

## 台灣蜜蜂小 RNA 病毒

吳治宇、陳盈仔、江敬皓、王重雄\*

國立台灣大學昆蟲學系

### 摘 要

感染蜜蜂之病毒中，已有超過 16 分離株被認為是類小 RNA 病毒 (a picorna-like virus)，近年來生物技術的發展，其中已有四病毒株之完整基因組序列被定序完成。因此確定他們的分類地位，蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (SBV) 與典型的哺乳類小 RNA 病毒及另兩種昆蟲類小 RNA 病毒：家蠶與透翅毒蛾軟化症病毒 (IFV 和 PnPV) 之基因組結構相同，但基因序列之相似度上，三種昆蟲類小 RNA 病毒與哺乳類小 RNA 病毒有很大的差別，將來應可成立另一新屬 (昆蟲類小 RNA 病毒屬)。其他三種蜜蜂類小 RNA 病毒 (急性蜜蜂麻痺病，黑蜂王台病毒和克什米爾蜜蜂病毒) 之基因組結構與蟋蟀麻痺症病毒 (CrPV) 相同，應屬蟋蟀麻痺症病毒屬。台灣缺乏此方面的研究，在初步的結果中已確定有蜜蜂囊雛幼蟲病毒和黑蜂王台病毒存在，此方面的研究有待加強。

**關鍵詞：**蜜蜂小 RNA 病毒、蜜蜂囊雛幼蟲病毒、急性蜜蜂麻痺病毒、黑蜂王台病毒、克什米爾蜜蜂病毒。

### 緒 言

昆蟲 RNA 病毒中的家蠶質形多角體病毒 (cytovirus; cytoplasmic polydrosis virus, CPV) 和蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (sacbrood bee virus, SBV) 發現與研究雖已有相當的歷史，但相對於昆蟲 DNA 病毒之研究顯然落後很多，主要因素是因其基因組為 RNA，除不易操作外，又是低病原性之昆蟲病毒而受限於生物防治之應用。但家蠶之質形多角體病毒，因其對蠶絲工業 (sericulture industry) 及其關係到脊椎動物之重要病原性的呼吸腸道病毒 (reoviruses)，而受到較多學者的關注。昆蟲類小 RNA 病毒 (insect picorna-like virus) 亦是處在相同狀況下，雖然至少已有 25 分離株以此為名的報導 (Murphy *et al.*, 1995)，但是直到近年來 (2000 年後)，才逐漸可見昆蟲類小 RNA 病毒的基本生物學和分類地位的雛型或輪廓 (Wu *et al.*, 2002)。

\*論文聯繫人  
chwang@ccms.ntu.edu.tw

從昆蟲病毒分類史即可了解蜜蜂類小 RNA 病毒之重要性。西元 1948 年 Holmes 首次企圖建立昆蟲病毒分類的體系，當時他將昆蟲病毒分類為病毒目(Order Virales)，動噬亞目 (Suborder Zoophagineae)，包含體病毒科 (Family Borrelinaceae)，包含體病毒屬 (*Borrelina*) 和非包含體病毒屬 (*Morator*)。前一屬是會引起昆蟲多角體病 (polyhedrosis)，凋萎 (wilt) 病，和其他鱗翅目種類之病毒病。而後一屬則只含有一種病毒，即是蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (Tanada and Kaya, 1993)，可見蜜蜂囊雛幼蟲病毒是早已受到重視之昆蟲病毒。義大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 有相當多的疾病是因 RNA 病毒感染所引起的，至 1991 年有 19 種已被鑑定為此類病毒，其中至少有 16 種病毒被描述為蜜蜂類小 RNA 病毒。除了蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (SBV) 外，其他如急性蜜蜂麻痺病毒 (acute bee-paralysis virus, ABPV)、黑蜂王台病毒 (black queen-cell virus, BQCV)、克什米爾蜜蜂病毒 (Kashmir bee virus, KBV)、慢性蜜蜂麻痺病毒 (chronic bee-paralysis virus, CBPV)、慢性蜜蜂麻痺病毒之近緣病毒 (chronic bee-paralysis virus associate)、美阿肯色州蜜蜂病毒 (Arkansas bee virus)、X 型蜜蜂病毒 (bee virus X)、Y 型蜜蜂病毒 (bee virus Y)、緩性蜜蜂麻痺病毒 (slow bee-paralysis virus)、翅霧病毒 (cloudy-wing virus)，和埃及蜜蜂病毒 (Egypt bee virus) (Bailey and Woods, 1974, 1977; Bailey and Ball, 1991) 等，亦是常見於相關雜誌或刊物的蜜蜂病毒。這些蜜蜂類之小 RNA 病毒形成一異質群，然而利用現代科技 (DNA 序列) 發現多數的蜜蜂病毒是歸納於果蠅 C 病毒 (*Drosophila C virus*) 之未命名的科內 (Evans and Hung, 2000)，由於有限的分子資料，以至於目前尚未完全建立這些蜜蜂病毒之彼此間，以及與其他關係密切的昆蟲小 RNA 病毒間之類緣關係。其有二主要的因素存在，首先在田間診斷時，需要有明確診斷價值之生理和行為上的病毒病症之特徵，否則蜜蜂病毒病之鑑定有實際上的困難，此因素因而導至無法完全地估算潛伏性病毒病。以遺傳檢定主要病毒 (key viruses)，可克服此因素的困擾，並提供蜜蜂族群內病毒發生之較準確的估算，所得的資料可以用來評估病毒之致死或亞致死效應 (lethal and sublethal effects) 的發生頻度與嚴重性。其次的困擾是重要蜜蜂病毒之分類地位。這種挑戰早已是蜜蜂病理學者所面對與遭遇的一大難題，利用血清檢定以鑑別蜜蜂病毒為先前克服形態上之瓶頸所採用的嘗試，困難的是要在這一大群的蜜蜂病毒中，需要各別發展出具有鑑識力的抗體，並持續地發展已知蜜蜂病毒和其突變株以及猛暴性蜜蜂病毒病所需的抗體 (單株抗體)，這些皆對於蜜蜂病毒病的鑑定與防治時之經濟與時機上都是不太合適。再則蜜蜂病毒有如人之病原體，常也會因交互作用而導至誤判。總而言之，分子遺傳技術將可提供一精確且靈敏之鑑識病毒工具，如 RNA 依 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 和解螺旋酶 (*Helicase*) 之非構造基因序列的比較，提供一可供分析及建構近緣蜜蜂病毒間關係的好題材 (Evan and Hung, 2000)。

雖然至少有源自蜜蜂的 16 病毒株，被認為是類小 RNA 病毒群 (Biley and Ball, 1991)，但也只有急性蜜蜂麻痺病毒 (ABPV)、黑蜂王台病毒 (BQCV)，和蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (SBV) 等 3 種病毒之基因組被完全定序，從序列和結構上它們應分屬二種不同群的類小 RNA 病毒群，ABPV

和 BQCV 屬於類蟋蟀麻痺病毒 (Cricket paralysis-like viruses, CrPV)，而 SBV、家蠶傳染性軟化症病毒 (infectious flacherie virus, IFV) 以及透翅毒蛾小 RNA 病毒 (*Perina nuda* picorna-like virus, PnPV) 屬同一群是很明確 (Liljas *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002)。然而其他的蜜蜂類小 RNA 病毒之基因組尚未被完全定序，但具有代表性的特定基因序列 (*RNA-dependent-RNA polymerase* 及 *Helicase*) 之 RT-PCR 的擴增與序列比較結果，可藉以進行病毒間的分析與研究，相信必可釐清它們的相關性。

台灣養蜂事業已有相當長的歷史 (約 200 多年)，但對蜜蜂類小 RNA 病毒的報導則罕見於雜誌和刊物上，原因甚多，主要因素還是不外於其為低病原性之昆蟲病毒。相同地，國外亦有類似的狀況，所以深入研究是近年來才啟動的課題。本文即以已被深入研究之三種蜜蜂類小 RNA 病毒 (蜜蜂囊雛幼蟲病毒、急性蜜蜂麻痺病毒、和黑蜂王台病毒) 作一綜論，以為後學著的參考，並輔以近年來本研究室所得之初步結成果，期能達拋磚引玉之功。

## 蜜蜂囊雛幼蟲病毒

蜜蜂囊雛幼蟲病毒是最早發現的昆蟲病毒之一，此病毒所引起的幼蟲疾病稱之蜜蜂囊雛幼蟲病 (sacbrood disease)，早在西元 1857 年甚至可能更早，即人類開始飼育蜜蜂前已知此病的存在 (Steinhaus, 1947)。此病在美國發現後，現已在加拿大、澳大利亞、丹麥、英國、瑞典、法國、原蘇聯、埃及、紐西蘭、新幾內亞、和中國等地皆有病例報導，可以說幾乎全世界的養蜂國家皆有此病毒的發現。中國大陸於 1971 年，廣東省佛岡、從化、增城等地之中國蜂 (*A. cerana*) 首先發生了蜜蜂囊雛幼蟲病，次年全省流行。並很快就迅速蔓延到福建、江蘇、江西、浙江、安徽、湖南、四川、青海和貴州等省，現已蔓延至中國各地的中國蜂飼養區。病害在新區爆發時，傳染速度極快，危害性很大，可造成 30%~90% 的蜂群損失，發病區之病害逐漸趨向平穩，但有時偶而也會發生短暫的流行，如福建省的部分地區 1990 年春中國蜂蜜蜂囊雛幼蟲病又局部發生流行，造成了約 50% 的蜂群損失 (王等, 1996)。台灣本地極少發現蜜蜂囊雛幼蟲病，但在北部飼養的中國蜂群中亦曾發現此病感染 (何等, 1997)。

White (1913) 是首次以科學化進行研究蜜蜂囊雛幼蟲病的學者，亦由他命名此病，他於西元 1917 年發現其病原體可通過 Berkfeld 和 Pasteur-Chamberlain 濾片而傳代，而確定此病為病毒病，所以他也是首次確定蜜蜂囊雛幼蟲病是病毒病的學者 (Steinhaus, 1947)。之後，直到西元 1964 年蜜蜂囊雛幼蟲病毒才真正被定性。蜜蜂囊雛幼蟲病之病毒粒子是不具被膜之 20 面體，直徑約 28-30 nm 的病毒，其基因組含有一單鏈正意股 RNA (positive single strand, ssRNA) (Lee and Furgala, 1965; Ghosh *et al.*, 1999)。罹患此病之幼蜂，因無法化蛹，體壁下的蛻皮液累積並充斥著病毒粒子，於是死亡的蟲體會形成一堅韌的小囊袋，並可輕易從巢房取出。幼蟲體內之

感染組織的細胞之胞質內可見小泡的形成，病毒即在小泡內進行合成、組合並增殖之；成熟的病毒在小泡內呈隨機分佈或呈結晶狀排列，初感染的幼蟲含有大量的脂肪體組織，其細胞相對於較未感染的細胞肥大，且細胞核呈不規則狀 (White, 1917)。雖然病毒亦可見於核內，極可能是病毒蛋白的累積而非病毒形成處 (Dall, 1987)。嚴重感染的幼蟲之所有組織幾乎皆呈現嚴重的細胞病變，尤其脂肪細胞含有大小不均之圓形黑色內含體。雖然成蜂亦會被感染，但未見明顯的症狀，病毒除分佈在成蜂體內之脂肪體細胞外，工蜂之下咽喉腺 (hypopharyngeal gland) 以及雄蜂腦內亦可見病毒的分佈 (Lee and Furgala, 1967)。

瀕死之幼蜂體色由珍珠白色 (淡藍白色) 轉變為淡黃色，而且在外觀上從呈現腫脹變成軟化狀。死亡幼蜂之前三分之一的頂端形成圓錐狀指向巢室頂部。剛死之幼蜂體色在幾天內由微黃轉成棕色，若進一步腐敗則轉黑色，此時體壁堅韌形成小囊體，並不黏著於巢壁，易於被工蜂從巢室中將此死蟲移除。而蟲體隨著時間而脫水，蜂屍由典型囊袋狀乾透成木乃伊狀，整個乾掉的蟲屍形成鱗狀物有如平底船 (gondola-shaped boat)，亦不附著在巢壁上。淡黃色的蜂屍仍具高感染力，但蜂屍體色若轉成淡棕色則感染力銳減，若進一步轉成黑色則感染力全消失。

蜜蜂囊雛幼蟲病為養蜂者所注意是，該病以蜂巢為單位 (White, 1917)，並可能出現在幼蟲育養時期的任何季節。但是此病好發於冬末至春初，因在此季節蜂群發育快速，有大量的可接受幼蜂可供感染。一般蜜蜂囊雛幼蟲病會在主要流蜜期開始後消退 (蜂群到夏天會自然會復原)，但有些地區因氣候不同，於夏初仍然會發生。此病目前尚無藥物可供有效的預防或治療。蜂群病發之初，死幼蟲和小囊體會不規則性地出現。進而暴發嚴重的感染而常使蜂巢趨弱，但蜂巢並不會因此而被消除。多數罹病幼蜂在封蓋後死亡，這些含有死亡幼蜂的巢蓋較黑，成蜂也許會將死亡幼蜂移除或只在巢蓋上穿刺 1-2 孔的現象，其為成蜂欲將病死幼蜂移除之行為所致。在蛹期與成蜂少有發生致死性的感染。事實上，感染的巢房是無特殊臭味，成蜂受感染後，雖然病症不明顯，但可從行為上的改變窺出；如很快停止取食花粉、停止哺育工作、停止清巢工作，以及提前出巢從事採集活動，並且只採蜜不採粉 (極少數例外) 等，伴隨著這些行為而導至營養的缺失和失衡 (缺乏蛋白質與其他重要物質的補充)。因此，被感染的工蜂之新陳代謝速率降低、壽命減短、抵抗力降低、易受次級感染及越冬能力下降等。但也有少數幸存者，在早春即成為疾病傳播者，而造成下一輪季節性病害的流行。

蜜蜂囊雛幼蟲病毒一離開活的蜜蜂體後，在幾天內很快喪失其感染力 (White, 1917)，尤其在乾熱的夏季，病毒迅速地失去活性，其感染力只能在蜂屍內保留 4 個星期 (何等人, 1997)，幼成蜂 (內勤蜂) 在移除罹病幼蟲時，最易接觸和獲得此病毒之感染。病毒會累積在工蜂下咽喉腺，於餵食中傳染至未感染的幼蟲。因此易以口服方式人為感染幼齡幼蜂，但這也不易用來解釋

蜜蜂囊雛幼蟲病毒的季節性傳播和擴散，如在夏末病毒常會自然地消失和在冬季時不見罹病幼蟲的事實 (Bailey, 1975; Bailey and Woods, 1977)。這也可能是內勤蜂能在幼蜂罹病初期很快地發現，並立即將其清除。的確，在自然環境中，蜜蜂囊雛幼蟲病通常僅在蜂群中零星地發生，即使嚴重發病的蜂群，在夏季往往會主動地明顯減輕。在夏季之初，蜂群群勢達到最大，而蜂王產卵數開始減少，幼蟲與成蜂之比逐漸下降，內勤蜂有足夠的數量清除病蟲。所以蜜蜂清潔行為可能是主要的關鍵。

蜜蜂囊雛幼蟲病通常不會造成嚴重的損失，然而養蜂人應學會辨識，才可避免將較嚴重的腐敗幼蟲病 (foulbrood diseases) 誤認成此病。總而言之，蜜蜂囊雛幼蟲病之發現及研究甚早，但至今仍留下許多不明的問題，譬如此病的傳播是由遺傳傳染 (經卵或附卵)？為何每年於一定的季節發病？此病毒在蜂群或蜂體內之潛伏位置？此病毒之世界各地的分離株是否在遺傳性狀上有否差異以及不同種類之蜂群所發現的分離株之差異為何？此等皆需要從基因組結構上著手，才能迎刃解決。

蜜蜂囊雛幼蟲病毒是第一個基因組被完全定序的蜜蜂病毒，其 RNA 基因組含有 8,832 個核苷酸 (nucleotides, nts)，比典型的哺乳類小 RNA 病毒 (約 7,500 nts) 為長，只含有一大的單一譯讀區 (open reading frame, ORF) (從 175 到 8,752)。從譯讀區內基因之排列序，蜜蜂囊雛幼蟲病毒與其他小 RNA 病毒成員類似，如構造型蛋白基因皆位在 5' 端，而非構造型蛋白基因皆位在 3' 端 (Ghosh *et al.*, 1999)。但從基因的相似度而言，蜜蜂囊雛幼蟲病毒還是與另二已知的昆蟲小 RNA 病毒：家蠶與透翅毒蛾軟化症病毒 (IFV 和 PnPV) 親緣關係較密切。而認為此三者昆蟲小 RNA 病毒應另成立一新屬 (Wu *et al.*, 2002)。西元 1981 年 Bailey 報導了從泰國的東方蜂 (*A. cerana indica*) 上分離到一株蜜蜂囊雛幼蟲病病毒株，與西方蜜蜂 (*A. mellifera*) 的囊雛幼蟲病病毒密切相關，但有其獨特性，稱之為蜜蜂囊雛幼蟲病病毒泰國毒株，Sacbrood (Thai strain: *Apis cerana*)，在病毒粒子的特性上與蜜蜂囊雛幼蟲病病毒並無差異，但其蛋白質組份與蜜蜂囊狀幼蟲病病毒不同 (ThaiV/SBV: 26, 28, 31/ 30, 34, 39 kDa)。其症狀與西方蜜蜂囊雛幼蟲病十分相近 (Bailey *et al.* 1982)。根據蜜蜂囊雛幼蟲病毒之完整序列，設計的引子對以 RT-PCR 方法增幅來自不同地理區 (歐洲：德國和奧地利，大英聯合王國，印度，尼泊爾，和南非) 的蜜蜂囊雛幼蟲病毒發現可區分成三基因群：歐洲群，遠東群，和南非群。歐洲群含中歐和英國亞群，遠東群以泰國株為代表包括印度和尼泊爾品系。來自南非有一株具高度歧異，而認為必有另一群存在，而西方蜜蜂顯然對泰國毒株有抗性 (Grabensteiner *et al.*, 2001)。

## 急性蜜蜂麻痺病毒 (acute bee-paralysis virus, ABPV) 及其他類蟋蟀麻痺病毒 (cricket paralysis-like virus, CrPV) 之蜜蜂病毒

1999 年世界病毒命名協會 (The international committee on taxonomy of viruses, ICTV) 將蟋蟀麻痺病毒 (CrPV) 作為模式種，另成立一新屬稱之類蟋蟀麻痺病毒屬 (*cricket paralysis-like viruses*)。此新屬之成員包括 CrPV、果蠅 C 病毒 (*Drosophila C virus*)、棕翅綠椿象腸病毒 (*Plautia stali intestine virus*, RSIV)、常蚜病毒 (*Rhopalosiphum padi virus*, RhPV)、斑飛蝨 P 病毒 (*Himetobi P virus*, HiPV) 與刺椿病毒 (*Triatoma virus*) (van Regenmortel *et al.*, 2000; 吳和王, 2001)。目前與 CrPV 基因組結構類似之蜜蜂小 RNA 病毒中，急性蜜蜂麻痺病 (Govan *et al.*, 2000)，黑蜂王台病毒 (BQCV) (Leat *et al.*, 2000) 及克什米爾蜜蜂病毒 (KBV) (Hung and Shimanuki, 2000) 皆應歸屬於類蟋蟀麻痺病毒屬。類蟋蟀麻痺病毒屬的病毒特性是直徑約 30 nm，20 面體構造，氯化鈉 (CsCl) 之浮力在 1.34-1.37 之間，沈降係數 (sedimentation coefficients) 在 153-167 S 之間，病毒粒子在 pH 3.0 穩定，基因組為單鏈正意股 RNA，基因組含 9-10 kb RNA，其 3'端是聚腺嘌呤 (polyadenylation)，5' 端具一小醣蛋白 (VPg)。與蜜蜂囊雛幼蟲病毒不同的是其基因組內具有兩個譯讀區(ORFs)，構造成蛋白基因位在 3'端而非位在 5'端。

急性蜜蜂麻痺病毒首於 1963 年在英國無明顯感染的蜂群被發現，雖然 Bailey *et al.* (1963) 指出會引起蜜蜂麻痺症狀有幾種不同病毒，但此病毒是他們鑑定和命名的第一個會引起成蜂麻痺症狀的類小 RNA 病毒，以與慢性蜜蜂麻痺病毒 (chronic bee-paralysis virus, CBPV) 區分。急性蜜蜂麻痺病毒亦在熊蜂 (bumble bees) 發現，是唯一能在自然狀況下改變宿主的蜜蜂病毒。急性蜜蜂麻痺病毒如同一些昆蟲 RNA 病毒之基因組結構不同於典型的哺乳類小 RNA 病毒，與杯狀病毒 (caliciviruses) 相類似。典型的哺乳類小 RNA 病毒與另三種昆蟲類小 RNA 病毒：蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (SBV)，家蠶與透翅毒蛾軟化症病毒 (IFV 和 PnPV) 之基因組結構皆是單裂單順反子基因組 (monopartite monocistronic genome)，但蟋蟀麻痺病毒與杯狀病毒之基因組結構皆是單裂雙順反子基因組 (monopartite bicistronic genome)，此病毒是不具被膜，正二十面體對稱無突起，病毒粒子直徑為 30 nm，具單鏈正意股含聚腺嘌呤 RNA 之基因組 [a single-stranded RNA genome with a poly(A) tail]。當時並未將此病毒與蜜蜂任何疾病或死亡相關聯 (Bailey *et al.*, 1963; Bailey, 1965; Anderson and Gibbs, 1988)，但急性蜜蜂麻痺病毒能引起自然界中蜜蜂的死亡 (Ball, 1985)。以人工接種 (注射) 的方式使之感染，接種蜜蜂在感染 2 至 4 天後才可見急性麻痺之初級症狀 (不能飛翔)，逐後 1 天內死亡，死亡前蜂體有震顫，腹部膨大的病徵。與感染慢性蜜蜂麻痺病毒者不同的是，後者之感染在病發後幾天內才死亡。然而目前被認為是由蜂蟹蟎 (*Varroa jacobsoni*) 媒介而感染，被寄生蜂群的成蜂及幼蜂皆會受感染並易發病而死。

目前已報導發現急性蜜蜂麻痺病的國家不多，只有：澳大利亞、法國、墨西哥、比利時、

英國、原蘇聯、德國、和中國有病例報導，台灣尚無此方面的資料，但是蜂蟹蟎的為害則時有所聞（何等人，1997），因此相信台灣必有急性蜜蜂麻痺病，只是尚無人參與此方面的研究而已。麻痺症狀發生在成蜂，養蜂業者是因罹病蜂呈現發抖，腳及翅懶散等的症狀而命名。成蜂有時會有局部脫毛，出現油亮黑光現象。此病感染是溫和的，但一發病則死亡率高。在加拿大和義大利之外表正常之蜂群被證實是受到 ABPV 病毒的亞致死量的感染，只是無明顯的病徵（Bailey, 1965）；相同地，在英國，澳洲，和法國地區的急性蜜蜂麻痺病病毒感染的蜜蜂之症狀亦不明顯（Bailey and Woods, 1977; Ball and Bailey, 1991）。一般在春季因氣溫回升，病毒粒子迅速增殖，會引起蜜蜂死亡，但越冬期蜂群則不易檢查出，可能氣溫太低，病毒粒子增殖緩慢，不易引起死亡；夏季溫度上升（35 °C）後，則又不見感染現象，因此病毒粒子的增殖及症狀的產生與飼育溫度有密切的相關性。病毒可在成蜂的許多組織中增殖，如在蜜蜂的脂肪體、腦部及咽下腺細胞的細胞質內增殖，但並不會引起明顯的傷害，倘若病毒粒子被釋出而進入血體腔，才會引發全身系統性感染而導至死亡。在自然界中，急性麻痺病毒可透過以下途徑傳播：（1）成蜂的下咽頭腺分泌物餵食；（2）被污染的花粉；（3）通過媒介蜂蟹蟎高效率的傳播。但前二者很難令蜜蜂獲得致死的劑量，現已發現蜂蟹蟎是該病毒的傳播媒介，急性蜜蜂麻痺病毒可在雌性蜂蟹蟎體內存活（Allen *et al.*, 1986），當蜂蟹蟎突破了成蜂的體壁，吸食成蜂的血淋巴時，會直接將病毒注入蜜蜂的血體腔，於是病毒可隨著血淋巴的流動傳播至體內各組織和器官，再則幼蟲受帶病毒蜂蟹蟎寄生後，病毒也可在幼蟲體內增殖（Ball, 1985）。因此防治上以治蜂蟹蟎為主，特別是在春季蜂群繁殖期，嚴格控制蜂蟹蟎危害蜂群，是為預防急性蜜蜂麻痺病之良策。

另與急性蜜蜂麻痺病毒同屬類蟋蟀麻痺病毒屬之二蜜蜂病毒：黑蜂王台病毒（BQCV）與克什米爾蜜蜂病毒（KBV），二者之物化及基因組特性與急性蜜蜂麻痺病毒相似，不再累述，僅從基本生物學上及其與蜜蜂關係作簡述。黑蜂王台病毒專一性感染王台中的幼蟲，Bailey and Woods (1977) 首次從王台內死亡的前蛹和蛹分離而得，病變後的王台變成黑色而得名。病蟲於前蛹其或蛹期死亡，形成一個類似於囊狀幼蟲病的堅韌的囊鞘，在育王群中發病率高（Laidlaw, 1979），與囊狀幼蟲病病毒相比，黑蜂王台病毒在成蜂和雄蜂體內不易增殖。此病毒在成蜂體內之增殖則與蜜蜂微粒子蟲（*Nosema apis*）有著密切關係，病毒需經由微粒子蟲在蜜蜂中腸所產生的傷口而入侵，微粒子蟲破壞了蜜蜂中腸上皮細胞，阻礙或防止蜜蜂防禦因子的產生，病毒得而從中腸上皮細胞入侵體內並增殖之，二病原體感染蜜蜂之高峰期皆在春季和夏初（Bailey *et al.*, 1983）。此病毒之基因組的完整序列已解出，含有聚腺嘌呤的 8,550 核苷酸，具二大譯讀區，5'端之 4,968 核苷酸與 3'端之 2,562 核苷酸的中間夾有一 208 核苷酸的基因間區（intergenic region），5'端的不轉譯區（untranslated region）有 657 核苷酸而 3'端則有 155 核苷酸。相同地，5'端轉譯出非構造性蛋白而 3'端轉譯出構造性蛋白（Leat *et al.*, 2000）。

蜜蜂之另一種類蟋蟀麻痺病毒屬的病原體即是克什米爾蜜蜂病毒（KBV），克什米爾蜜蜂病

毒首次在亞洲蜂 (Asian honey bee, *A. cerana*) 被發現，被認為是源自亞洲的病毒 (Bailey and Woods, 1977)。經進一步調查其變種在世界各地義大利蜂亦有發現，包括加拿大，印度，西班牙，澳洲，紐西蘭，斐濟，和美國等地 (Anderson and Gibbs, 1988; Anderson, 1990; Allen and Ball, 1995; Hung *et al.*, 1995)。克什米爾蜜蜂病毒之基因組含有 9.5-10.5 kb，其他特性如類蟋蟀麻痺病毒屬的成員 (Allen and Ball, 1995; Stoltz *et al.*, 1995)，利用 RNA 依 RNA 聚合酶基因 (*RNA-dependent RNA polymerase*) 之序列，以比較其與類蟋蟀麻痺病毒屬的其他成員關係，發現來自澳洲與美洲之克什米爾蜜蜂病毒間只有 5% 的差異，與克什米爾蜜蜂病毒最近的類蟋蟀麻痺病毒是果蠅 C 病毒，但也只有 50% 相似度，而黑蜂王台病毒則與棕翅綠椿象腸病毒 (RSIV)，斑飛蝨 P 病毒 (HiPV) 同群，此結果在解螺旋酶基因 (*Helicase*) 上亦證實。雖然如此，克什米爾蜜蜂病毒對蜜蜂健康的影響未明確 (Evan and Hung, 2000)，此項結果亦說明了蜜蜂小 RNA 病毒的起源是多元性，並非來自相同的始祖。

## 台灣蜜蜂小 RNA 病毒之研究

台灣蜜蜂小 RNA 病毒之研究報導如前所述，幾乎闕如，事實上蜜蜂小 RNA 病毒病在養蜂場皆有零星的發生，何況蜜蜂微粒子蟲病和蜂蟹蟎的為害是養蜂人員常需注意的病害 (何等，1977)。至少與此二病原體相關之類蟋蟀麻痺病毒：急性蜜蜂麻痺病毒和黑蜂王台病毒理應存在台灣蜜蜂族群中。茲將本實驗室利用聚合酶鏈反應 (PCR) 檢測台灣大學蜜蜂族群之初步結果敘述如下：

罹病蜜蜂幼蟲收集自國立台灣大學昆蟲學系養蜂場，將病蟲體組織研磨，萃取全部 RNA (total RNA)，所採用的方法是利用商品化試劑組 TRIzol reagent (GibcoBRL) 的套組，萃取的 RNA 以異丙醇 (isopropanol) 沉澱，沉澱物再以 70% 酒精清洗兩次，置於無菌操作台將酒精風乾之後，溶於 DEPC 處理過的無菌水中，並且保存於 -20°C。RT-PCR 反應係採用商品化試劑組 SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates (GIBCO BRL)，先在 50°C 進行反轉錄作用 30 分鐘，隨後以 94°C 加熱 2 分鐘，再進行下列步驟 40 個循環：94°C 變性 (denaturation) 30 秒，55°C 黏合 (annealing) 30 秒，68°C 延伸 (extension) 1 分鐘，最後在 68°C 下進行 7 分鐘的最後延伸 (final extension)。反應完畢後，各取 10 µl 反應之產物以 1% 之瓊脂凝膠電泳分析結果。本實驗所用的蜜蜂小 RNA 病毒專一性引子對共有 3 組，是根據國外期刊已發表之引子，其序列如下：檢測蜜蜂囊雛幼蟲病毒的引子對為 SB1f: 5'- AACAA CCGAT TCCTC AGTAG -3'/ SB1r: 5'- CCTTG GAACT CTGCT GTGTA -3' (Grabensteiner *et al.*, 2001)，可增幅出 487 bp 的正反應產物；檢測急性蜜蜂麻痺病毒 (ABPV) 的引子對為 ABPV1: 5'- TTATG TGTCC AGAGA CTGTA TCCA -3'/ABPV2: 5'- GCTCC TATTG CTCGG TTTT CGGT -3' (Benjeddou *et al.*, 2001)，可增幅出 900 bp 的正反應產物；檢測黑蜂王台病毒的引子對為 BQCV1: 5'- TGGTC AGCTC CCACT ACCTT

AAAC-3'/BQCV2: 5'-GCAAC AAGAA GAAAC GTAAA CCAC -3' (Benjeddou *et al.*, 2001), 可增幅出 700 bp 的正反應產物。將 RT-PCR 反應產物與質體 (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, Promega) 於 4°C 下進行接合反應 (ligation), 再將重組之質體送入 *E. coli* 中。其後挑選出白色菌落, 並經增殖後, 進行核酸序列解讀與分析。定序時則使用質體上已知序列 M13 Universal primer 5'-GTTTT CCCAG TCACG AC- 3'/ 5'-CAGGA AACAG CTATG AC -3' 作為引子。結果簡述如下:

剛孵化的蜜蜂幼蟲即移出巢房外, 以人工方式飼養, 發育至末齡即將化蛹之際, 發生大量死亡, 得病幼蟲死亡後體色逐漸變深, 可大略區分成白色、棕色和深棕色。死蟲體壁完整, 但略顯腫脹, 無臭味發出 (圖一)。此外, 在棕色和深棕色死蟲之體表呈現有白色顆粒狀斑點出現 (圖二)。

利用 RT-PCR 檢測病死幼蟲之初步結果發現, 病死幼蟲甲為混合感染蜜蜂囊雛幼蟲病毒與黑蜂王台病毒 (BQCV); 而病死幼蟲乙為單獨感染蜜蜂囊雛幼蟲病毒 (圖三)。RT-PCR 反應產物經定序後確定分別與蜜蜂囊雛幼蟲病毒、黑蜂王台病毒之核酸序列相符, 換言之, 本實驗證實台灣大學實驗蜂群中有此二病毒之感染。

## 結 論

根據 RNA 依 RNA 聚合酶 (*RNA-dependent-RNA polymerase*) 之胺基酸的相似度, 蜜蜂病毒 (蜜蜂囊雛幼蟲病毒、急性蜜蜂麻痺病、黑蜂王台病毒和克什米爾蜜蜂病毒) 間並不高於蜜蜂囊雛幼蟲病毒與植物之病毒間之相似度, 表示蜜蜂病毒是多元演化。蜜蜂囊雛幼蟲病毒與家蠶軟化症病毒 (IFV) 及透翅毒蛾軟化症病毒 (PnPV) 之相似度則相對較高, 且二者基因組內的基因排列與其他來自哺乳類的小 RNA 病毒類似, 組成 sacbrood-IFV-PnPV 群, 然而此群之基因組內基因的排列與蟋蟀麻痺病毒 (CrPV) 群不同, CrPV 群包括了果蠅 C 病毒、常蚜病毒、班飛蝨 P 病毒、棕翅綠椿象腸病毒及刺椿病毒外, 還包括三種蜜蜂病毒 (急性蜜蜂麻痺病、黑蜂王台病毒和克什米爾蜜蜂病毒) (Evans and Hung, 2000; 吳和王, 2001; Wu *et al.*, 2002)。蜜蜂病毒親緣關係之多元, 在研究和防治蜜蜂病毒給我們兩個主要啓示: (1) 對特定蜜蜂病毒之防治策略必然可從近緣種病毒資料中獲益。譬如師法家蠶軟化症病毒之防治策略, 用於蜜蜂囊雛幼蟲病毒的防治。再則蟋蟀麻痺症病毒 (CrPV) 與果蠅 C 病毒之資料, 可用於急性蜜蜂麻痺病、黑蜂王台病毒和克什米爾蜜蜂病毒的研究和防治之參考。(2) 蜜蜂囊雛幼蟲病毒與蜜蜂病毒亦或蜜蜂病毒間之遺傳間距大, 可視為發展以序列為基礎之病毒檢測的挑戰。設計能檢測多種蜜蜂病毒的通用引子對 (primer set) 並不困難, 但一大前題則是須先要有充分的各種蜜蜂病毒的基因組序列資料 (Evans and Hung, 2000)。台灣養蜂事業已有相當長的歷史, 但對蜜蜂病原體, 尤其病毒病的研究相當匱乏, 雖然這些病毒病對養蜂事業並不會造成立即性嚴重衝擊, 但若精緻農業欲永續發展, 無帶原

之養蜂事業及優良品系之育種 (育王)，需要有更良好的學術背景才能提昇台灣養蜂事業。今時值在台灣教育養蜂不倦，樹養蜂人員無數的何老師鎧光退休之際，感受師恩，特書此篇以為後學者參閱。

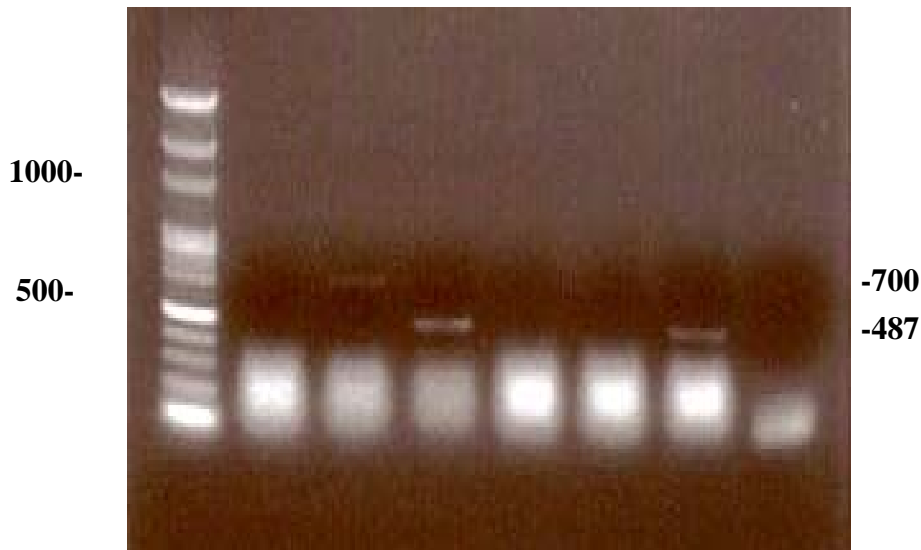


圖一、呈現囊雛幼蟲病之蜜蜂幼蟲



圖二、死蟲體表呈現有白色顆粒狀斑點

1 2 3 4 5 6 7 8



圖三、利用 RT-PCR 檢測蜜蜂病死幼蟲之結果。Lane 1: 100 bp Ladder DNA Marker ; Lane 2: 以急性蜜蜂痲痺病毒專一性引子對 (ABPV1/ ABPV2) 檢測病死幼蟲甲 ; Lane 3: 以黑蜂王台病毒專一性引子對 (BQCV1/ BQCV2) 檢測病死幼蟲甲 ; Lane 4: 以蜜蜂囊雛幼蟲病毒專一性引子對 (SB1f/ SB1r) 檢測病死幼蟲甲 ; Lane 5: 以急性蜜蜂痲痺病毒專一性引子對 (ABPV1/ ABPV2) 檢測病死幼蟲乙 ; Lane 6: 以黑蜂王台病毒專一性引子對 (BQCV1/ BQCV2) 檢測病死幼蟲乙 ; Lane 7: 以蜜蜂囊雛幼蟲病毒專一性引子對 (SB1f/ SB1r) 檢測病死幼蟲乙 ; Lane 8: 負對照組。

## 引用文獻

- 吳治宇、王重雄。2001。昆蟲小 RNA 病毒研究之進展。跨世紀台灣昆蟲學研究之進展研討會專刊 131-141 頁。國立自然科學博物館印。
- 安奎、何鑑光。1997。養蜂學。華香園出版社。台北市。
- 王建鼎、梁勤、蘇榮。1997。蜜蜂保護學。中國農業。北京。
- Allen, M. F., and B. V. Ball.** 1995. Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Ann. Appl. Biol.* 126: 471-484.
- Allen, M. F., B. V. Ball, R. F. White, and J. F. Antoniw.** 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J. Apic. Res.* 25: 100-105.
- Anderson, D.L., and A. J. Gibbs.** 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera Linnaeus*) in Australia. *J. Gen. Virol.* 69: 1617-1625.
- Anderson, D. L.** 1990. Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) in Fiji. *J. Apicult. Res.* 29: 53-59.
- Bailey, L.** 1965. The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 167-169.
- Bailey, L.** 1975. Recent research on honey bee viruses. *Bee World* 56: 55-64.
- Bailey, L., and R. D. Woods.** 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.* 25: 175-186.
- Bailey, L., and R. D. Woods.** 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* 37: 175-182.
- Bailey, L., and B. V. Ball.** 1991. Honey bee pathology. 2nd ed. Academic Press, London.
- Bailey, L., A. J. Gibbs, and R. D. Woods.** 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera L.*). *Virology* 21: 390-395.
- Bailey, L., J. M. Carpenter, and R. D. Woods.** 1982. A strain of sacbrood virus from *Apis cerana*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 264-265.
- Bailey, L., B. V. Ball, and J. N. Perry.** 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 103: 13-20.
- Ball, B. V.** 1985. Acute paralysis virus isolations from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J. Apicult. Res.* 24: 115-119.
- Ball, B., and L. Bailey.** 1991. Viruses of honey bees. pp. 525-551. *In* : J. R. Adams, and J. R. Bonami, eds. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton.
- Benjeddou, M., N. Leat, M. Allsopp, and S. Davison.** 2001. Detection of acute bee paralysis

- virus and black queen cell virus from honeybee by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67(5): 2384-2387.
- Dall, D. J.** 1987. Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 49: 279-290.
- Evans, J. D., and A. C. Hung.** 2000. Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses. *Arch. Virol.* 145: 2015-2026.
- Ghosh, R. C., B. V. Ball, M. M. Willcocks, and M. J. Carter.** 1999. The complete nucleotide sequence of honeybee sacbrood virus. *J. Gen. Virol.* 80: 1541-1549.
- Govan, V. A., N. Leat, M. Allsopp, and S. Davison.** 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology* 277(2): 457-463.
- Grabensteiner, E., W. Ritter, M. J. Carter, S. Davison, H. Pechhacker, J. Kolodziejek, O. Boecking, I. Derakhshifar, R. Moosbeckhofer, E. Licek, and N. Nowotny.** 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8(1): 93-104.
- Hung, A. C. F., and H. Shimanuki.** Nucleotide sequence and restriction site analysis in three isolates of Kashmir bee virus from *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 102: 178-182.
- Hung, A. C. F., J. R. Adams, and H. Shimanuki.** 1995. Bee parasitic mite syndrome (II): The role of *Varroa* mite and viruses. *Am. Bee J.* 135: 702-704.
- Laidlaw, H. H. 1979. *Contemporary Queen Rearing*. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois.
- Leat, N., B. Ball, V. Govan, and S. Davison.** 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* 81: 2111-2119.
- Lee, P. E., and B. Furgala.** 1965. Sacbrood virus: some morphological features and nucleic acid type. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 502-505.
- Lee, P. E., and B. Furgala.** 1967. Electron microscopic observations on the localization and development of sacbrood virus. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 178-187.
- Liljas, L., J. Tate, T. Lin, P. Christian, and J. E. Johnson.** 2002. Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picor-like viruses. *Arch. Virol.* 147(1): 59-84.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers.** 1995. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. pp. 526-527. *In: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus,*

*Arch. Virol. Suppl.* 10. Springer-Verlag, Wien New York.

**Steinhaus, E. A.** 1947. *Insect Microbiology*. Comstock Publishing Company Inc. Press, Ithaca, New York.

**Stoltz, D., X. R. Shen, C. Boggis, and G. Sisson.** 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apicult. Res.* 34: 153-160.

**Tanada, Y., and H. K. Kaya.** 1993. Other RNA-viral infections. pp. 296-310. *In* : *Insect pathology*. Academic Press, San Diego.

**Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. Mcgeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wichner.** 2000. Virus taxonomy. pp.1065-1069. *In*: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.

**White, G. F.** 1917. Sacbrood. U. S. Dep. Agric. Bull. 431: 1-55.

**Wu, C. Y., C. F. Lo, C. J. Huang, H. T. Yu, and C. H. Wang.** 2002. The complete genome sequence of *Perina nuda* picorna-like virus, an insect-infecting RNA virus with a genome organization similar to that of the mammalian picornaviruses. *Virology* 294: 312-323.

# Honeybee Picorna-like Virus in Taiwan

Chih-Yu Wu, Ying-Yu Chen, Jing-Hao Jiang, and Chung-Hsiung Wang\*

Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.

## ABSTRACT

More than 16 viral isolates derived from honeybee were recognized as picorna-like viruses. By the development of biotechnology, the sequences of the complete genomic RNAs of 4 bee picorna-like viruses have been carried out and confirmed their taxonomic positions. The gene organization of sacbrood bee virus (SBV) is similar to those of typical mammalian picornaviruses and other two insect picorna-like viruses (IFV and PnPV). While a very low identity in the gene sequences among insect picorna-like viruses and mammalian picornaviruses is found, therefore these three insect picorna-like viruses should be a new group-insect picornavirus. The other two bee picorna-like viruses, acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV), and Kashmir bee virus (KBV) have a similar gene organization to cricket paralysis virus (CrPV), they are the member of genus *cricket paralysis virus*. Although we have no research information of bee picorna-like viruses in Taiwan, we had confirmed that SBV and BQCV occur in Taiwan bee population in our preliminary study. However it need to study this subject in the future.

**Key words:** honey bee picorna-like virus, SBV, ABPV, BQCV, KBV.