



张铭, 罗丽林, 张丽娜, 刘曼, 侯春生. 贵州越夏期与越冬期中华蜜蜂病毒病发生的调查 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 376–380.

贵州越夏期与越冬期中华蜜蜂病毒病发生的调查

张铭^{1,2}, 罗丽林³, 张丽娜^{1,2}, 刘曼^{3*}, 侯春生^{1,2*}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100193; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 贵州省生物研究所, 贵阳 550009)

摘要: 蜜蜂是重要的传粉昆虫, 在农业生产和生态平衡中起着重大作用。近年来蜜蜂数量大幅下降, 由于农药使用、生态污染、气候变化等原因, 以及受到天敌如胡蜂 *Vespidae* 的影响, 更重要的是受到病原如真菌、细菌以及各种病毒的危害。其中蜜蜂病毒病是造成蜜蜂数量减少的重要原因之一。为了调查贵州省越夏期和越冬期中华蜜蜂感染病毒病的情况, 利用 RT-PCR 技术对贵州省兴义市、息烽县、台江县、龙里县采集的样本进行检测。结果显示: 贵州省越夏期以红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 病毒 *Sindbis virus* (SINV) 为主要流行病毒, 而越冬期以囊状幼虫病毒 *Sacbrood virus* (SBV) 和黑蜂王台病毒 *Black queen cell virus* (BQCV) 为主要流行病毒。本研究初步调查了贵州省主要中蜂饲养区在两个重要饲养阶段发生蜜蜂病毒病情况, 这将在一定程度上为防治蜜蜂病毒病提供理论依据。

关键词: 蜜蜂病毒病; 红火蚁病毒; 黑蜂王台病毒; 囊状幼虫病毒; 越夏与越冬期

中图分类号: Q968.3; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0376-05

Investigation on the occurrence of honey bee viruses of *Apis cerana cerana* during the over-summer and-winter in Guizhou Province

ZHANG Ming^{1,2}, LUO Li-Lin³, ZHANG Li-Na^{1,2}, LIU Man^{3*}, HOU Chun-Sheng^{1,2*} (1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Guizhou Institute of Biology, Guiyang 550009, China)

Abstract: Honey bees are one of important pollination insects, which play a vital role in agricultural production and ecological balance. In recent years, however, the number of honey bee colonies has sharply fallen due to the use of pesticide, environmental pollution, climate change and other factors such as natural enemies of honey bees, wasps. However, pathogens were considered as the key factors contributing to this decline. Among these pathogens, honey bee viruses were one of the important factors for the decrease of honey bee population. To study the occurrence of honey bee viruses during the over-summer and-winter in Guizhou Province, we used RT-PCR to detect honey bee samples collected from Xingyi City, Xifeng County, Taijiang County, and Longli County of Guizhou Province. Our results showed that *Sindbis virus* (SINV) was the dominant virus during the over-summer, while *Sacbrood virus* (SBV) and *Black queen cell virus* (BQCV) were the major prevalent viruses during the over-winter in Guizhou. This study investigated the occurrence of honey bee viruses in Guizhou, and provided evidence for the prevention and control of honey bee virus in different seasons based on the management in practice.

Key words: Honey bee virus; SINV; BQCV; SBV; over-summering and-wintering

基金项目: 国家自然科学基金 (31811530276); 贵州省科技支撑项目“中华蜜蜂病虫害绿色防控关键技术研究”与黔科合支撑 (2019-2292)

作者简介: 张铭, 女, 1998年生, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂病毒研究工作, E-mail: zhang9890ysl@163.com

* 共同通讯作者 Author for correspondence: 侯春生, 男, 博士, 研究员, 研究方向为蜜蜂病毒、蜜蜂病原及微生物, E-mail: houchunsheng

@caas.cn; 刘曼, 女, 副研究员, 研究方向为蜜蜂病毒, E-mail: freemyself516@hotmail.com

收稿日期 Received: 2021-03-25; 接受日期 Accepted: 2021-06-08

蜜蜂作为重要的传粉昆虫,主要是通过授粉来提高和维持农业生产力与生物多样性 (Forgách *et al.*, 2008; Abrol, 2012; Hou *et al.*, 2020)。由于其在不同生长阶段受到不同程度的环境压力如水污染、大气污染,农药如新烟碱、吡虫啉等危害,导致近年来蜜蜂数量大幅下降 (Ivana *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018),同时面临多种如胡蜂、大蜡螟 *Galleria mellonella*、蚂蚁等虫害的威胁,但病原如真菌、细菌与病毒是最主要原因 (Yadav *et al.*, 2017)。其中蜜蜂病毒病是造成蜜蜂数量减少的最重要原因之一 (Wu *et al.*, 2014)。大部分蜜蜂病毒属于小核糖核酸病毒家族的一类小 RNA 病毒 (Yuan *et al.*, 2017),目前发现的蜜蜂病毒约有 30 种 (Gisder and Genersch, 2015)。然而,并非所有病毒感染后都会出现明显感染症状,只有少数病毒如蜜蜂残翅病毒和囊状幼虫病毒感染后会出现典型的发病症状,大多数蜜蜂感染病毒后除了行动迟缓无明显症状出现 (Vesna *et al.*, 2018)。

贵州省处于中国西南内陆地区腹地,属于亚热带湿润季风气候,具有充足的蜜粉源,尤其适合我国特有蜂种—中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的养殖。近十年由于各种蜜蜂病毒病的感染及与其它病原的混合感染,导致出现爬蜂和蜂群下降或死亡现象,使蜜蜂群势大幅下降。在蜂群四季管理中,越夏期和越冬期对蜜蜂的生存与发展具有重要意义,尤其是越夏期除了高温,还是蜜蜂天敌、巢虫以及各种病毒流行与传播的高发季节,同时还存在着蜂王产卵减少的现象 (Liang, 2014)。而越冬期,由于温度较低花粉储存不充足,如有病毒病的存在将使蜜蜂难以越冬或越冬后蜂群数量不足 (Qiu, 2019)。因此,为了更好的了解贵州省越夏期和越冬期的蜜蜂病毒病发生情况,本研究调查了 2019 年 6 月至 8 月、2019 年 11 月至 2020 年 1 月为期 6 个月的蜜蜂病毒病的感染情况,以期对蜜蜂病毒病的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 中华蜜蜂样本采集

实验所用蜜蜂采集自 2019 年 6 月至 8 月、2019 年 11 月至 2020 年 1 月,采样地点位于贵州省兴义市、息烽县、台江县、龙里县。每个采样点采集 20~30 头蜜蜂置于密封袋内带回,液氮速

冻后置于 -80°C 冰箱长期保存直至用于检测。

1.1.2 试剂与仪器

Trizol 购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒 Goscript reverse transcription system 购自普洛麦格 (Promega, Madison, WI, USA) 公司,聚合酶 $2 \times$ Es Taq MasterMix 购自康为世纪生物科技 (CW Biotech) 公司,其它化学试剂均为国产分析纯级试剂,引物合成在博迈德 (Biomed) 进行,离心机 Centrifuge 5417R 购自 Eppendorf,电热恒温水浴锅 DK-2000-III LA 购自天津市泰新特仪器有限公司,电泳仪 JY300HE 购自君意电泳有限公司,凝胶成像系统 FR200A 购自复日科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

取 2~3 头蜜蜂,于研钵中加液氮研磨成粉末后取约 0.05 g 加入含 1 mL 细胞裂解液和 10 μL 蛋白酶 K 的 1.5 mL 离心管中, 65°C 水浴加热 30 min,不断摇匀,12 000 rpm 离心 5 min,取上清液,然后加入等体积酚、氯仿、异戊醇混合物 (25:24:1) 混匀,12 000 rpm 离心 5 min,取上清液,加入等体积氯仿混匀,12 000 rpm 离心 5 min,取上清液,加入 2 倍体积乙醇或 1 倍体积异丙醇,于室温下放置 2 min,12 000 rpm 离心 10 min,弃掉上清液,加入 1 mL 75% 乙醇洗涤 1 次,12 000 rpm 离心 5 min,弃掉上清液,蒸发酒精,而后加入 30~50 μL ddH₂O 溶解, 55°C 水浴 10 min,得到总 DNA,测定浓度后用于后续试验。

1.2.2 RNA 提取

取 2~3 头蜜蜂,于研钵中加液氮研磨成粉末后取约 0.05 g 加入含 1 mL Trizol 溶液的 1.5 mL 离心管中,静置 5 min,在 4°C 条件下 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液,加入 200 μL 氯仿,混匀,于室温下静置 2~3 min,12 000 rpm 离心 15 min,取上清液,加入 500 μL 异丙醇,混匀,于室温下静置 10 min,在 4°C 条件下 12 000 rpm 离心 10 min,弃掉上清液,加入 1 mL 75% 乙醇,振荡,在 4°C 条件下 7 500 rpm 离心 5 min,弃掉上清液,干燥 5~10 min,加入 20~50 μL ddH₂O 溶解,得到总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 扩增

将所得 DNA 进行扩增,反应体系如下:模板 DNA 1 μL ,上、下游引物各 1 μL (表 1), $2 \times$ Es Taq MasterMix 10 μL ,无菌水 7 μL 。反应条件为 94°C 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s,

30 ~ 33 个循环, 72°C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 mg/mL 溴化乙锭) 检测鉴定。

将所得总 RNA 测定浓度后取 4 μ g 用 Goscript reverse transcription system 反转录试剂盒合成第一链 cDNA, 所有实验步骤均按说明书要求进行操作。cDNA 扩增反应体系与 DNA 扩增反应体系和

反应条件相同, 所需引物如表 2 所示, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 mg/mL 溴化乙锭) 检测鉴定。

1.3 数据分析

使用 Simca 14.1 软件 (Pomerantsev *et al.*, 2014) 绘制 Principal Component Analysis (PCA) 主成分分析图对实验结果进行分析。

表 1 本实验检测蜜蜂丝状病毒所用引物序列

Table 1 Sequence of primers used for AmFV detection

引物名称 Abbreviation	引物序列 Primer sequence (5'-3')	长度 (bp) Length
AmFV (<i>Apis mellifera Filamentous Virus</i>)	F: CAGAGAATTCGGTTTTTGTGAGTG R: CATGGTGGCCAAGTCTTGCT	550

表 2 本实验检测 RNA 病毒所用引物序列

Table 2 Sequence of primers used for RNA virus detection

引物名称 Abbreviation	引物序列 Primer sequence (5'-3')	长度 (bp) Length
IAPV (<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>)	F: AGACACCAATCACGGACCTCAC R: AGATTTGTCTGTCTCCCAGTGACAT	475
SBV (<i>Sacbrood Virus</i>)	F: ATATACGGTGGGAACTGC R: CTCGGTAATAACGCCACTGT	879
DWV (<i>Deformed Wing Virus</i>)	F: GACTGAACCAAATCCGATGTC R: TCTCAAGTTCGGGACGCATT	376
VDV (<i>Varroa Destructor Virus</i>)	F: TGGCTAATCGACGTAAAGCA R: ACTAATCTCTGAGCCAACACGT	200
CBPV (<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>)	F: TCAGACACCGAATCTGATTATG R: ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG	560
CSBV (<i>Chinese Sacbrood Virus</i>)	F: CCTGGGAAGTTTGCTAGTATTTACG R: CCTATCACATCCATCTGGGTCAG	161
BQCV (<i>Black Queen Cell Virus</i>)	F: TGGTCAGCTCCCACTACCTFAAAC R: GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	700
KV (<i>Kakugo Virus</i>)	F: GATATGACTGTATCCTCCATAGCATCTC R: GTATGAAACATATGGCACCTCAAAAGTA	396
LSV (<i>Lake Sinai virus</i>)	F: TGTAACACGACGGCCAGTGCCWCGRYTGYTRGTDCCYCC R: CAGGAAACAGCTATGACCGAVGTGGNGGNCNAGATARAGT	577
SINV (<i>Sindbis Virus</i>)	F: CAATAGGCACCAACGTATATAGTAGAGATTGGA R: GGAATGGGTCATCATATAGAAGAATTG	253
ALPV (<i>Aphid Lethal Paralysis Virus</i>)	F: GCGTACCATACTACTCACCATATTTATTTA R: AGTTAATCCATAAAGTGCAATCTACAATAC	140
SBPV (<i>Slow Bee Paralysis Virus</i>)	F: GAGATGGATMGRCCCTGAAGG R: CATGAGCCCAKGARTGTGAA	915

2 结果与分析

2.1 越夏期蜜蜂病毒感染情况

为确定该月份主要流行的病原, 通过 Simca 14.1 进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)。不同月份相对接近的位置显示不同病毒, 相对位置越近代表相关性越强, 则该病毒在该月份的传播性越广 (图 1)。对贵州省越夏期 6 月、7 月、8 月的检测发现, 6 月份和 7 月份以 SINV 病毒流行最广, 8 月份则以 AmFV 病毒进行小范围流行。其中 6 月份感染病毒种类最多为 7 种, 而 7 月份和 8 月份只感染两种病毒。因此, 贵州省越夏期以 SINV 为主要流行病毒且以 6 月份为病毒的高发季。

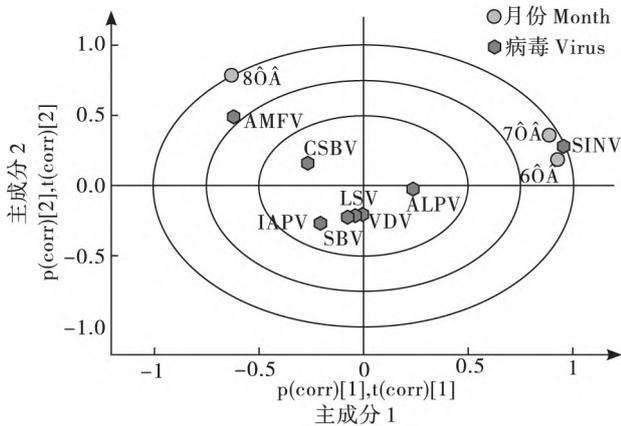


图 1 越夏期蜜蜂病毒感染情况

Fig. 1 Occurrence of bee viruses during over-summering
注: 横纵坐标分别代表第一、第二主成分, 其中第一、二主成分为 7 月和 8 月。Note: X and Y axis represented the first and second principal component respectively, and the first and second principal component were July and August.

2.2 越冬期蜜蜂病毒感染情况

对贵州省越冬期 11 月、12 月及次年 1 月病毒检测发现, 这 3 个月份皆以 BQCV 和 SBV 为主要流行病毒 (图 2)。不同于越夏期, 越冬期每个月蜜蜂感染病毒种类均在 5 ~ 8 种。因此, 越冬期不仅以 SBV 和 BQCV 为大范围主要流行病毒, 而且其它病毒也可能在蜂群中进行小范围传播。

2.3 混合感染情况

相较于其他多重感染, 不管是越夏期还是越冬期, 二重感染的频率都是最高的 (图 3)。虽然越夏期出现二重和三重感染的频率明显低于越冬期, 但是越夏期出现三重、四重甚至五重感染的频率较平均, 而越冬期的混合感染频率随着感染

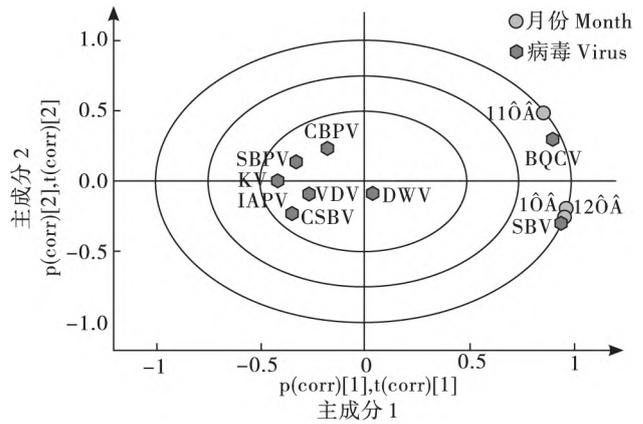


图 2 越冬期蜜蜂病毒感染情况

Fig. 2 Occurrence of bee viruses during the over-wintering
注: 横纵坐标分别代表第一、第二主成分, 其中第一、二主成分为 11 月和 12 月。Note: X and Y axis represented the first and second principal component respectively, and the first and second principal component were November and December.

重数的增加而下降。值得关注的是, 在越夏期 6 月份经常出现的 LSV 和 VDV, 二者常与其它病毒混合感染, 它们单独出现在混合感染中的频率分别为 50% 和 42.9%, 二者结合出现在混合感染中的频率为 35.7%。

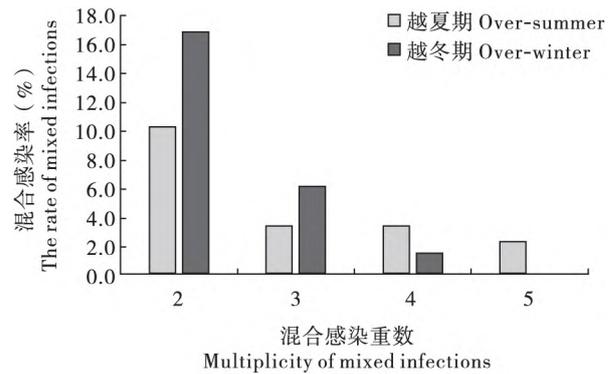


图 3 越夏期和越冬期混合感染率

Fig. 3 Mixed infection during the over-summer and over-wintering

注: 横轴表示混合感染的重数, 纵轴表示混合感染率。Note: X axis represented the multiplicity of mixed infections, and Y axis represented the rate of mixed infections.

3 结论与讨论

贵州省气候适宜, 地形多样, 具有充足的蜜粉源植物, 为贵州养蜂业提供了巨大的发展空间, 而其养蜂业的发展最早可追溯至 1 000 多年前, 自唐代一直至清代, 贵州蜡染一直是历代的主要贡

品。然而这样一个具有悠久养蜂历史的大省近年来也被各种蜜蜂病原所困扰,尤其是蜜蜂病毒的高发。根据对贵州省息烽县、台江县、龙里县、兴义市的检测结果显示,越夏期以 SINV 为主要流行病毒,尤以 6 月份为病毒主要传播月份;越冬期以 SBV 和 BQCV 为主要传播病毒,且各类病毒似乎将越冬期作为它们的潜伏期。同时,越夏期和越冬期蜂群都存在着不同程度的混合感染,虽然越夏期出现了二重、三重、四重甚至五重混合感染,但是混合感染的频率在总体上要低于越冬期。

值得注意的是,越夏期流行病毒 SINV、ALPV 在越冬期并未被检测出,而最普遍感染且需被重点关注的曾在 1974 年大范围爆发引起蜂群崩溃的 SBV 在越夏期的检测率仅为 7.35% (Ma *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2017)。BQCV 也未在越夏期出现,而 BQCV 的出现和传播常与微孢子虫 *Microsporidia* 有关 (Bailey *et al.*, 1983), 所以是否 SINV、SBV、ALPV、BQCV 与微孢子虫的传播或潜伏有关,还是与贵州省当地的气候变化或地理环境有关,此问题还需进一步调查。另外,广泛流行的 DWV 也仅在越冬期出现,且出现频率不高。狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 是传播 DWV 的媒介, DWV 一般是以隐性感染存在于蜂群中,染螨率较低的蜂群中 DWV 的病毒量也较低,而一旦蜂群的瓦螨载量较高,即使通过人为治螨等手段也抑制不住 DWV 的滴度持续上升 (Francis *et al.*, 2013), 狄斯瓦螨可以促进 DWV 的复制与传播,同时也会降低它的毒株多样性,使得优势毒株在蜂群内越来越逐渐普遍,导致蜂群崩溃的几率大大增加 (Martin *et al.*, 2012), 在此次检测的贵州蜂样中, DWV 的感染频率较低,可能与贵州当地的温度和湿度有关,或许还有其它原因,此问题还需进行后续试验来佐证。本研究首次报道了贵州省不同季节蜜蜂病毒的发生情况,在一定程度上为贵州省蜜蜂主要病毒病的防治提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Abrol DP. Value of Bee Pollination [M]. *Pollination Biology*, 2012: 185–222.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee [J]. *Annals of Applied Biology*, 1983, 103 (1): 13–20.
- Forgách P, Bakonyi T, Tapasztó Z, *et al.* Prevalence of pathogenic bee viruses in hungarian apiaries: Situation before joining the European Union [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98 (2): 235–238.
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (3): e57540.
- Gisder S, Genersch E. Special issue: Honey bee viruses [J]. *Viruses*, 2015, 7 (10): 5603–5608.
- Hou MS, Cheng XF, Qiu YM, *et al.* Effects of imidacloprid on immune detoxification-related gene expression and immune detoxification enzymes activity in nurse bees of *Apis mellifera ligustica* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 6: 1415–1423. [侯梦赏,程雪芬,邱园妹,等. 吡虫啉胁迫对意大利蜜蜂哺育蜂免疫解毒相关基因表达及酶活性的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 6: 1415–1423]
- Ivana TG, Jolanta K, Tamás B, *et al.* Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: A case study from Croatia [J]. *Apidologie*, 2014, 45 (6): 701–706.
- Liang LY. Cause and strategy for honey bee colony decline in summer in north of China [J]. *Apiculture of China*, 2014, 65 (9): 23–25. [梁丽英. 华北地区夏季蜂群下降原因及对策 [J]. 中国蜂业, 2014, 65 (9): 23–25]
- Ma XT, Zhao WZ, Deng WX, *et al.* Survey of honeybee viruses in honeybee *Apis cerana cerana* in Guizhou Province [J]. *Journal of Bee*, 2015, 35 (2): 11–13. [马啸天,赵文正,邓位喜,等. 贵州省中华蜜蜂病毒病感染状况调查 [J]. 蜜蜂杂志, 2015, 35 (2): 11–13]
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, *et al.* Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite [J]. *Science*, 2012, 336 (6086): 1304–1306.
- Pomerantsev AL, Rodionova OY. Concept and role of extreme objects in PCA/Simca [J]. *Journal of Chemometrics*, 2014, 28 (5): 429–438.
- Qiu RM. Management of honey bee overwinter in north of Zhejiang Province [J]. *Apiculture of China*, 2019, 70 (12): 36–37. [邱汝民. 浙北蜂群越冬管理 [J]. 中国蜂业, 2019, 70 (12): 36–37]
- Shi HX, Liu YM, Dang XQ. The distribution, diagnosis and prevention methods of honeybee RNA viruses in insect pollinators [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2018, 47 (1): 1–6. [史红霞,刘永梅,党晓群. 蜜蜂 RNA 病毒在传粉昆虫中的分布及其病害诊断防治方法 [J]. 河南农业科学, 2018, 47 (1): 1–6]
- Vesna M, Sonja R, Jasna K, *et al.* Molecular detection of *Black queen cell virus* and *Kashmir bee virus* in honey [J]. *AMB Express*, 2018, 1: 128.
- Wu MJ, Zhou DY, Ma XT, *et al.* Study on prevalence of viral disease in *Apis cerana* in Sichuan Province [J]. *Journal of Bee*, 2014, 34 (2): 3–6. [吴孟洁,周丹银,马啸天,等. 四川省东方蜜蜂病毒病感染状况调查 [J]. 蜜蜂杂志, 2014, 34 (2): 3–6]
- Yuan CY, Deng S, Yang DH, *et al.* Distribution and infection difference of honeybee viruses in Liaoning Province [J]. *Apiculture of China*, 2017, 68 (8): 20–22. [袁春颖,邓帅,杨大贺,等. 蜜蜂主要病毒病在辽宁的分布与感染差异 [J]. 中国蜂业, 2017, 68 (8): 20–22]
- Yadav S, Kaushik HD. Diseases and enemies of honeybees. In: Omkar, eds. *Industrial Entomology* [C]. Singapore: Springer, 2017: 67–108.