中国蜜蜂西奈湖病毒基因组测序与系统发育分析*

张 祎[1**] 丁兆润[1, 2] 李文峰[1] 韩日畴[1***]

（1. 广东省生物资源应用研究所，广东省动物保护与资源利用重点实验室，广东省野生动物保护与利用公共实验室，广州 510260；2. 华南农业大学农学院，广州 510640）

摘 要 【**目的**】 获得广东省西方蜜蜂 *Apis mellifera* 所携带西奈湖病毒（Lake Sinai virus，LSV）基因组全长序列，并进行系统发育分析，确定其分类地位。【**方法**】 利用 Sanger 测序得到广东省西方蜜蜂所携带的 LSV 基因组全长，命名为 LSV GIABR 并上传至 GenBank。从基因库中下载 28 个 LSV 基因组全长序列，以及 34 条 RDRP 序列，利用软件 MEGA.X，分别使用最大似然法（Maximum Likelihood）和邻接法（Neighbor-Joining）构建的系统发育树，确立 LSV GIABR 的分类地位。另外，使用软件 RDP4.0 分析基因组是否发生重组及重组位置。【**结果**】 LSV GIABR 基因组全长 5 910 nt，包含 ORF1（基因组位置 78-2615），RDRP（1852-3720），核衣壳蛋白 Capsid（3739-5301）和 ORF4（5346-5798）。全基因组和 RDRP 基因系统发育分析确定 LSV GIABR 属于 LSV2，基因组重组分析推测其可能是美国和澳大利亚的 LSV2 株系的母本。【**结论**】 从广东省西方蜜蜂检测到的 LSV 基因组全长为 5 910 nt，属于 LSV2，并可能是美国和澳大利亚的 LSV2 株系的母本。

关键词 西方蜜蜂；西奈湖病毒；系统发育；基因组重组分析

Complete genome sequences and phylogenetics of the Lake Sinai virus in China

ZHANG Yi[1**] DING Zhao-Run[1, 2] LI Wen-Feng[1] HAN Ri-Chou[1***]

(1. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources 510260, China; 2. South China Agricultural University, School of Agriculture, Guangzhou 510640, China)

Abstract **[Objectives]** To obtain the full-length genome sequence of the Lake Sinai virus (LSV) carried by *Apis mellifera* in Guangdong Province, and investigate LSV polymorphism with phylogenetic analysis. **[Methods]** LSV GIABR was detected in Guangdong, China in 2016. The full-length genome of this virus was sequenced using Sanger sequencing and submitted to GenBank (accession number is MT732482). Twenty-eight genome sequences and 34 RDRP sequences were downloaded from GenBank, aligned and analyzed by MEGA.X using both the maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) methods. A recombination event was predicted by RDP4.0. **[Results]** The complete genome sequence contained 5 910 nucleotides, with an ORF1 segment (genome position from 78 to 2615) overlapping the RDRP segment (from 1852 to 3720), a capsid protein segment (from 3739 to 5301) and a hypothetical protein segment (from 5346 to 5798). Analysis of the genome lineage, RDRP gene and recombination events suggest that LSV GIABR belongs to SLV2 and is a putative, major, parental sequence of LSV2 isolates from the United States and Australia. **[Conclusion]** LSV GIABR detected in *A. mellifera* in Guangdong, China belongs to the LSV lineage 2, and is predicted to be a major parental sequence of LSV2 isolates from the United States and Australia.

*资助项目 Supported projects：广东省自然科学基金-面上项目，2019A1515012089；GDAS 科技发展专项（2018GDASCX-0107）

**第一作者 First author，E-mail：zy3001@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：hanrc@giabr.gd.cn

收稿日期 Received：2020-07-01；接受日期 Accepted：2020-08-18

Key words *Apis mellifera*; Lake Sinai virus; phylogenetic analysis; recombination events

21 世纪农业面临的一个突出问题是传粉者数量的急剧下降（Potts *et al.*，2016）。据估计，世界上 35%的作物生产依赖于传粉者，其中最活跃的是西方蜜蜂（意大利蜜蜂）*Apis mellifera*（Klein *et al.*，2006；Calderone，2012）和东方蜜蜂（中华蜜蜂）*Apis cerana*（曾志将，2020）。在美国，大约 100 种经济作物依靠蜜蜂授粉，蜜蜂授粉服务所提供的经济价值大概为每年 160 亿美元（Calderone，2012）。而 2006-2007 年冬季发生蜂群衰竭失调（CCD）现象，导致美国 60 万蜂群神秘失踪（Cox-Foster *et al.*, 2007；van Engelsdrop *et al.*，2009）。学界对造成这一现象的因素进行了广泛研究，但其确切原因和机制仍有待最后确定。目前在科学界流行的观点是多种因素影响蜜蜂健康和危害群体生存，包括寄生虫、病原体、害虫、农药暴露、营养不良、物种多样性减少和管理不善，独立或协同作用（Potts *et al.*，2010；Levy，2011；Godfray *et al.*，2014；Goulson *et al.*，2015）。

然而，蜜蜂蜂群健康自 20 世纪 80 年代以来就一直在下降，这一现象在很大程度上归因于狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 的侵染（Rosenkranz *et al.*，2010）。而狄斯瓦螨的侵染往往伴随着各种病毒的传播和繁殖。在 2015 年之前，已经有超过 20 种病毒被确认可以通过狄斯瓦螨感染蜜蜂（Bailey，1968；Chen and Siede，2007），病毒的传播往往会造成蜜蜂群体衰竭（Cox-Foster *et al.*, 2007；van Engelsdrop *et al.*, 2009；Genersch *et al.*，2010；Evans and Schwarz，2011；Cornman *et al.*，2012）。自 2015 年以来，宏基因组新一代测序（Next generation sequence, NGS）方法极大地加快了蜜蜂病毒发现的步伐。现在，超过 30 种病毒在蜜蜂中被发现（Galbraith *et al.*，2018；McMenamin and Flenniken，2018；Grozinger and Flenniken，2019）。大多数蜜蜂病毒是正链 RNA 病毒，这些病毒的遗传物质由正链 RNA 基因组组成，属于小核糖核酸病毒（Le Gall *et al.*，2008）。常见的蜜蜂病毒包括急性蜜蜂麻痹病毒（Acute bee paralysis virus，ABPV），黑蜂王台病毒（Black queen cell virus，BQCV）、克什米尔蜜蜂病毒（Kashmir bee virus，KBV）和以色列急性麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus，IAPV），它们都是 Dicistroviridae 家族的成员（Valles *et al.*，2017a）。其他常见的蜜蜂病毒包括残翅病病毒（Deformed wing virus，DWV）、*Varroa destructor* Virus 1（VDV1）。囊状幼虫病病毒（Sacbrood virus，SBV）和缓慢性蜜蜂麻痹病病毒（Slow bee paralysis virus，SBPV）是 *Iflaviridae* 科的成员（Valles *et al.*，2017b），以及未定类的慢性蜜蜂麻痹病毒（Chronic bee paralysis virus，CBPV）和西奈湖病毒（Lake Sinai virus，LSV）。

西奈湖病毒属于+ssRNA 病毒，基因组长约 5 600 nt。2008 年首次发现于美国南达科他（South Dakota）靠近西奈湖（Lake Sinai）的一个流动养蜂场。目前，已发现的 LSV 病毒株系（Lineage）共 8 种，LSV1-8。GenBank 中能找到全长的有 LSV1、LSV2、LSV3、LSV4 和 LSV8。其中，LSV2 检出率最高，其基因组全长约 5 910 bp，编码衣壳蛋白 57.3 ku，包括 4 个开放阅读框，病毒衣壳为二十面体，粒子直径约 27 nm。LSV 可以通过媒介、食物或粪便传播，分布于蜜蜂的肠道、胸部、腹部及头部，主要在肠道，但具体病理特征还不清楚（Daughenbaugh *et al.*，2015）。LSV 不仅在蜜蜂感染和传播，还感染多种其他昆虫，如熊蜂（Bombus），胡蜂（Vespidae），以及蚂蚁（*Messor*）（Fürst *et al.*，2014；Ravoet *et al.*，2014；McMahon and Flenniken，2015；Parmentier *et al.*，2016；Yang *et al.*，2020）。LSV 常存在于弱势蜂群中，并存在超感染现象，即在单只蜜蜂中同时检测到 3 种不同 LSV 株系（Ravoet *et al.*，2015）。随后研究表明，该病毒与蜜蜂群体崩溃失调症（CCD）的发生有关（Cornman *et al.*，2012），在其它蜂种也有发现危害，如熊蜂蜂群（Ravoet *et al.*，2014）。近几年，利用 RT-PCR、Sanger 测序、Illumina

测序和新一代测序（NGS）等方法在美国（Daughenbaugh *et al.*, 2015）、西班牙（Granberg *et al.*, 2013）、比利时（Ravoet *et al.*, 2014）、荷兰、瑞典、土耳其、澳大利亚、南非、汤加、贝宁、中国等多个国家都已检测到 LSV（Parmentier *et al.*, 2016）。

2016 年本实验室在广东省蜜蜂病原调查过程中发现在西方蜜蜂工蜂中检测到 LSV，随后 Sanger 测序获得基因组全长，共 5 910 bp，命名为 LSV GIABR，并上传至 NCBI，登录号为 MT732482。本文将通过全基因组比对建树分析、基因组重组分析以及 RDRP 基因进化分析等，阐述 LSV GIABR 基因组特征和分类地位。

1　材料与方法

1.1　材料

于 2016 年 3 月 1 日至 4 月 30 日，在广东省 21 个地市区的东方蜜蜂和西方蜜蜂蜂场采集样品，每个蜂场采集 3 份样品，每份样品包括工蜂蛹及成蜂各 10 只，并做好相应编号。采集后 75% 酒精浸泡，快递寄回。收到样品后，对应编号分类保存于 - 80 ℃冰箱，用于 RNA 提取。

1.2　病原检测

使用 TRIzoL Reagent（Invitrogen，Carlsbad，USA）试剂提取单个蜜蜂样品总 RNA，1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 分光光度计（IMPLEN，CA，USA）检测（OD_{260}/OD_{280}）。使用 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit（TAKARA，大连宝生物）合成第一链 cDNA，- 20 ℃保存备用。LSV 检测通用引物：LSVdeg-F：GCCWCGRYTGTTGGTYCCCCC，LSVdeg-R：GAGGTGGCGGCGCSAGATAA AGT（Ravoet *et al.*, 2013）。扩增酶使用的是全式金（北京）的 DNA 扩增酶（2×EasyTaq® PCR SuperMix，Cat. AS111-12）。PCR 扩增体系：2× taq 12.5 μL，10 μmol·L^{-1} 正反向引物各 1.0 μL，ddH_2O 10.5 μL。PCR 扩增条件：95 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，35 个循环，72 ℃，10 min，4 ℃保存。1%凝胶电泳检测，回收对应大小的阳性条带，连接 T 载体，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，获得阳性克隆子，各选 3 个阳性克隆子送英潍捷基（上海）贸易有限公司进行测序。所得序列上传至 NCBI 进行 BLASTn 分析，预测同源物种。

1.3　LSV 基因组测序和分析

上述检测结果发现样品中 LSV 阳性，并且根据通用检测引物的 PCR 产物在 NCBI 上 BLAST 比对分析，结果与 GenBank 中 HQ888865.2 高度相似。因此本文以 HQ888865.2 为模板设计了 6 对引物（表 1）扩增 LSV 全长，使用高保真酶 Pfu（Stratagene）或者 KOD（Toyobo）扩增获得 PCR 扩增产物，产物纯化后，连接 T 载体，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，获得阳性克隆子，各选 3 个阳性克隆子送英潍捷基（上海）贸易有限公司进行测序。所得序列用 MegAlign 拼接（DNASTAR，Version 6.0），获得 LSV 基因组全长。全基因组序列提交到 GenBank，序列号为 MT732482。在 GenBank 中下载另外 27 个长度近似的完整基因组序列利用软件 MEGA（MEGA.X），使用最大似然法（Maximum Likelihood）构建系统发育树，选择 GTR + G + I 模型，1 000 bootstrap replicates 重复计算，并计算遗传距离和全基因组序列相似度。另外，利用 RDP 4.0 软件分析基因组是否发生重组及重组位置。

1.4　RDRP 系统发育树分析

选择 GenBank 中 34 条长度近似的 RDRP 基因序列，来自比利时、荷兰、瑞士、美国、澳大利亚、南非、法国、汤加和中国的 LSV1，2，3，4，5，8 的代表株序列，以及我国科学家上传的中国其他 5 省市地区（北京，江西，河北，贵州，山东）鉴定扩增所得的各个 LSV 的部分 RDRP 序列，截取长度为 491 bp 的部分进行分析。利用软件 MEGA（MEGA.X），使用邻接法（Neighbor-Joining）构建的系统发育树，选择 Kimura 2-parameters 模型，重复计算 1 000 bootstrap replicates。

表 1　LSV GIABR 全基因组序列扩增引物及 RT-PCR 反应条件

Table 1　Specific primer sequence designed for complete genome amplification

引物 Primer	序列 Sequence（5′-3′）	长度（bp） Length（bp）	预变性 Pre-PCR denaturation	循环数 Cycles	变性 Denaturation	退火 Annealing	延伸 Extension
LSV-1F	GGGAAGTTTATGCCTCCTAC	500	94 ℃	30	94 ℃	55 ℃	72 ℃
LSV-1R	GATGATCGAGAAGAGCTGG		3 min		30 s	30 s	30 s
Orf1-F-78	ATGAAGGTTGTCTTCTTGGTTTCG	2 538	94 ℃	30	94 ℃	60 ℃	72 ℃
Orf1-R-2615	TTACGCACCTTCGTTTGGGAGGT		3 min		30 s	30 s	30 s
RdRp-F-1852	ATGATATCAAGTCTTGTGACGC	1 869	94 ℃	30	94 ℃	63 ℃	72 ℃
RdRp-R-3720	TTACGCGTAAAGAACAGACCTAAACT		3 min		30 s	30 s	30 s
LSV-3630	TTCCTCTTACCGCTATCTTAAG	274	94 ℃	30	94 ℃	55 ℃	72 ℃
LSV-3903	GCCTATTAATAGACGAAGGCTG		3 min		30 s	30 s	30 s
Cap-F-3738	GTGAATCCACCAACTACGACTAC	1 563	94 ℃	30	94 ℃	63 ℃	72 ℃
Cap-R-5300	TTACTTAGCGTCAAAGAAGATGT		3 min		30 s	30 s	30 s
LSV-5154F	ATCTCCATGTTGCCGGGTGTAGG	756	94 ℃	30	94 ℃	61 ℃	72 ℃
LSV-5910R	GCTGTCGCAACAACCAACAGCGTT		3 min		30 s	30 s	30 s

2　结果与分析

2.1　LSV 的阳性率

利用 RT-PCR 检测分别检测东方蜜蜂样品 156 份，西方蜜蜂样品 54 份，仅在 2 份西方蜜蜂样品中检测到 LSV，西方蜜蜂样品阳性检测率为 3.7%。

2.2　LSV GIABR 全基因组特征与系统发育分析

LSV GIABR 全长 5 910 nt，包含 4 个开放读码框，ORF1（基因组位置 78-2615）、RDRP（1852-3720）、核衣壳蛋白 Capsid（3739-5301）和 ORF4（5346-5798）。根据系统发育分析（图 1），属于 LSV2。基因组全长序列两两比较分析，LSV GIABR 与 LSV2（KY465711.1）相似度为

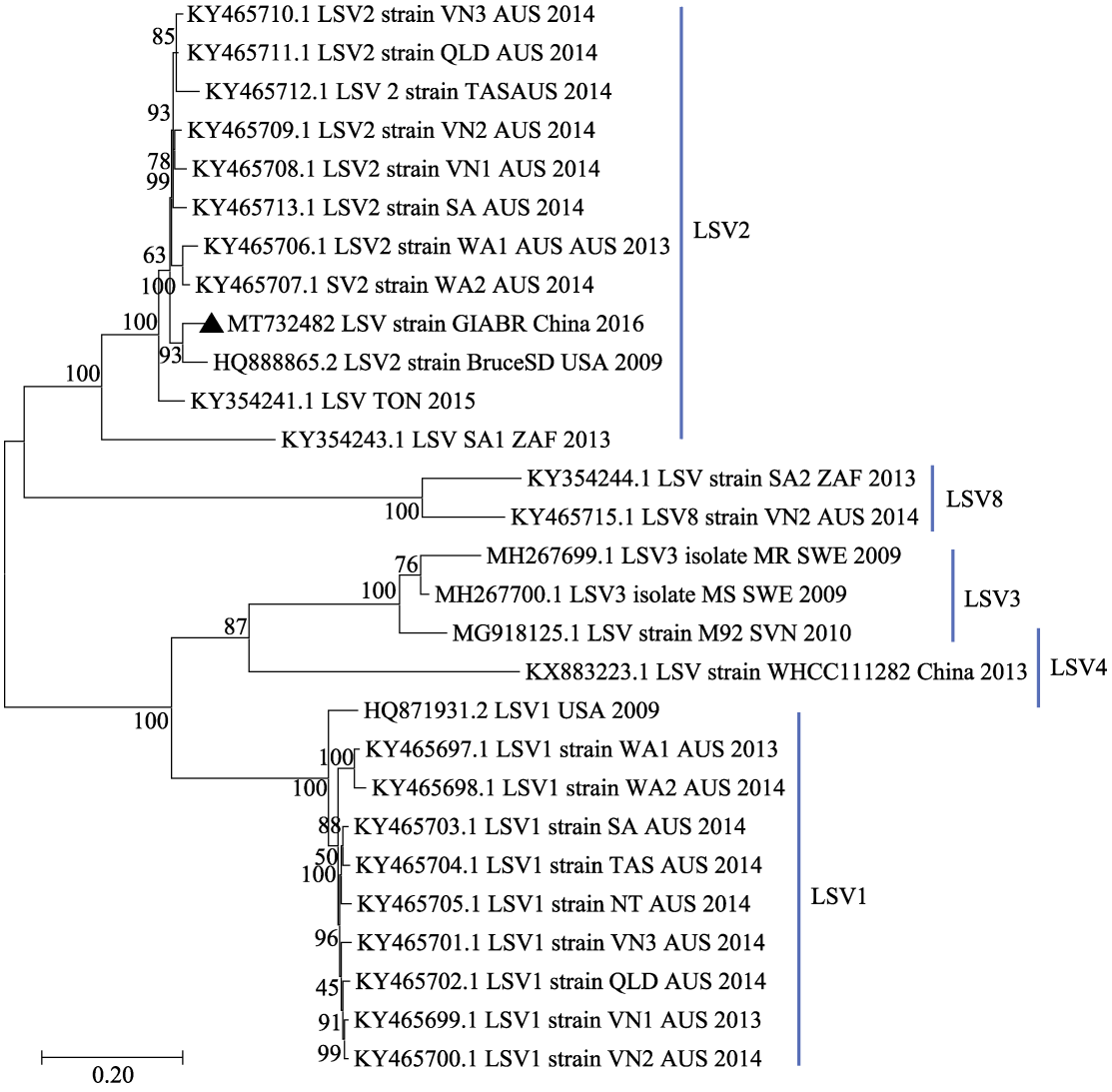


图 1　LSV 基因组进化分析

Fig. 1　Phylogenetic comparison of 28 complete genome sequences of LSV

比对了 28 个 LSV 的全基因组序列并构建系统发育树，用软件 MEGA.X 中 Clastal W 比对，然后使用最大似然法构建进化树，采用 GTR+G+I 模型，重复计算 1 000 次。▲是本次实验所测序完成的 LSV GIABR。

27 genome sequences were downloaded from GenBank. All the 28 complete genome sequences were aligned and cut to 5 686 nucleotides including gaps. A phylogenetic tree was built with MEGA.X using the maximum likelihood method, the GTR+G+I model; the reliability of the tree was tested through 1 000 bootstrap replicates.

▲ represents complete genome sequence of LSV GIABR which sequenced by our lab.

94.55%，与 LSV2（HQ888865.2）相似度为 94.11%；与 LSV1（HQ871931.2）相似度为 73.15%；与 LSV3（MH267700.1）相似度为 73.78%，与 LSV4 中国株（KX883223.1）相似度为 74.67%；与 LSV8（KY467615.1）相似度为 73.3%。两两比较的遗传距离依次对应的是 0.057 92、0.388 65、0.390 15、0.403 53、0.397 58（表 2）。基因组重组事件分析（Recombination events analysis）表明，国内已知的具有基因组全长的两株 LSV 都不是已知其它株系的重组子，而 LSV GIABR（MT T732482）和 LSV2 KY354241.1 可能是作为重组事件的母本，提供较大片段序列。重组事件预测发生的第一个断裂点大概在 1954-1967，第二个断裂点 2140-2167（图 2），RDP 4（P=4.342×10^{-40}）(P<0.05，视为重组事件有效，3 种以上算法同时检测到则为有意义重组事件)，预测重组子是来自美国的 HQ888865 和澳大利亚 KY465706，KY465707，KY465708，KY465709，KY465710，KY465711，KY465712，KY465713。这一结果可用 RDP 4 中的 5 个程序模块验证，分别是：GeneConv（P=4.539×10^{-30}），BootScan（P=4.784×10^{-32}），MaxChi（P=7.253×10^{-9}），Chimaera（P=1.994×10^{-8}）和 SiScan（P=1.999×10^{-4}）。

2.3 LSV RDRP 基因系统发育分析

根据图 3 可知，依据 RDRP 基因系统进化分析，LSV GIABR 归属于 LSV2。中国另一个已获得全长的 LSV 归属于 LSV4，这个结果跟全基因组系统进化分析所得结果一致。来自中国北京、贵州和河北的都归于 LSV4，江西的归于 LSV3，山东的归于 LSV2。

3 结论与讨论

2016 年，通过对广东省 21 个蜂场进行调查，54 份西方蜜蜂中仅在 2 份西方蜜蜂样品中检测到 LSV2，阳性检测率为 3.7%。2011 年，比利时检测的 LSV 混合体阳性率为 14.6%（Ravoet *et al.*，2013）。在 2013 年至 2015 年之间美国接受调查的蜜蜂中 LSV2 阳性率为 21%-33%（Traynor *et al.*，2016）。

LSV 拥有丰富的多样性，在短短时间内就已鉴定到 8 个不同株系，在我国仅 6 个省市（广东，北京，江西，河北，贵州，山东）就已检测到 LSV2、LSV3 和 LSV4（图 3）(Shi *et al.*，2016；Yang *et al.*，2020)，而在美国的加利福尼亚州（California）和蒙大拿（Montana）都同时检测到了 6 个株系，LSV1、LSV2、LSV3、LSV4、LSV6 和 LSV7（Daughenbaugh *et al.*，2015），甚至在单个蜜蜂中都能检测到 3 种株系（Ravoet *et al.*，2015）。各株系之间基因组序列相似度差异比较大，同株系间相似度高，LSV GIABR 与 LSV2（KY465711.1）相似度 94.55%，与 LSV2（HQ888865.2）相似度 94.11%；与 LSV1（HQ871931.2）相似度 73.15%；与 LSV3（MH267700.1）相似度 73.78%，与 LSV4 中国株（KX883223.1）相似度 74.67%；与 LSV8（KY467615.1）相似度 73.3%。在已确定的其它潜在 LSV 宿主，包括蚂蚁（Bigot *et al.*，2017），熊蜂（Ravoet *et al.*，2015；Parmentie *et al.*，2016）和我国的大黄蜂（Yang *et al.*，2020），以及在凹唇壁蜂 *Osmia excavata* 中检测到复制中间体（Ravoet *et al.*，2015），说明其拥有较广的宿主范围，这与其他蜜蜂病毒不同。研究表明这可能是因为 LSV 密码子用法（Codon usage）与其他常见蜜蜂病毒的密码子用法不同，LSV 密码子用法与狄斯瓦螨的密码子用法显著相关，虽然仅仅是微弱的共同密码子偏好性。而蜜蜂常见病毒的密码子偏好性是与蜜蜂共进化（Co-evolved）（Cornman，2019）。LSV 可以检测到在狄斯瓦螨中存在，但是并不能检测到在其体内复制，在壁蜂中能检测到 LSV 的复制（Ravoet *et al.*，2015）。因此，LSV 的进化和传播途径还有待于收集更多数据来证明。

重组事件分析表明 LSV2 GIABR 和 LSV2 KY354241 作为主要母本提供了较大片段给重组子，和 LSV1 的 KY465701、KY465702、KY465703、KY465704、KY465705、HQ871931.2、KY465699、KY465700 作为次要母本产生的重组子 HQ888865、KY465706、KY465707、KY465708、

表 2　28 个 LSV 基因组之间两两比较的遗传距离

Table 2　Pairwise distances among 28 LSV genomes

	MT732482	KY465699.1	KY465700.1	KY465702.1	KY465701.1	KY465705.1	KY465703.1	KY465704.1	KY465697.1	KY465698.1	HQ871931.2	MH267699.1	MH267700.1	KX883223.1	KY354243.1	HQ888865.2	KY465712.1	KY354241.1	KY465706.1	KY465707.1	KY465713.1	KY465709.1	KY465708.	KY465710.1	KY465711.1	KY354244.1	KY465715.1	MG918125.1
MT732482																											
KY465699.1	0.38923																										
KY465700.1	0.38936	0.00985																									
KY465702.1	0.38622	0.01368	0.01334																								
KY465701.1	0.38281	0.01771	0.02002	0.02286																							
KY465705.1	0.38752	0.02111	0.02521	0.02343	0.03073																						
KY465703.1	0.38749	0.01879	0.01969	0.02039	0.02553	0.02215																					
KY465704.1	0.38313	0.02111	0.02201	0.02199	0.02661	0.02269	0.01544																				
KY465697.1	0.38184	0.03463	0.03683	0.03737	0.03791	0.03376	0.02851	0.03718																			
KY465698.1	0.38843	0.04210	0.04227	0.04247	0.04501	0.04304	0.03823	0.04669	0.02301																		
HQ871931.2	0.38865	0.05246	0.04649	0.05154	0.05637	0.06845	0.06022	0.06274	0.07282	0.07197																	
MH267699.1	0.38803	0.28949	0.29120	0.28803	0.29342	0.28463	0.29126	0.29344	0.27703	0.27523	0.29766																
MH267700.1	0.39015	0.29000	0.29073	0.28757	0.29075	0.28515	0.29051	0.29109	0.28233	0.28003	0.29357	0.08523															
KX883223.1	0.40353	0.31629	0.31562	0.31955	0.31871	0.31367	0.31703	0.31960	0.31977	0.31754	0.31666	0.29507	0.29895														
KY354243.1	0.31308	0.40934	0.40687	0.40619	0.40434	0.41014	0.40637	0.40795	0.40875	0.40454	0.39871	0.41454	0.41567	0.41045													
HQ888865.2	0.06249	0.37911	0.37800	0.37493	0.37771	0.37840	0.37738	0.37309	0.38190	0.38720	0.38322	0.39273	0.39633	0.39633	0.31748												
KY465712.1	0.08005	0.37399	0.37471	0.37165	0.37115	0.37413	0.37440	0.36982	0.37676	0.38207	0.37793	0.38955	0.39114	0.40704	0.31207	0.07615											
KY354241.1	0.07851	0.38621	0.38632	0.38445	0.38074	0.38729	0.38788	0.38352	0.38587	0.38994	0.38434	0.39361	0.39194	0.40309	0.31018	0.09423	0.08110										
KY465706.1	0.08112	0.37712	0.37968	0.37630	0.37519	0.37732	0.37723	0.37021	0.37972	0.38543	0.38323	0.39139	0.39030	0.40172	0.31553	0.07831	0.06573	0.07388									
KY465707.1	0.06742	0.37752	0.38008	0.37517	0.37273	0.37772	0.37854	0.37333	0.37572	0.38349	0.38271	0.39264	0.39746	0.40207	0.31096	0.06497	0.05895	0.06571	0.02891								
KY465713.1	0.06707	0.37375	0.37446	0.37051	0.37091	0.37449	0.37233	0.36837	0.37475	0.38004	0.37616	0.38756	0.38965	0.40583	0.30778	0.06094	0.04854	0.06654	0.04934	0.04032							
KY465709.1	0.06306	0.37615	0.37748	0.37320	0.37482	0.37537	0.37625	0.37075	0.37954	0.38642	0.38041	0.38771	0.39211	0.40216	0.31124	0.05658	0.04538	0.05817	0.04451	0.03447	0.03057						
KY465708.1	0.06879	0.37885	0.37958	0.37588	0.37720	0.37746	0.37651	0.37307	0.38071	0.38544	0.38066	0.39052	0.39479	0.40338	0.30825	0.06339	0.05092	0.06823	0.04817	0.04010	0.03526	0.02623					
KY465710.1	0.05962	0.37872	0.37945	0.37606	0.37421	0.37887	0.37791	0.37453	0.37777	0.38310	0.38053	0.39167	0.39730	0.40039	0.30918	0.05743	0.03714	0.06119	0.04519	0.03301	0.03233	0.02550	0.02387				
KY465711.1	0.05792	0.37536	0.37669	0.37241	0.37464	0.37611	0.37577	0.37179	0.37905	0.38531	0.37992	0.38995	0.39554	0.40356	0.31000	0.05432	0.03474	0.06101	0.04304	0.03212	0.02698	0.01966	0.02534	0.01330			
KY354244.1	0.40299	0.44966	0.44817	0.44671	0.44718	0.45025	0.45174	0.44904	0.45406	0.45131	0.44783	0.45261	0.46075	0.45100	0.42082	0.39822	0.40388	0.40926	0.40035	0.39729	0.40243	0.40091	0.40180	0.40085	0.39669		
KY465715.1	0.39758	0.46004	0.45885	0.45774	0.45811	0.46020	0.46296	0.46300	0.45974	0.45863	0.45627	0.45327	0.45206	0.44666	0.41339	0.40762	0.41279	0.40731	0.40446	0.40496	0.40560	0.40177	0.40688	0.40382	0.40141	0.18747	
MG918125.1	0.39353	0.29475	0.29521	0.29373	0.29439	0.28965	0.29687	0.29641	0.28785	0.28745	0.29860	0.15352	0.09475	0.30294	0.40978	0.39253	0.39147	0.39038	0.38554	0.39542	0.39122	0.39112	0.39575	0.39551	0.39150	0.45648	0.45871

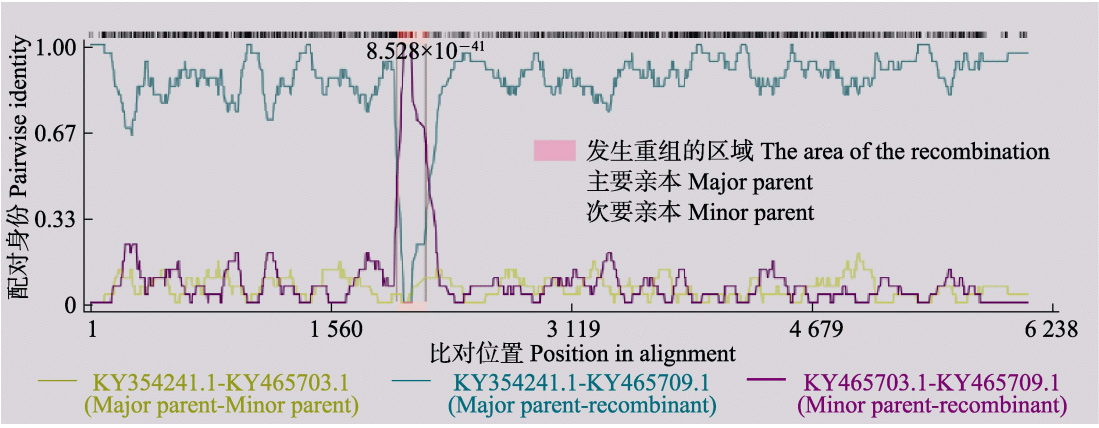


图 2　LSV 序列的基因组重组预测

Fig. 2　Phylogenetic support for recombination in LSV

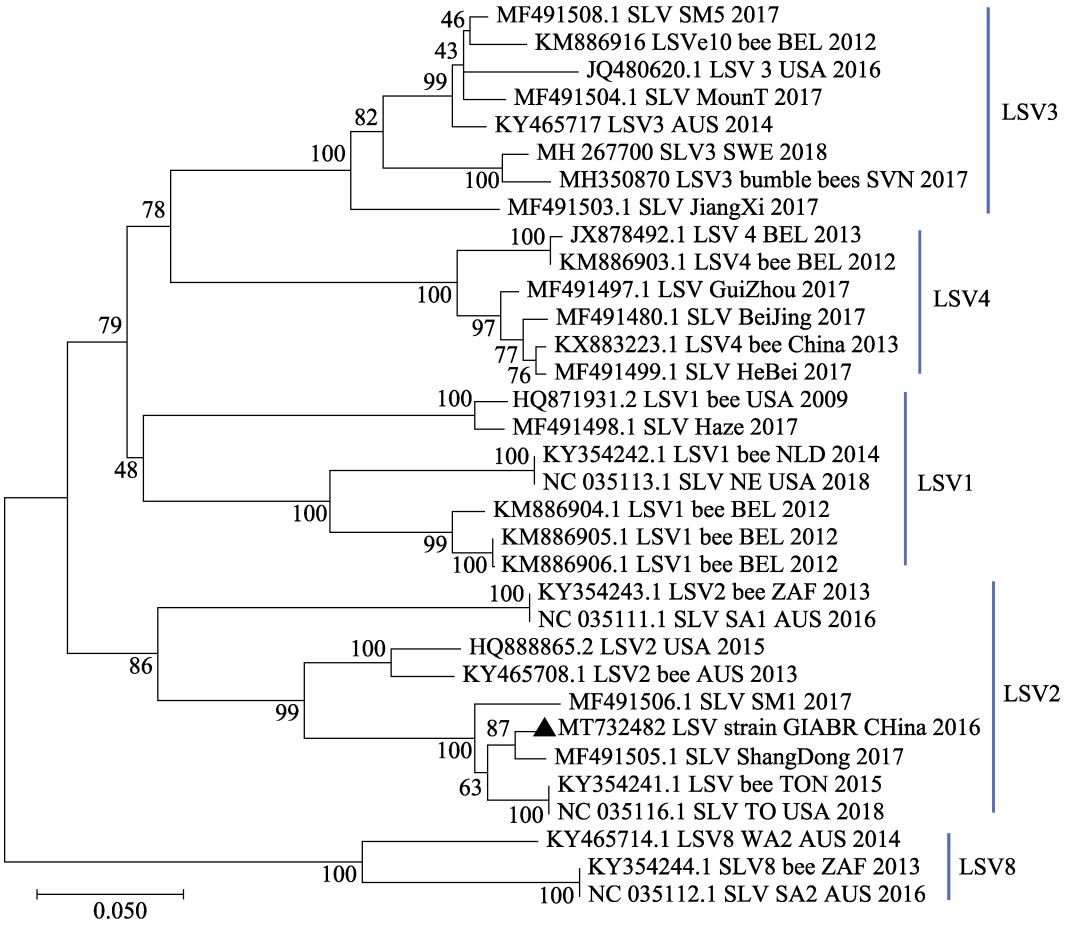


图 3　RDRP 基因系统发育分析

Fig. 3　Phylogenetic comparison of RDRP gene sequences of LSV

从 GenBank 中下载了来自比利时、荷兰、瑞士、美国、澳大利亚、南非、汤加以及中国各地的 RDRP 基因的全长或部分序列。利用 MEGA. X 软件分析，截取 491 bp 长的部分构建系统发育树；采用邻接法，Kimura 2-参数模型，重复计算 1 000 次。中国株有广东、北京、江西、河北、贵州、山东和江苏；▲是本次实验所测序完成的 LSV GIABR。

Most closely related sequences from Belgium (BEL), the Netherlands (NDL), Sweden (SWE), United States of America (USA), Australia (AUS), China (CHN), South Africa (ZAF), and Tonga (TON) and all the RDRP sequences from 6 provinces of China were downloaded from GenBank. Each of the samples was presented with GenBank accession number. Phylogenetic tree was generated with software MEGA. X using neighbor-joining (NJ) method implemented with the Kimura 2-parameters model, and the reliability of trees was tested through 1 000 bootstrap replicates. ▲ represents RDRP sequence of LSV GIABR which sequenced by our lab.

KY465709、KY465710、KY465711、KY465712、KY465713 没有检测到重组事件发生在 LSV3、LSV4 和 LSV8，这个结果与 Cornman（2019）所得结论一致。这也有可能是 LSV3、LSV4 和 LSV8 的全基因组序列比较少的缘故。但总的来说，LSV 发生重组的可能性比较大，基因组序列变化多。基因组重组在病毒中是非常常见，也是病毒变异产生新毒株的一个重要方式。高变异性赋予 RNA 病毒更强的进化灵活性以逃避免疫反应，使宿主免疫系统无法有效地对抗它们。与所有 RNA 病毒一样，蜜蜂病毒表现出显著的遗传多样性、生物多样性和适应性。因此，鉴定新出现的病毒，对于后续研究该病毒的病理学，流行病学以及防控都是至关重要的一步。

西奈湖病毒在脆弱和健康的蜂群中都呈现高丰度（Cornman *et al.*，2012；Daughenbaugh *et al.*，2015；Glenny *et al.*，2017），相对于其它蜜蜂 RNA 病毒而言高度多样化，并且在单个蜜蜂超感染。尚不清楚西方蜜蜂是不是所有 LSV 株系的主要寄主，其病理学特征也还需要再研究，流行病学以及进化都还有待继续研究。但很明显，来自世界各国各地的更多 LSV 全基因组的测定与共享有助于推动这些研究。

参考文献 (References)

Bailey L, 1968. Honey bee pathology. *Annual Review of Entomology*, 13: 191–212.

Bigot D, Dalmon A, Roy B, Hou C, Germain M, Romary M, Deng S, Diao Q, Weinert LA, Cook JM, Herniou EA, Gayral P, 2017. The discovery of halictivirus resolves the *Sinaivirus* phylogeny. *Journal of General Virology*, 98(11): 2864–2875.

Calderone NW, 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS ONE*, 7(5): e37235.

Chen YP, Siede R, 2007. Honey beee viruses. *Advances in Virus Research*, 70: 33–80.

Cornman RS, 2019. Relative abundance and molecular evolution of Lake Sinai virus (*Sinaivirus*) clades. *Peer J.*, 7: e6305.

Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, Vanengelsdorp D, Evans JD, 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8): e43562.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese 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 WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283–287.

Daughenbaugh KF, Martin M, Brutscher L, Cavigli I, Garcia E, Lavin M, Flenniken M, 2015. Honey bee infecting lake sinai viruses. *Viruses*, 7(6): 3285–3309.

Evans JD, Schwarz RS, 2011. Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19(12): 614–620.

Fürst M, McMahon D, Osborne J, Brown MJF, 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506 (7488): 364–366.

Galbraith DA, Fuller ZL, Ray AM, Brockmann A, Frazier M, Gikungu MW, Martinez JF I, Kapheim KM, Kerby JT, Kocher SD, Losyev O, Muli E, Patch HM, Rosa C, Sakamoto JM, Stanley S, Vaudo AD, Grozinger CM, 2018. Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics. *Scientific Reports*, 8(1): 8879.

Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P, 2010. The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3): 332–352.

Glenny W, Cavigli I, Daughenbaugh KF, Radford R, Kegley SE, Flenniken ML, 2017. Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS ONE*, 12(8): e0182814.

Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, Mclean AR, 2014. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*, 281(1786): 20140558.

Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.

Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, Karlsson OE, Kukielka D, Belak S, Sanchez-Vizcaino JM, 2013. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: Co-infection by aphid lethal paralysis, israel acute paralysis and Lake Sinai viruses. *PLoS ONE*, 8(2): e57459.

Grozinger CM, Flenniken ML, 2019. Bee viruses: Ecology, pathogenicity, and impacts. *Annual Review of Entomology*, 64: 205–226.

Klein A, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1608): 303–313.

Levy S, 2011. What's best for bees. *Nature*, 479(7372): 164–165.

Le Gall O, Christian P, Fauquet, CM, King AMQ, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya AE, 2008. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Archives of Virology*, 153(4): 715.

Mcmenamin AJ, Flenniken ML, 2018. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science*, 37(4): 33.

Parmentier L, Smagghe G, de Graaf DC, Meeus I, 2016. *Varroa destructor* Macula-like virus, Lake Sinai Virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (*Bombus pascuorum*, *Bombus lapidarius and Bombus pratorum*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 134: 6–11.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 345–353.

Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ, 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632): 220–229.

Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, deGraaf DC, 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE*, 8(8): e72443.

Ravoet J, De Smet L, Meeus I, Smagghe G, Wenseleers T, de Graaf DC, 2014. Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122: 55–58.

Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, de Graaf DC, 2015. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Research*, 201: 67–72.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1): S96–S119.

Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, Qin XC, Li J, Cao JP, Eden JS, Buchmann J, Wang W, Xu JG, Holmes EC, Zhang YZ, 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540(7634): 539–543.

Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, Madella S, Evans J, Lopez D, van Engelsdorp D, 2016. Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie*, 47(3): 325–347.

Valles SM, Chen Y, Firth AE, Guérin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda JR, Ryabov E, 2017a. ICTV virus taxonomy profile: *Iflaviridae*. *Journal of General Virology*, 98(4): 527–528.

Valles SM, Chen Y, Firth AE, Guérin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda JR, Ryabov E, 2017b. ICTV virus taxonomy profile: *Dicistroviridae*. *The Journal of General Virology*, 98(3): 355–356.

van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS, 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8): e6481.

Yang S, Gayral P, Zhao H, Wu Y, Jiang X, Wu Y, Bigot D, Wang X, Yang D, Herniou EA, Deng S, Li F, Diao Q, Darrouzet E, Hou C, 2020. Occurrence and molecular phylogeny of honey bee viruses in vespids. *Viruses*, 12(1): 6.

Zeng ZJ, 2020. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]