植物保护学报 Journal of Plant Protection，2019，46(6)：1383-1384 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2019.2019138

不同寄主来源的蜂箱奇露尾甲携带蜜蜂病毒情况调查

Investigation of the honey bee viruses vectored by the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) from different host bee species

赵红霞[1] 黄文忠[1] 姬聪慧[2] 任 勤[2] 褚艳娜[3*] 侯春生[3*]

（1. 广东省生物资源应用研究所，广州 510260；2. 重庆市畜牧科学院，重庆 402460；3. 中国农业科学院蜜蜂研究所，农业农村部授粉昆虫生物学重点实验室，北京 100093）

Zhao Hongxia[1] Huang Wenzhong[1] Ji Conghui[2] Ren Qin[2] Chu Yanna[3*] Hou Chunsheng[3*]

（1. Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China; 2. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China; 3. Key Laboratory of Pollinator Insect Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China）

近几年世界各地出现蜜蜂群势下降的现象，除了与细菌、真菌、病毒和寄生虫有关外（Cox-Foster et al.，2007）；一种新入侵性害虫蜂箱奇露尾甲 *Aethina tumida* 也能导致蜜蜂群势下降，该虫源于南非，目前已扩散至北美洲、欧洲和亚洲，且能携带传播蜜蜂残翅病毒（deformed wing virus，DWV）和囊状幼虫病毒（sacbrood virus，SBV）（Neumann et al.，2016）。为明确我国蜂群的蜂箱奇露尾甲携带蜜蜂病毒情况，本研究拟对源自中华蜜蜂 *Apis cerana* 与意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的蜂箱奇露尾甲携带蜜蜂病毒情况进行检测，以期为防控蜂箱奇露尾甲提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小甲虫：源于中华蜜蜂和意大利蜜蜂的小甲虫于2017年10月采集自广东省陆河县蜂场，幼虫和成虫各采集约100只。部分样品立即放入干冰中存储，部分样品则以活体运回实验室。

试剂及仪器：RNA提取试剂Trizol Reagent，美国英杰生命技术有限公司；2×Go*Taq* Mix，江苏康为世纪生物科技有限公司；其余试剂均为国产或进口分析纯。TP350 PCR仪，美国Bio-Rad公司；Nikon SMZ 1500体视解剖镜，日本尼康公司。

1.2 方法

形态学鉴定：分别随机取3~5头源自中华蜜蜂与意大利蜜蜂的小甲虫成虫与幼虫，根据感官筛查法初步判定后在体视解剖镜下观察其形态、体色与个体大小，并对相应个体进行拍照。

分子鉴定和携带病毒检测：为鉴定采集的小甲虫种类并检测其是否携带蜜蜂病毒，依据蜂箱奇露尾甲 *COI* 基因序列引物（F：5′-GCTAAGTTAACTGA-AGATCCACCAT-3′/R：5′-TAGTTCCACTAATACTA-AGAGCCCC-3′）扩增约193 bp目的片段，并根据已知的以色列急性麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus，IAPV）、SBV、急性蜜蜂麻痹病毒（acute bee paralysis virus，ABPV）、黑蜂王台病毒（black queen cell virus，BQCV）、慢性麻痹病毒（chronic bee paralysis virus，CBPV）、DWV-A、DWV-B、中蜂囊状幼虫病毒（Chinese sacbrood virus，CSBV）、Kakugo virus（DWV-A/KV）共6种蜜蜂病毒9个株型分别设计其特异性引物（表1），引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。分别取50只供试小甲虫的幼虫和成虫，75%酒精表面消毒后，参照说明书于Trizol提取液中分别提取总RNA，并经过反转录得到cDNA，以此为模板进行PCR扩增。20 μL PCR反应体系：模板cDNA 2 μL、2×Go*Taq* Mix 10 μL、上下游引物各1 μL，无菌水补足至20 μL。反应程序：94℃预变性3 min；94℃变性45 s，55℃（*COI* 序列，其余病毒检测时设置相应退火温度）退火30 s，72℃延伸1 min，33个循环；72℃延伸10 min。PCR产物经含0.5 mg/mL溴化乙锭的1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，明确小甲虫分类地位及其携带蜜蜂病毒的情况。

2 结果与分析

2.1 小甲虫的形态学鉴定结果

小甲虫幼虫的体长最短为1.3 mm，最长达8.6~

基金项目：广东省科学院科技发展专项（2019GDASYL-0302007），广东省农业厅项目（蜜蜂疫病监测与流行病学调查），国家现代农业（蜂）产业技术体系（CARS-44-SYZ11）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：chuyanna@caas.cn，houchunsheng@caas.cn；收稿日期：2019-07-30

10.5 mm；成虫个体为椭圆形，颜色为红色和深棕色，体长为5.0~7.0 mm，体宽为3.0~4.5 mm（图1-a），与蜂箱奇露尾甲形态特征基本一致。

2.2 小甲虫分子鉴定结果及携带蜜蜂病毒情况

供试小甲虫均扩增到193 bp的*COI*目的片段（图1-b），从分子水平确定小甲虫为蜂箱奇露尾甲。来自意大利蜜蜂的蜂箱奇露尾甲中检测到了IAPV、DWV-A和DWV-AKV（图1-c），来自中华蜜蜂的蜂箱奇露尾甲中除了这3个株型外，也检测到了CSBV和DWV-B（图1-d）。均未检测到CBPV、ABPV、BQCV和SBV。

表1 已知6种蜜蜂病毒9个株型的PCR检测引物

Table 1 Primers used for PCR detection of nine honey bee viruses

病毒 Virus	上游引物（5′−3′） Forward primer（5′−3′）	下游引物（5′−3′） Reverse primer（5′−3′）	退火温度（℃） Annealing temperature	大小（bp） Size
IAPV	AGACACCAATCACGGACCTCAC	AGATTTGTCTGTCTCCCAGTGCAC	55	474
SBV	ATATACGGTGCGAGAACTGC	CTCGGTAATAACGCCACTGT	56	879
ABPV	TTATGTGTCAGAGACTGTAT	GCTCCTATTGCTCGGTTTTTC	55	900
BQCV	TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC	GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	57	700
CBPV	TCAGACACCGAATCTGATTATTG	ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG	55	570
DWV-B	CATAGCGAATTACGGTGCAA	GAGGGGTCCCTACTCTACCG	55	745
DWV-A[a]	CTTACTCTGCCGTCGCCCA	CCGTTAGGAACTCATTATCGCG	55	190
DWV-A[b]	GACTGAACCAAATCCGATGTC	TCTCAAGTTCGGGACGCATTC	55	376
CSBV	CCTGGGAAGTTTGCTAGTATTTACG	CCTATCACATCCATCTGGGTCAG	55	161
DWV-A/KV	GACTGAACCAAATCCGATGTC	TCTCAAGTTCGGGACGCATTC	55	396

a~b：检测小甲虫分别源于中华蜜蜂和意大利蜜蜂。a−b：Tested small hive beetles from *Apis cerana* and *Apis mellifera*.

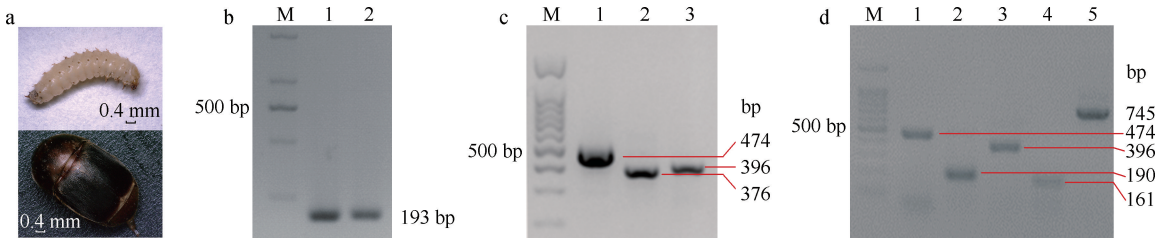

图1 来源于意大利蜜蜂和中华蜜蜂的蜂箱奇露尾甲鉴定结果及其携带蜜蜂病毒情况

Fig. 1 Detection of honey bee viruses in *Aethina tumida* from *Apis mellifera* and *Apis cerana* colonies in China

a：幼虫和成虫形态；b：分子鉴定结果；c~d：源于意大利蜜蜂和中华蜜蜂的蜂箱奇露尾甲携带病毒情况。M为DNA ladder，b图中1~2分别为幼虫和成虫，c图中1~3分别为IAPV、DWV-A、DWV-A/KV，d图中1~5分别为IAPV、DWV-A、DWV-A/KV、CSBV、DWV-B。a：Larva and adult of *Ae. tumida*；b：molecular identification；c−d：the presence of honey bee viruses in *Ae. tumida* from *Ap. mellifera* and *Ap. cerana*. M is DNA ladder，1−2 in Fig. b are larvae and adult of *Ae. tumida*，respectively，1−3 in Fig. c are IAPV，DWV-A and DWV-A/KV，respectively，1−5 in Fig. d are IAPV，DWV-A，DWV-A/KV，CSBV and DWV-B，respectively.

3 讨论

本研究中源自中华蜜蜂和意大利蜜蜂的小甲虫均为蜂箱奇露尾甲，均感染了IAPV、DWV-A和DWV-A/KV；而源自中华蜜蜂的蜂箱奇露尾甲除感染了上述3种株型外，还感染了CSBV和DWV-B，属国内首次报道，表明中华蜜蜂可能对蜂箱奇露尾甲更敏感。通常中华蜜蜂感染病毒的数量明显少于意大利蜜蜂，只有CSBV会对中华蜜蜂的生存构成严重威胁（Diao et al.，2018）。但本研究只发现了CSBV而未发现经常隐性感染意大利蜜蜂的SBV，表明CSBV可能已经扩大了寄主范围，已扩展到非蜜蜂物种，如果蜂箱奇露尾甲与CSBV互作可能会增强CSBV的毒力并加速其进化，对蜜蜂造成更大的危害。入侵性物种对本地物种生态都会产生不同程度的影响（赵紫华等，2019），蜂箱奇露尾甲作为新入侵物种对我国本地蜂种多样性格局及生态的影响需持续关注。

参 考 文 献（References）

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, et al. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science, 318(5848): 283−287

Diao QY, Li BB, Zhao HX, Wu YY, Guo R, Dai PL, Chen DF, Wang Q, Hou CS. 2018. Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: a Chinese case study. Science of the Total Environment, 630: 487−494

Neumann P, Pettis JS, Schäfer MO. 2016. Quo vadis *Aethina tumida*: biology and control of small hive beetles. Apidologie, 47(3): 427−466

Zhao ZH, Su M, Li ZH, Hui C. 2019. Invasion ecology of alien species. Journal of Plant Protection, 46(1): 1−5 (in Chinese) [赵紫华, 苏敏, 李志红, 惠苍. 2019. 外来物种入侵生态学. 植物保护学报, 46(1): 1−5]

（责任编辑：李美娟）