照 Vandenberg and Shimanuki (1987) 配製基礎幼蟲食物 (basic larval diet, BLD)，其配方如下：蜂王漿 (50%)，無菌水 (37%)，D-glucose (6%)，D-fructose (6%) 和酵母抽出物 (Difco, 1%)。製備時先把糖類和酵母抽出物溶於無菌水中，再加入蜂王漿充分混勻，保存於 4℃，BLD 的製備量以 3 日內使用畢為原則。另參照 Peng *et al.* (1992) 配置另一基礎幼蟲食物 (BLD<sub>1</sub>)，其配方為市售蜂王漿冷凍乾燥粉末 (21%)，無菌水 (72%)，

D-glucose (3%)，D-fructose (3%) 和酵母抽出物 (Difco, 1%)，以比較兩種食物配方的飼育效果。

### 2. 飼育的技術

參照 Peng *et al.* (1992) 的方法，以 24 孔的塑膠製組織培養盤 (Corning) 為幼蟲飼育的器皿，每一孔固定注入 300 μl 的 BLD，再以鵝毛製移蟲針分別從 4 群西洋蜂各移出 30 隻 1 日齡工蜂幼蟲，使幼蟲浮於 BLD 上；每日將幼蟲移至新鮮的 BLD 上，第 1 日和 2 日每一孔飼育 10 隻幼蟲，第 3 日和 4 日則分別飼育 3 隻和 2 隻，第 5 日起則每一孔飼育 1 隻，直至幼蟲排出白色的尿酸結晶，此表示幼蟲已停止取食進入排便期，相對於蜂群內的狀況則為封蓋幼蟲期。上述值取食期幼蟲的飼育環境為 34℃，95% R.H. 全暗的生長箱。俟幼蟲進入排便期，則準備同為 24 孔的飼養盤，於孔的底部平鋪二層拭鏡紙 (Kimwipes)，每孔以軟鑷移入 1 隻幼蟲，飼養盤則置於 34℃，70% R.H. 全暗的生長箱，此後不再移動蟲體，幼蟲便可於孔中完成排便、吐絲和化蛹的過程，最後羽化為成蜂。為避免羽化的成蜂四處爬行，每一飼養盤均蓋上透明塑膠蓋，以便於觀察蟲體的變態過程。

成蜂羽化後，秤量其體重，並以大顎的形狀、攜粉足的有無和螫針的構造等 3 個形態特徵，判定羽化成蜂的階級 (caste)。另直接於蜂群內移取 24 隻初封蓋的幼蟲，同樣置於上述人工飼育幼蟲的排便化蛹環境，以此較蜂群自行飼育和人工飼育者的差異。此外，自東方蜂群分別移取 1 和 2 日齡幼蟲 41 和 12 隻，利用上述的 BLD 和飼育方法飼育之，以探討此技術飼育東方蜂幼蟲的可行性。

### 二、測試羥四環素的防治效果

#### 1. 羥四環素無藥害濃度的建立

利用人工飼育幼蟲的技術，取 1 日齡工蜂幼蟲於飼育過程中全程添加 150, 100, 60, 25 和 5 ppm 等不同濃度的 OTC 於 BLD 中，對照組則不加 OTC；每重複飼育 30 隻，每處理 4 重複。全程記錄幼蟲生長發育的狀況，並稱量羽化成蜂的體重與階級，以探討 OTC 不影響幼蟲生長發育的濃度。

### 2. 幼蟲飼育全程添加羧四環素的防治效果

建立 OTC 不影響幼蟲生長發育的濃度後，除全程於 BLD 中分別添加 25, 5, 1 和 0.2 ppm 的 OTC 外，再於 1-2 日幼蟲的 BLD 中接種  $4.5 \times 10^5/\text{ml}$  的 *P. I. larvae* 孢子；另有接種孢子而未添加 OTC 的陽性對照組與兩者皆未添加的陰性對照組。本試驗每重複飼育 30 隻，每處理 4 重複，以探討 OTC 對感染幼蟲的保護效果。

### 3. 幼蟲飼育後半程添加羧四環素的防治效果

同試驗 2，於第 1 日和第 2 日接種病原孢子，但前 3 日的 BLD 不添加 OTC，讓孢子在幼蟲的腸道萌發和增殖；第 4 日起，BLD 才開始分別添加 25, 5, 1 和 0.2 ppm 的 OTC，直至幼蟲開始排便為止，以探討 OTC 對感染 *P. I. larvae* 幼蟲的治癒效果。

## 結 果

### 一、人工飼育技術的建立

參照 Vandenberg and Shimanuki (1987) 配製的 BLD，西洋蜂幼蟲可正常取食，完成蛻皮、排便、化蛹，並羽化為成蜂（圖一）；參照 Peng *et al.* (1992) 配製的 BLD<sub>1</sub>，則幼蟲生長不佳，大部分幼蟲於移殖 3-4 日後死亡，而且均無法進入排便期。利用 BLD 飼育的幼蟲，有 81.9% 幼蟲可進入排便期，最後有 57.1% 幼蟲可羽化為成蜂，但成蜂中有 7.8% 為后蜂或中間型個體。幼蟲生長發育的狀況見

於圖二，可發現大部分 (90.0%) 進入排便期的幼蟲於移殖 6-7 日後出現排便現象，只有 10.0% 於第 7 日排便；成蜂中有 82.2% 於 17-19 日羽化為工蜂，4.1% 於 20 日羽化為工蜂，另有 13.7% 於 13-16 日羽化者則為后蜂或中間型個體。上述人工飼育幼蟲的生長發育大致與蜂群內相符合 (Jay, 1963)。

利用此人工飼育技術和 BLD 食物飼育東方蜂 1 日齡和 2 日齡幼蟲的結果不理想，1 日齡幼蟲於移殖 3 日後的存活率僅 51.2%，但只有 12.2% 的幼蟲於移殖 6 日後進入排便期，最後只有 4.9% 幼蟲分別於移殖 16 日和 17 日後羽化為工蜂，其體型與一般東方蜂工蜂相當，發育過程亦和蜂群內相同。2 日齡幼蟲則幼蟲取食期的死亡率較低，有 66.7% 可以進入排便期，但只有 33.3% 正常地於移殖 5 日後排便，6 日後有 16.7%，另有 16.7% 分別延遲至 8-9 日後才進入排便期；此 66.7% 進入排便期幼蟲最後皆因無法順利化蛹或羽化而死亡。

## 二、測試羧四環素的防治效果

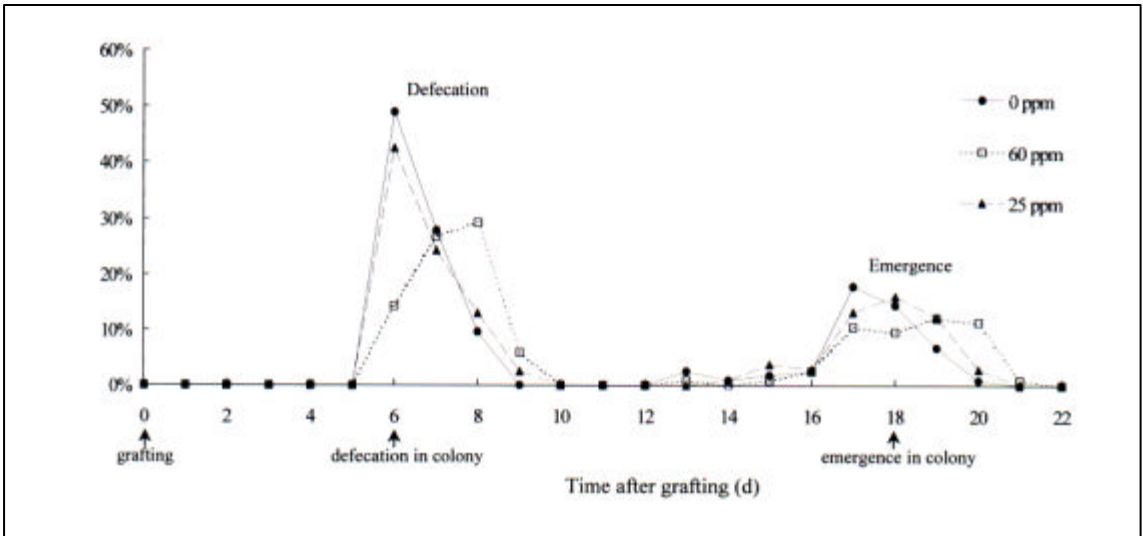
### 1. 無藥害濃度的建立

幼蟲食物中添加不同濃度 OTC 的結果（圖三），可發現添加 5, 25 和 60 ppm 的幼蟲死亡率、排便後死亡率和羽化率皆與對照組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，其幼蟲死亡率為 20.3-24.1%，排便後死亡率為 27.4-36.7%，羽化率則為 43.0-48.5%。高濃度 (100 和 150 ppm) OTC 對幼蟲發育有不良的影響，150 ppm 處理組的幼蟲死亡率高達 62.2%，100 ppm 處理組亦達 46.2%，二者均顯著高於對照組 ( $P < 0.05$ )，惟此二者進入排便期後的死亡率分別為 28.0 與 42.0%，與對照組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，顯示高濃度 OTC 的毒性表現於取食期幼蟲，使得二者羽化率只有 9.8% (150 ppm) 和 11.8% (100 ppm)。



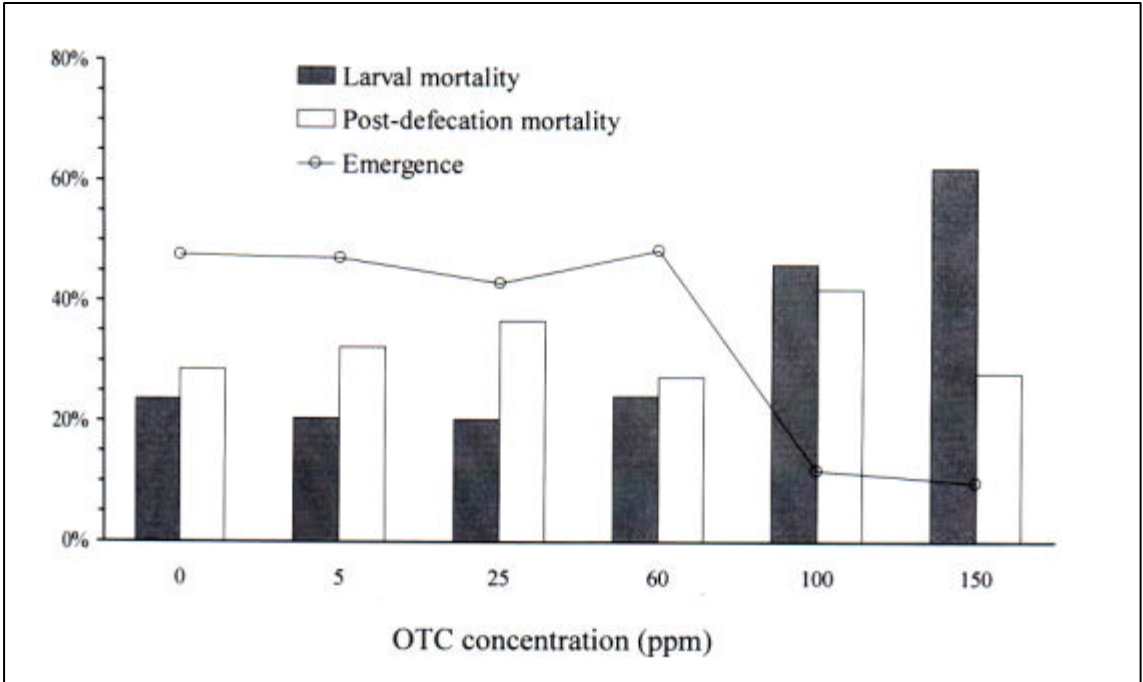
圖一 人工飼育西洋蜂幼蟲之發育過程。A, 3 日齡幼蟲, 指針處為其蛻皮; B, 初進入排便期的幼蟲, 蟲體下方可見其排出許多尿酸晶體 (指針處); C, 即將羽化的蛹; D, 新羽化的成蜂; E, 人工育成的蜂后(Q)、工蜂(W)和發育不良的工蜂(Dw)。

Fig. 1. Development of rearing honey bee larvae by artificial methods in the laboratory. A, Three-day-old larvae and their ecdyses (arrows); B, A larva at the early defecation stage (arrows show the defecated uric crystals); C, A pupa that has nearly reached emergence; D, A newly emerged adult; E, Queen (Q), worker (W), and dwarf worker (Dw) reared by artificial methods.



圖二 蜜蜂幼蟲人工飼育試驗中食物添加羧四環素(OTC)對幼蟲生長的影响。

Fig. 2. Effects of BLD supplemented with oxytetracyclin, OTC, on the development of the larval honey bee reared in the laboratory by artificial methods.



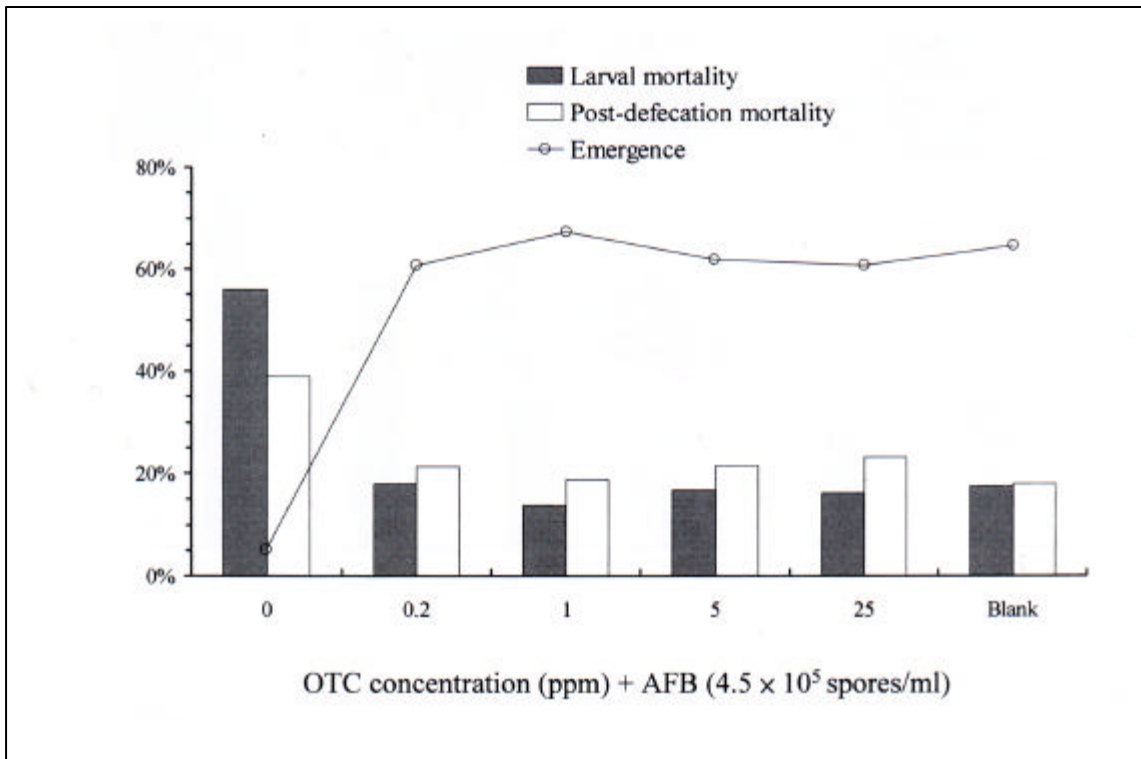
圖三 不同羧四環素(OTC)濃度對人工飼育蜜蜂幼蟲的影响。

Fig. 3. Dose response of oxytetracyclin, OTC, on the mortality of larval honey bee, *Apis mellifera*, reared in the laboratory by artificial methods.

由試驗幼蟲的生長發育過程，可發現 25 ppm 處理組的生長過程與對照組相近，60 ppm 處理組則進入排便期的時間有延遲 1 日的現象；100 ppm 和 150 ppm 處理組生長延遲的現象更為明顯，移殖 3 日後二者蟲體即明顯較小，移殖 6 日後二者生長更加緩慢，其取食量很低，與正常末齡蟲將供應 BLD 吃盡的現象差異很大，而且體色較暗而不具光澤，體內則有色素沉積的現象；此發育不良的幼蟲即使羽化為工蜂，其體型也因此變得細小（圖一）。上述現象示 BLD 中含高濃度（60 ppm 以上）OTC 對幼蟲生長有不良的影響，60 ppm OTC 雖然不會影響幼蟲的存活率和羽化率，但會造成幼蟲生長的延遲，故 OTC 對幼蟲無藥害濃度應為 25 ppm 以下。

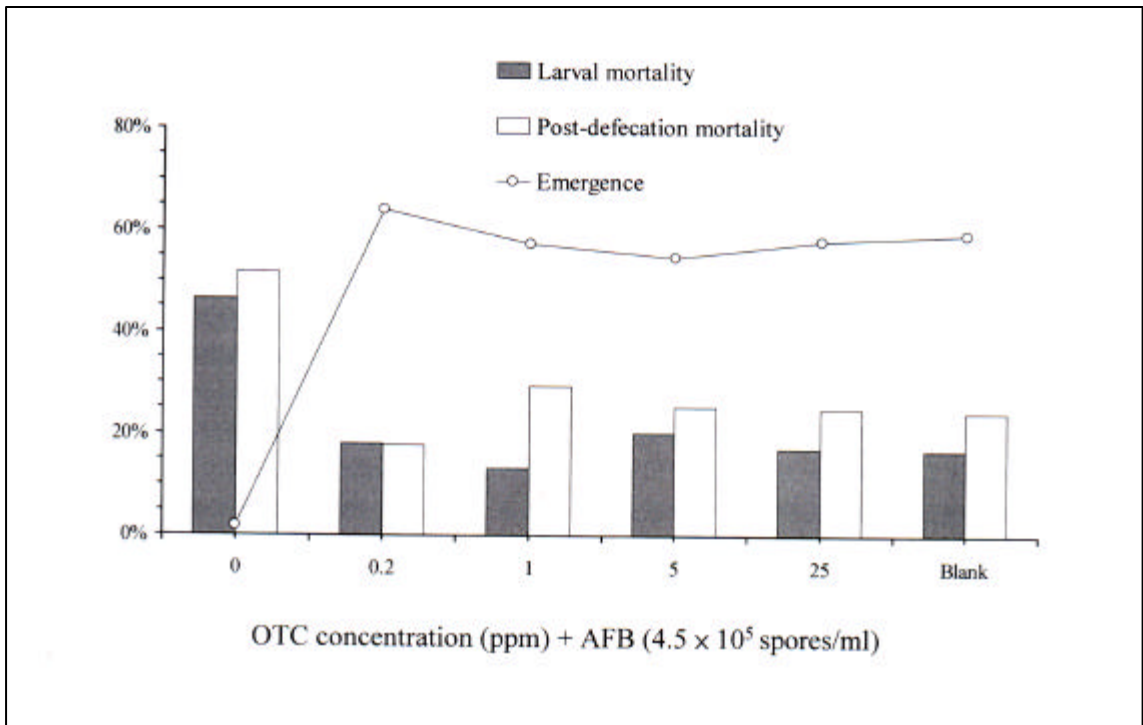
## 2. 幼蟲取食期全程添加羍四環素的防治效果

BLD 中全程添加不同濃度 OTC 對幼蟲的預防保護效果見於圖四，可發現添加 0.2, 1, 5 和 25 ppm 處理組的幼蟲死亡率，排便後死亡率和羽化率皆與陰性對照組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，其幼蟲死亡率為 13.8-18.0%，排便後死亡率為 18.0-23.1%，羽化率則達 60.7-67.4%，且處理組中只有 0.2 ppm 處理組出現 1.0% AFB 罹病體。BLD 中加入 *P. I. larvae* 孢子而未添加 OTC 的陽性對照組，其幼蟲死亡率平均達 55.9%，只有 44.1% 幼蟲進入排便期，但最後僅 5.2% 順利羽化為工蜂，其餘 38.9% 皆無法順利化蛹而於前蛹期發生 AFB 死亡。從幼蟲生長過程觀之，食入孢子的幼蟲可藉由 OTC 得到正常的生長羽化，顯示 OTC 對感染



圖四 幼蟲取食期全程餵食不同濃度羍四環素(OTC)對接種美洲幼蟲病原體 ( $4.5 \times 10^5$  spores/ml) 之西洋蜂幼蟲的保護效果。

Fig. 4. Protective effects of BLD supplemented with various doses of oxytetracycline, OTC, in all larval stages of *Apis mellifera* against American foulbrood pathogen ( $4.5 \times 10^5$  spores/ml).



圖五 幼蟲取食後半期餵食不同濃度羶四環素(OTC)對接種美洲幼蟲病原體之西洋蜂幼蟲的保護效果。

Fig. 5. Protective effects of BLD supplemented with various doses of oxytetracyclin, OTC, in the latter half of the larval stage of *Apis mellifera* against American foulbrood pathogen ( $4.5 \times 10^5$  spores/ml).

*P. I. larvae* 的幼蟲具有良好的保護效果，食物中含 0.2 ppm OTC 即可有效抑制 AFB 的發生。

### 3. 幼蟲取食期後程添加羶四環素的防治效果

本項試驗於第 4 日起才於 BLD 中添加相同濃度 OTC，此時幼蟲於第 1、2 日食入的孢子已於腸道中萌發增殖，發現 OTC 仍能有效“治癒”已經感染的幼蟲，0.2, 1, 5 和 25 ppm 處理組的幼蟲死亡率，排便後死亡率和羽化率皆與陰性對照組無顯著差異 ( $P > 0.05$ )，但 1 和 5 ppm 處理組則分別出現 0.8 和 0.9% 的 AFB 發生率。再從幼蟲生長發育的過程觀之，已經感染的幼蟲仍可藉 OTC 而得到正常的生長羽化，顯示已遭感染的中齡幼蟲 (3-4 日齡)，食物中含 0.2 ppm OTC 即可有效控制 AFB 的發生。

## 討 論

除了先期的試驗外，本研究利用 Vandenberg and Shimanuki (1987) 的 BLD 配方，先後進行 3 次飼育西洋蜂 1 日齡幼蟲的試驗。各次試驗的對照組羽化率略有差異，依次為 47.6、59.2 及 64.6%，平均羽化率 57.1%，均低於 Peng *et al.* (1992) 報導的 74.5% 羽化率。分析其原因，除了可能和人為移殖幼蟲的純熟度有關外，蜂王漿品質的變異亦可能是重要的因素。本研究於試驗初期首先以 Peng *et al.* (1992) 的 BLD<sub>1</sub> 配方進行飼育，但嘗試多次皆發現飼育幼蟲生長緩慢且均於 3-4 日後死亡，後來改採 BLD 配方才飼育成功。分析兩種配方的區別，最主要的差異為

BLD<sub>1</sub> 採用冷凍乾燥的蜂王 1 漿粉末，而 BLD 則為生鮮蜂王漿。BLD 的組成份中生鮮蜂王漿佔 50%，因此蜂王漿的品質具有關鍵性的影響。就蜂王漿的生產而言，影響其品質的因子甚多 (Chang *et al.*, 1993)；再者，蜂王漿採收後的保存過程亦會影響成份的變化 (Lee *et al.*, 1988)。本研究所用的蜂王漿雖來自同一養蜂場，但分屬兩批不同時間購入，可發現利用第二批蜂王漿飼育者 (第 2-3 次試驗) 羽化率顯然較高，此差異也可能因兩批蜂王漿取得時間不同所造成。此外，本研究配製 BLD<sub>1</sub> 中的蜂王漿粉末為市售商品，一則其加工流程可能影響成份變化；再則蜂王漿直接經冷凍乾燥所得製品呈黏稠狀，且具高吸溼性，因此必須添加糊精類物質才能保持良好的商品性狀 (Tseng *et al.*, 1994)。上述二項因素，造成 BLD<sub>1</sub> 無法飼育成功。如此則透露一個重要訊息，市售蜂王漿膠囊是否仍保持應有的生物活性？目前，蜂王漿品質的優劣一般以癸烯酸 (10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-HDA) 的含量作為指標，如此以單一化合物的含量作為品質的標準，其適用性是值得商榷；況且，10-HDA 十分穩定，常溫下儲存亦不易變化，但蜂王漿中的粗脂肪和粗蛋白則於 25 儲放一個月即會劣化 (Lee *et al.*, 1988)。蜂王漿原本即是蜜蜂幼蟲的食物，其營養份的流失或不足直接可以反應於幼蟲的生長或階級的分化上，若利用此技術發展成為檢測蜂王漿活性的生物檢定技術，所得的結果必然較 10-HDA 的含量更具正確性。

本研究建立此飼育技術的目的在於取代蜂群對幼蟲的飼育行為，使得幼蟲可於人為的控制下進行接種病原孢子和抗生物質，如此可以清楚地觀察幼蟲的發病過程與評估抗生物質的效果。Chen *et al.* (1997) 發現 1 日齡幼蟲感染 442 個 *P. I. larvae* 孢子，會造成 53.3%

的幼蟲無法進入封蓋期；本研究的陽性對照組，其幼蟲死亡率達 55.9%，此陰性對照組高出 38.5%，此現象與 Chen *et al.* (1997) 的觀察相符合，同時也進一步證實此無法進入封蓋期幼蟲係因提前發病而遭工蜂移除。Peng *et al.* (1992; 1996) 曾應用人工飼育的技術測試氯四環素 (chlorotetracycline) 和 Tylosin 兩種抗生素防治 AFB 的效果，其有效濃度分別為 25 和 300 ppm，本研究則發現 OTC 0.2 ppm 即可有效防治，而且只要取食期後半程食入 OTC 便有效果，顯示 OTC 的防治藥效優於氯四環素和 Tylosin。此外，本研究亦發現 BLD 含 60 ppm OTC 時，幼蟲生長有延遲的現象，150 ppm 則幼蟲大量死亡；這兩個濃度約是 Chen *et al.* (2001) 探討 OTC 的田間防治試驗中餵食蜂群的 50 和 125 mg 劑量，因此，如果將此濃度的 OTC 直接噴灑幼蟲，則可能造成不良影響。如此也說明了部分蜂農以噴灑法防治 AFB，卻發生幼蟲發育不良或死亡的現象。

本飼育技術主要的目標為育成工蜂，惟仍無可避免地育出 7.8% 的后蜂或中間型個體，此種食物因子造成的階級分化課題，已引起研究者廣泛的討論 (Weaver, 1962, 1966, 1974; Mitsui *et al.*, 1964; Shuel *et al.*, 1978; Beetsma, 1979; Rembold and Lackner, 1981; Wilde and Beetsma, 1982; Asencot and Lensky, 1984, 1985; Brouwers, 1984; Yoshida *et al.*, 1984; Brouwers *et al.*, 1987)，但其育出的成蜂亦皆出現后蜂、中間型和工蜂，只是比例互異而已。分析其原因，多數試驗 (包括本試驗) 飼育全程多採同一種食物配方，如此則與蜂群的狀況不符。未來可朝隨蟲齡改變配方的方向研究，使育出者皆為工蜂，當然，如果育出的目標為后蜂，則必須調整 BLD 的組成使其符合后蜂的生長所需。

Oku and Ono (1990) 曾將西洋蜂群王台內的幼蟲置換成 1 日齡東方蜂幼蟲，此置換幼蟲少部分可發育至封蓋期，但均無法羽化，顯示東方蜂幼蟲無法利用西洋蜂的食物得到正常的發育。Takenaka and Takenaka (1996) 分析兩種蜜蜂蜂王漿的組成份，發現東方蜂王漿含較多的蛋白質，而碳水化合物則較低，顯示兩者組成份不同，因此本研究利用 BLD 飼育 1 日齡東方蜂幼蟲只育出 4.9% 工蜂；Oku and Ono (1990) 亦曾以西洋蜂蜂王漿人工飼育東方蜂幼蟲，但 1-2 日齡幼蟲均無法羽化，3 日齡幼蟲則有 20% 羽化率。由此可見，建立人工飼育東方蜂幼蟲的技術，食物配方必須以東方蜂蜂王漿為基礎，飼育的成功率才可能提升。

室內人工飼育蜜蜂幼蟲的技術，應用的範圍很廣，除了可用以測試防治 AFB 藥劑的藥效外，許多幼蟲期的疾病如歐洲幼蟲病 (European foulbrood)、白堊病 (chalk brood) 和囊雛幼蟲病 (sac brood) 等，皆可利用此技術進行病理學研究和測試藥效。此外，諸多蜜蜂生理學、營養學和毒理學等方面的問題，亦可利用此技術獲得解答。尚且，可應用於蜂王漿品質的生物檢定，值得開發研究。

## 引用文獻

- Asencot, M., and Y. Lensky.** 1984. Juvenile hormone induction of 'queenliness' of female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 109-117.
- Asencot, M., and Y. Lensky.** 1985. The phagostimulatory effect of sugars on the induction of "queenliness" in female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 203-208.
- Beetsma, J.** 1979. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. *Bee World* 60: 24-39.
- Brouwers, E.V.M.** 1984. Glucose/fructose ratio in the food of honeybee larvae during caste differentiation. *J. Apicult. Res.* 23: 94-101.
- Brouwers, E.V.M., J. Beetsma, and R. Ebert.** 1987. Behavioral and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apicult. Res.* 26: 11-23.
- Chang, C. P., F. K. Hsieh, and L. R. Hsu.** 1993. Factors influencing 10-hydroxy- $\gamma$ -2-decenoic acid and other major components of royal jelly in the honeybee. *Chin. J. Entomol.* 13: 161-175 (in Chinese).
- Chen, Y. W., J. S. Liu, K. K. Ho, C. H. Wang, and J. An.** 2001. Control effects of oxytetracycline on American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae* of honey bee, *Apis mellifera*. *Formosan Entomol.* 21: 209-220 (in Chinese).
- Chen, Y. W., C. H. Wang, J. K. An, and K. K. Ho.** 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. *J. Apicult. Res.* 39: 169-175.

- Chen, Y. W., C. H. Wang, and K. K. Ho.** 1997. Pathogenicity of *Bacillus larvae* to the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). Chin. J. Entomol. 17: 23-32 (in Chinese).
- Jay, S. C.,** 1963. The development of honeybees in their cells. J. Apicult. Res. 2: 117-134.
- Lee, E. L., L. K. Chu, C. F. Li, and E. L. Hsu.** 1988. Changes of the components of royal jelly stored at different temperatures. Food Sci. 15: 81-90 (in Chinese).
- Matheson, A.** 1995. World bee health report. Bee World 76: 31-39.
- Mitsui, T., T. Sagawa, and H. Sano.** 1964. Studies on rearing honey bee larvae in the laboratory. I. The effect of royal jelly taken from different ages of queen cells on queen differentiation. J. Econ. Entomol. 57: 518-521.
- Moffett, J. O., J. D. Hitchcock, J. J. Lackett, and J. R. Elliott.** 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. J. Apicult. Res. 9: 111-119.
- Oku, N., and M. Ono.** 1990. Preliminary attempts to rear larvae of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, in an *Apis mellifera* colony and in the laboratory using *A. mellifera* royal jelly. Honeybee Sci. 11: 121-124.
- Peng, C. Y. S., E. Mussen, A. Fong, P. Cheng, G. Wong, and M. A. Montague.** 1996. Laboratory and field studies on the effects of the development and prevention of American foulbrood disease. J. Invertebr. Pathol. 67: 65-71.
- Peng, C.Y.S., E. Mussen, A. Fong, M. A. Montague, and T. Tyler.** 1992. Effect of chlortetracycline of honeybee worker larvae reared *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 60: 127-133.
- Rembold, H., and B. Lackner.** 1981. Rearing of honeybee larvae *in vitro* effect of yeast extract on queen differentiation. J. Apicult. Res. 20: 165-171.
- Shuel, R. W., and S. E. Dixon.** 1968. The importance of sugar for the pupation of the worker honeybee. J. Apicult. Res. 7: 109-112.
- Takenaka, J., and Y. Takenaka.** 1996. Royal jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. Biosci. Biotech. Biochem. 60: 518-520.
- Tseng, C. Y., Z. R. Yu, and C. F. Li.** 1994. Preparation of royal jelly powers and property characterization of the products during storage. J. Chin. Agric. Chem. Soc. 32: 113-124 (in Chinese).
- Vandenberg, J. D., and H. Shimanuki.** 1987. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. J. Apicult. Res. 26: 90-97.
- Weaver, N.** 1962. Control of dimorphism in the female honeybee. Science 138: 995.

**Weaver, N.** 1966. Physiology of caste determination. *Ann. Rev. Entomol.* 11: 79-102.

**Weaver, N.** 1974. Control of dimorphism in the female honeybee. 2. Methods of rearing larvae in the laboratory and of preserving royal jelly. *J. Apicult. Res.* 13: 3-14.

**Wilde, J. de, and J. Beetsma.** 1982. The physiology of caste development in social insects. *Adv. Insect Physiol.* 16: 167-246.

**Winston, M. L.** 1987. *The Biology of the Honey Bee.* Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

**Yen, D. F., and L. C. Chyn.** 1971. Studies on a bacterial disease of honeybee in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 13: 12-17 (in Chinese).

**Yoshida, T., M. Sasaki, and T. Ohnishi.** 1984. Effect of lipid content in royal jelly on the queen differentiation of the honeybee, *Apis mellifera*. *Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.* 24: 43-52.

收件日期：2002年1月11日

接受日期：2002年2月7日

# Effects of Oxytetracycline of Larval Honey Bee, *Apis mellifera*, Reared *in vitro*

Yue-Wen Chen Department of Applied Animal Science, National H-Lan Institute of Technology, H-Lan, Taiwan 260, R.O.C.

Chung-Hsiung Wang and Kai-Kuang Ho\*

Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan106, R.O.C.

## ABSTRACT

An artificial method was developed for rearing 1-day-old worker honey bee (*Apis mellifera*) larvae to the adult stage in the laboratory. The proportion of adult emergence was 57.1%. This method subsequently was used to study the effects of oxytetracycline (OTC) on larval growth and development. With a concentration of 25 ppm OTC in the diet, larval and postdefecation mortalities, and larval growth rates were similar to those of the controls, while doses higher than this retarded larval growth and caused higher mortality. Feeding with 0.2 ppm OTC effectively reduced larval and postdefecation mortalities of larvae inoculated with  $4.5 \times 10^5$  spores/ml of *Paenibacillus larvae larvae*. But it appeared in 1% of American foulbrood (AFB) individuals. When fed 1.0 ppm OTC and spores, no additional mortalities or AFB-infected individuals were found. This reveals that a low concentration of OTC can effectively protect young larvae from *P. l. larvae* infection.

Key words: oxytetracycline, American foulbrood, *Paeniacillus larvae larvae*, honey bee, artificial rearing.

