北京地区六种蜜蜂病毒病的流行病学研究*

贾慧茹[1**] 刘进祖[2] 王 星[2] 吴艳艳[1] 周 婷[1***]

（1. 中国农业科学院蜜蜂研究所/农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室 北京 100093；2. 北京市蚕业蜂业管理站 100029）

摘 要 **【目的】** 对蜜蜂的 6 种病毒：以色列急性麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus，IAPV）、残翅病毒（Deformed wing virus，DWV）、囊状幼虫病病毒（Sacbrood virus，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）在北京地区的流行情况进行调查，以期为该地区蜜蜂病毒病的防控提供一定的理论依据。**【方法】** 应用多重 RT-PCR 法确定上述 6 种病毒在该地区的感染情况，并通过序列分析确定特异性。**【结果】** 在所有检测样本中均未检测到急性麻痹病病毒和慢性麻痹病病毒，感染率最高的是以色列急性麻痹病毒，其次是残翅病毒。检测的样本普遍存在混合感染。**【结论】** 以色列急性麻痹病毒、残翅病毒、囊状幼虫病病毒、黑蜂王台病毒 4 种病毒可能在北京地区广泛分布。

关键词 蜜蜂病毒，多重 RT-PCR，以色列急性麻痹病毒，蜜蜂卷翅病毒，蜜蜂囊状幼虫病病毒，黑蜂王台病毒

Occurrence and prevalence of six bee viruses in Beijing

JIA Hui-Ru[1**] LIU Jin-Zu[2] WANG Xing[2] WU Yan-Yan[1] ZHOU Ting[1***]

(1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology of Agriculture, Institute of Apiculture Research, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100093, China; 2. Beijing Apiculture Silkworm Administrative Centre, Beijing 100029, China)

Abstract **[Objectives]** To provide a theoretical basis for the prevention of bee virus diseases in Beijing. **[Methods]** Six honey bee viruses; Israel acute paralysis virus (IAPV), deformed wing virus (DWV), Sacbrood virus (SBV), acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV) and chronic bee paralysis virus (CBPV) were surveyed using multiplex RT-PCR，and the specificity of the RT-PCR assay was confirmed by sequence analysis. **[Results]** IAPV was the most widespread virus with DWV was the second most prevalent. Chronic bee paralysis virus (CBPV) and acute bee paralysis virus (ABPV) were not detected. Simultaneous multiple infections of viruses were common in the tested samples. **[Conclusion]** IAPV, DWV, SBV and BQCV are probably wide spread in the Beijing region.

Key words bee viruses, multiplex RT-PCR, Israeli acute paralysis virus, deformed wing virus, sacbrood virus, black queen cell virus

蜜蜂是世界上数量最大的授粉昆虫，在农业生产中发挥着极其重要的作用，有调查显示，全球接近 1/3 的农作物依赖于授粉动物，且每年全球直接源于昆虫授粉创造的经济价值大约有 150 亿美元，占全球整个农业生产经济收入的 9.5%（Gallai *et al.*，2009）。但近些年蜂群数量急剧下降，研究表明蜂群丢失是多种因素共同作用的结果，而各种病毒病的高发是主要诱因之一（周婷等，2004；Cox-Foster *et al.*，2007；van Engelsdorp and Meixner，2010）。在目前已分离

* 资助项目：现代农业产业技术体系建设专项资金资助（CARS-45-KXJ6）

**E-mail: jhuiru@163.com

***通讯作者，E-mail: ztapis@263.com

收稿日期：2013-12-24，接受日期：2014-03-07

确认的 20 种蜜蜂病毒中（Bromenshenk *et al*.，2010），有研究表明，以色列急性麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus，IAPV）、囊状幼虫病毒（Sacbrood bee virus，SBV）、残翅病毒（Deformed wing virus，DWV）、急性麻痹病毒（Acute bee paralysis virus，ABPV）、黑蜂王台病毒（Black queen cell virus，BQCV）以及慢性麻痹病毒（Chronic bee paralysis virus，CBPV）这 6 种病毒引起的病毒病可能是造成蜂群数量下降的主要原因（Chen and Siede，2007），因此，在各国对蜜蜂病毒病的研究中，这 6 种病毒的流行病学调查是近年研究的热点。中国是一个养蜂大国，同时也是各种蜂病的多发区域，但长期以来我国在蜂病研究方面相对落后，而在蜜蜂病毒学研究方面几乎处于空白状态。随着蜜蜂病毒学成为研究的热点领域，近年我国已有一些关于蜜蜂病毒病调查研究的初步报道。2011 年，Ai 等在中国 18 个省市的意蜂蜂场及中华蜜蜂蜂场采集实验样本，应用 RT-PCR 技术对 IAPV、SBV、DWV、ABPV、BQCV、CBPV 以及克什米尔病毒（Kashmir bee virus，KBV）在中国的流行情况进行了调查研究，研究结果表明，在意蜂中 DWV 检出率最高，SBV 位于第 2 位，未检测到 KBV，且病毒的混合感染普遍；2012 年 Yang 等以 7 个省市（主要集中于江苏省）的意蜂蜂场采集的样品作为研究对象，调查了包括 7 种病毒在内的 10 种病原体在中国的流行情况等（2011）调查的病毒一致），结果发现 DWV 检出率最高，未检测到 ABPV 和 KBV；2012 年 Li 等在调查了 15 种病原体其中包括 6 种病毒（IAPV、SBV、DWV、ABPV、BQCV、CBPV）对中国 19 个省市中华蜜蜂的侵染情况，研究发现只检测到 BQCV 和 DWV。现阶段对于蜜蜂病毒的检测大多采用单重 RT-PCR 方法，但近年大量研究表明，现今蜂群中的病毒感染多呈现为混合感染（Chen *et al*.，2004；Ellis and Munn，2005；Tentcheva *et al*.，2004b），因此，本研究采用能够在同一 PCR 体系中对多种病毒进行检测的多重 RT-PCR 技术进行蜜蜂病毒病的检测。目前国内还未见多重 RT-PCR 技术应用于蜜蜂病毒病检测的相关报道。北京养蜂历史悠久，是我国现代养蜂业的发源地之一。近年在市、区县政府的扶持下，北京市养蜂业蓬勃发展，已成为全市农林产业的重要组成部分，带来了巨大的经济效益和生态效应。然而，近年每到春季北京地区蜜蜂不明原因的爬蜂非常严重，与已报道的蜜蜂病毒病很相似，这已成为制约北京地区养蜂业进一步发展的重要因素，但对于该地区蜜蜂病毒病的流行情况还未见系统调查。为此，本文以于 2013 年流蜜期在北京养蜂重点区域（密云县、门头沟、昌平区、怀柔区）的 30 个蜂场采集的疑似健康蜂群样品为研究对象，应用 Sguazza 等（2013）建立的多重 RT-PCR 方法调查 IAPV，SBV，DWV，ABPV，BQCV，CBPV 这 6 种病毒在北京地区的流行情况，以期为该地区蜜蜂病毒病的防控提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　样品采集　2013 年 7 月末从北京 4 个区 30 个蜂场中采取 30 份样品，其中 10 份采自密云县，10 份采自怀柔区，5 份采自昌平区，5 份采自门头沟区。所有样品都是在看似健康的蜂群中随机采集，采集的样品为成年工蜂，然后带回实验室保存于–70℃冰箱备用。

1.1.2　主要试剂　总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 invitrogen 公司，反转录试剂盒（A5000）购自 Promega 公司，*Taq* 酶为 Promega 公司产品，2×Taq PCR Mastermix，6×RNA/DNA loading buffer 等 PCR 反应试剂为博迈德生物公司产品。

1.1.3　主要仪器设备　高速冷冻离心机（Eppendorf 5417R），移液枪（Eppendorf 公司产品），电泳仪（北京六一仪器厂产品），PCR 仪（Eppendorf），凝胶成像系统，微型振荡器、恒温水浴锅等。

1.2　总 RNA 的提取

根据 Wang 等（2003）的方法，用 Trizol 提取蜜蜂总 RNA，作为待测的病毒 RNA。具体

操作步骤如下：取整只蜜蜂（约 100 mg），放入 1.5 mL 离心管中；取液氮加入离心管中用匀浆器充分研磨，研磨充分后加入 1 mL Trizol 混匀（旋涡震荡混匀），静置 5 min；加入 200 μL 氯仿，振荡摇匀（用手剧烈摇晃 15 s），室温静置 3~5 min；4℃，12 000 g，离心 15 min；这时样品主要分成三层，RNA 主要在上层水相中，取上清液于新离心管中，并加入等量预冷的异丙醇，静置 10 min；4℃，12 000 g，离心 10 min；弃上清，加 75%乙醇 1 mL 洗涤沉淀（旋涡震荡使沉淀离开管底漂浮起来）；4℃，7 500 g，离心 5 min；弃上清，干燥 5~10 min；根据提取的 RNA 的量加 20~50 μL DEPC water 于离心管中，放在 55℃水浴 10 min，迅速冰浴 5 min，稍离心。用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量并用 NanodropND-2000 分析其浓度和纯度，最终将 RNA 置于–70℃冰箱中保存备用。

1.3 引物的设计与合成

检测 IAPV、DWV、SBV、ABPV、BQCV、CBPV 这 6 种病毒的引物参照 Sguazza 等（2013）设计的序列（表 1），由北京华大基因科技有限公司合成。

1.4 cDNA 的合成

以提取的总 RNA 为模板，按照 Promega 公司 A500 反转录试剂盒说明书，逆转录合成 cDNA。反转录体系（20 μL）：总 RNA 4 μg，随机引物 2 μL，10×反转录缓冲液 4 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL，10 mmol/L dNTPs1 μL，20 U/μL RNA 抑制剂 0.4 μL，200 U/μL MMLV 反转录酶 1 μL，DEPC 处理水补足 20 μL。反应条件为：25℃ 10 min，42℃ 60 min，70℃ 15 min，4℃保存。

1.5 多重 PCR

以合成的 cDNA 第一链为模板，参照 Sguazza 等（2013）建立的多重 PCR 方法对 6 种病毒同时进行诊断。反应体系（25 μL）：取 4 μL 合成的 cDNA 作为反应模板，10×PCR buffer（Promega）2.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μL（同 buffer 一起提供），5 U/μL *Taq*DNA 聚合酶

表 1 6 对引物的序列

Table 1 The sequences of the six primer pairs

病毒 Virus	引物序列（5′-3′） Primer sequences	目的片段长度（bp） Product length (bp)
IAPV	GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA	158
	GGGAGTATTGCTTTCTTGTTGTG	
DWV	TGGTCAATTACAAGCTACTTGG	269
	TAGTTGGACCAGTAGCACTCAT	
SBV	CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATT	342
	AGATTCCTTCGAGGGTACCTCATC	
ABPV	GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA	460
	ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA	
BQCV	CTTTATCGAGGAGGAGTTCGAGT	536
	GCAATAGATAAAGTGAGCCCTCC	
CBPV	AACCTGCCTCAACACAGGCAAC	774
	ACATCTCTTCTTCGGTGTCAGCC	

（Promega）0.5 μL，10 mmol/L Dntp 0.5 μL，6 种病毒的上游和下游引物各 1.25 μL。反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 45 s，共 39 个循环；72℃再延伸 10 min。PCR 反应结束后，用 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.6 单重 PCR

挑选部分样品应用单重 PCR 技术对结果进行验证，用 6 种病毒的特异性引物分别进行 PCR 反应。反应体系为：模板 1 μL，10 μmol/L 病毒的上游引物和下游引物各 1 μL，2×MasterMix（博迈德公司产品）12.5 μL，ddH_2O 9.5 μL，共 25 μL。反应条件为：94℃ 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 1 min，共 39 个循环；72℃再延伸 10 min。PCR 反应结束后，用 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.7 PCR 产物的测序及序列分析

将部分电泳检测结果中条带较亮的样品的 PCR 产物送至博迈德生物公司测序，利用 NCBI 中 Blast 软件将各种病毒的测序结果同 GenBank 中已发表序列进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

琼脂糖凝胶电泳检测提取的样品总 RNA 的质量（图 1），用 NanodropND-2000 测得 30 份样品的 RNA 浓度处于（860.5±57.1）ng/μL 这一范围内，A_{260}/A_{280} 在 1.87~2.2 之间，符合进行 RT-PCR 反应的要求。

2.2 RT-PCR 检测结果

对所收集的 30 份样品应用多重 RT-PCR 方法进行 6 种病毒的检测结果，经 2.5%琼脂糖电泳分析，在 158、269、342、460 和 536 bp 处获得目的条带（图 2），再经单重 RT-PCR 方法进行验证，结果一致，同样获得预期的扩增片段（图 3）。与扩增片段大小相对应的 4 种病毒分别是 IAPV、DWV、SBV、和 BQCV。

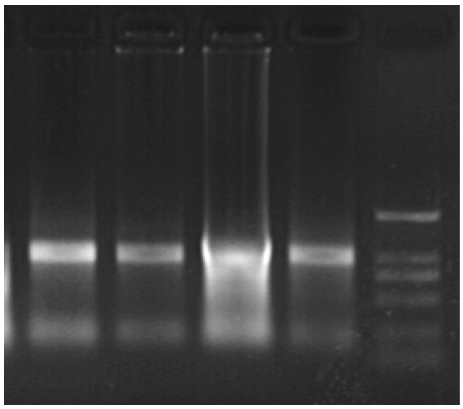

图 1 部分样品的 RNA 电泳结果
Fig. 1 The electrophoresls result of RNA

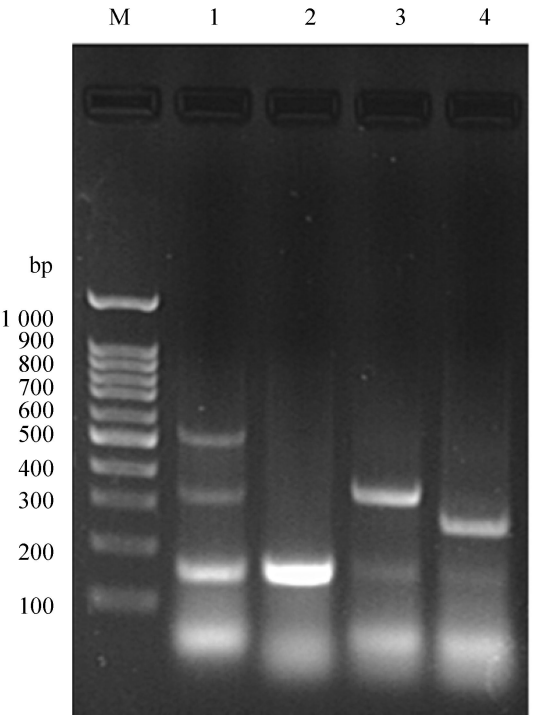

图 2 多重 PCR 同时检测多种病毒
Fig. 2 Simultaneous detection of multiple bee viruses

* 资助项目：现代农业产业技术体系建设专项资金资助（CARS-45-KXJ6）
**E-mail: jhuiru@163.com
***通讯作者，E-mail: ztapis@263.com
收稿日期：2013-12-24，接受日期：2014-03-07

by multiplex PCR.

M: DNA marker；泳道 1：同时感染 BQCV (536 bp)，BV(342 bp)和 IAPV(158 bp)；泳道 2：仅感染 IAPV(158 bp)；泳道 3：协同感染 SBV(342 bp)和 IAPV(158 bp)；泳道 4：协同感染 DWV (269 bp)和 IAPV(158 bp)。

Lane1: detection of a mixed infection by BQCV (536 bp), SBV(342 bp) and IAPV(158 bp); Lane 2:detection of a single infection by IAPV(158 bp); lane 3: detection of a co-infection by SBV(342 bp) and IAPV(158 bp); lane 4: detection of a co-infection by DWV (269 bp) and IAPV(158 bp); M: 100 bp DNA ladder.

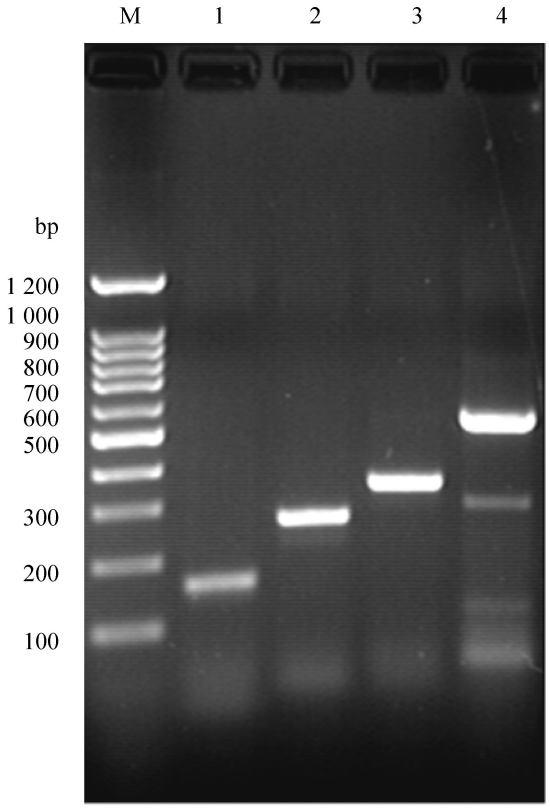

图 3 单重 PCR 扩增 4 种病毒结果（泳道 1~4）

Fig. 3 Amplification of four bee virus by simplex PCR (lanes 1-4)

M:DNA marker；泳道 1：IAPV (158 bp)；泳道 2：DWV (269 bp)；泳道 3：SBV (342 bp)；泳道 4：BQCV (536 bp)。

Lane 1: IAPV (158 bp); Lane2: DWV (269 bp); Lane 3: SBV (342 bp); Lane4: BQCV (536 bp); M: 100 bp molecular marker.

2.3 蜂群染病情况

在 30 份样品中未检测到 ABPV 和 CBPV。检出的 4 种病毒中，IAPV 感染率最高，然后依次是 DWV、SBV、和 BQCV，同时所检样本普遍为混合感染，87%的样品被两种或两种以上的病毒混合感染，具体结果如表 2 所示。

2.4 序列分析

用 NCBI 中 Blast 软件进行序列比对，结果如下：

2.4.1 用 IAPV 的特异性引物扩增出的 158 bp 目的片段的测序序列，与 2008 年测得的在中国分离的 IAPV（GenBank 登录号 HQ897161.1）的全基因序列的同源性 99%。

2.4.2 用 DWV 的特异性引物扩增出的 269 bp 目的片段的测序结果，与在中国分离得到的 DWV 的 VP3 基因（GenBank 登录号分别为 AB721538.1 和 AB721539.1）序列的同源性 100%。

2.4.3 用 SBV 的特异性引物扩增出的 342 bp 目的片段，测序结果与 SBV 的 SBM2 毒株、S2 毒株、K3A 毒株的全基因（GenBank 登录号分别是 KC007374.1、JX270799.1、JX270798.1）的同源性分别为 97%、96%、96%。

2.4.4 用 BQCV 的特异性引物扩增出的 536 bp 目的片段，测序结果与在中国分离出的 BQCV 的 VP 基因的序列（GenBank 登录号分别是 AB723729.1 AB723730.1、AB723739.1、AB723728.1、AB723733.1、AB723731.1、AB723734.1 AB723737.1）的同源性均 99%。

3 讨论

3.1 据报道现今蜂群中的病毒感染多呈现为混合感染（Chen *et al.*，2004；Tentcheva *et al.*，2004b；Ellis and Munn，2005），因此，能够在同一 PCR 体系中对多种病毒进行检测的多重 RT-PCR 技术开始应用于蜜蜂病毒病的检测。Grabensteiner 等（2007）建立了能同时检测蜜蜂的 ABPV，BQCV 和 SBV 的多重 RT-PCR 方法；Meeus 等（2010）建立了能在在同一反应中检测熊蜂 ABPV，KBV，IAPV 和 DWV 的多重 RT-PCR 方法；Carletto 等（2010）则

应用 4 种多重 PCR 技术实现了对蜜蜂 14 种病原体的检测，其中 7 种是病毒；Sguazza 等（2013）建立的能够同时检测 IAPV，SBV，DWV，ABPV，BQCV，CBPV 这 6 种蜜蜂病毒的多重 PCR 方法。多重 RT-PCR 方法能够实现对多种隐形感染的病毒的快速检测且具有高度的特异性、敏感性等优点，有效弥补了传统蜜蜂 RNA 病毒病检测方法的不足，对于蜜蜂病毒病的防治具有重要意义。

表 2　应用 RT-PCR 在北京蜂群中 IAPV，DWV，SBV 和 BQCV 4 种病毒的检出率

Table 2　The presence of IAPV, DWV, SBV and BQCV from Beijing apiaries by RT-PCR

样品	病毒 Bee viruses				M/S
Sample	IAPV	DWV	SBV	BQCV	
MY1	+	+	−	−	M
MY2	+	−	+	+	M
MY3	+	+	−	−	M
MY4	+	−	−	−	M
MY5	+	−	+	−	M
MY6	+	+	−	+	M
MY 7	+	−	+	−	M
MY 8	+	+	+	−	M
MY 9	+	−	+	+	M
MY10	+	+	+	−	M
HR1	+	+	+	−	M
HR2	+	−	−	−	S
HR3	+	+	+	−	M
HR4	+	+	−	+	M
HR5	+	+	+	−	M
HR6	−	+	+	+	M
HR7	+	−	+	+	M
HR8	+	+	−	+	M
HR9	−	+	−	−	S
HR10	+	+	+	−	M
CP1	+	+	−	−	M
CP2	+	−	+	−	M
CP3	+	+	−	−	M
CP4	+	+	−	−	M
CP5	+	−	−	−	S
MTG1	+	−	−	+	M
MTG2	+	+	−	−	M
MTG3	+	+	+	−	M
MTG4	+	−	−	+	M

MTG5	+	−	−	−	S
感染率 Infection rate	93%	60%	47%	30%	M:87%;S:13%

MY：密云县；HR：怀柔区；CP：昌平区；MTG：门头沟；“ – ”代表 阴性 、“ + ”代表阳性；“ M ”代表混合感染、“ S ”代表单纯感染。

MY: Miyun HR: Huairou; CP: Changping; MTG: Mentougou; “ – ”: Negative, “ + ”: Positive; “ M ”: Multiple infection, “ S ”: Single infection.

3.2 在本研究中以色列急性麻痹病（IAPV）感染率最高为 93%，几乎所有样品都感染了该病毒。2007 年 IAPV 才在以色列被首次分离鉴定，而其不仅发病症状与急性麻痹病相似，而且生物学和系统发育学也与急性麻痹病毒相近，甚至于在核酸序列上与急性麻痹病毒也有很高的同源性，因此称为以色列急性麻痹病（Maori *et al.*，2007）。自 2008 年 IAPV 在中国广东省被检出后（Yan *et al.*，2009），在随后的有关蜜蜂病毒病在中国流行病学调查中，均有检出 IAPV（Ai *et al.*，2012；Yang *et al.*，2013），但还是首次测得如此高的感染率。有研究表明，瓦螨可能是 IAPV 的载体（Maori *et al.*，2009），而通过采样时实地考察以及与蜂农的交流得知，近年北京地区养蜂场蜂螨危害严重，所以这可能是导致北京地区 IAPV 检出率高于其他地区的原因之一。

有调查显示 IAPV 与群衰竭失调病症（Ccolony collapse disorder，CCD）之间具有强相关性（Cox-Foster *et al.*，2007），虽然不是所有 CCD 蜂群中都存在 IAPV，但该病毒是引起 CCD 的一个重要原因是毋庸置疑的。CCD 是一种新发现的疾病，自 2006 年报道以来，全世界的养蜂业都遭受重创，目前在中国还未发现该病。IAPV 与 CCD 的强相关性使得我们在该地区对该病防治上应给予高度重视。因该病毒与大蜂螨共生情况下对蜜蜂构成更大威胁，因此防螨很关键。

3.3 在本研究中残翅病毒（DWV）以 60%的感染率位于第 2 位，DWV 在意蜂中的高发性在许多国家均有报道（Tentcheva *et al.*，2004a；Berenyi *et al.*, 2006；Baker and Schroeder，2008），且中国的流行病学调查中（Ai *et al.*，2012；Yang *et al.*，2013），DWV 感染率位居首位，所以在对北京地区的样品检测中 DWV 的高感染率是及其正常的。

DWV 可侵染蜜蜂的所有发育阶段，是少见的几种导致寄主发病后有明显临床症状的病毒之一，发病成蜂主要变现为翅卷曲变皱，若蜜蜂蛹期时感染该病毒则会在在羽化时出现翅残缺（Bowen-Walker et al.，1999；Yue and Genersch，2005），但蜜蜂残翅病的流行与爆发的一个重要刺激因素是蜂群中有狄氏瓦螨即大蜂螨寄生，隐形感染的 DWV 会在大蜂螨作用下被激活从而呈现显性感染，当蜂群中无螨寄生时该病毒致病性极低（Gisder *et al.*，2009），已有研究表明瓦螨与 DWV 联合作用是导致蜂群过冬损失的关键因素（Dainat *et al.*，2012；Nazzi *et al.*，2012）。因此，认真做好该病防控工作对于蜂群的安全越冬具有重要意义，而防治该病的关键是治螨。

3.4 在本研究中蜜蜂囊状幼虫病毒（SBV）的检出率为 47%，据流行病学研究该病毒对西方蜜蜂危害不大，但它对中华蜜蜂而言却是一种毁灭性的传染病，蜂群一旦感染此病，可见幼虫大量发病死亡，蜂群断子、飞逃。

近年来中蜂囊状幼虫病在广东、福建、浙江、山西、河南、湖北、湖南、辽宁、贵州、四川、北京等 25 个省市发病较重，对我国中蜂饲养造成严重打击。按照蜜蜂生物学规律，在中国中蜂一般定地饲养，而西方蜜蜂处于转地放蜂流动性大。因此提示，转地放蜂的西方蜜蜂是中蜂囊状幼虫病的传播媒介，从而造成中蜂囊幼病在中国的大面积流行，但这一传播媒介的具体作用机制有待进一步的研究。

3.5 在本研究中黑蜂王台病毒（BQCV）检出

率为 30%，该病毒通常以一种无病症的隐性感染方式长期存在于被感染蜂群的成蜂或幼虫体内。当蜂群中有蜜蜂微孢子虫侵染时，该病毒就会被激活，从隐形感染转化为有明显症状的显性感染，典型症状为患病幼虫体色变黄，表皮逐渐硬化为一层坚韧的囊状外表皮，感染该病的幼虫死亡后会迅速变为黑色，最后，甚至将王台内壁染成棕色或黑色。鉴于 BQCV 与微孢子虫之间的密切关联，严格控制蜜蜂微孢子虫对蜂群的侵染是控制此疾病的主要防治措施（Allen and Ball, 1996；Ribiere *et al*.，2008）。

3.6　在前人有关蜜蜂病毒病在中国流行病学研究中 ABPV 和 CBPV 均有检出（Ai *et al*.，2012；Yang *et al*.，2013），而在本研究的所有检测样本中均未检测到 ABPV 和 CBPV，这可能是由于检测地域的差异，北京地区蜂群确实不存在这两种病毒，但也可能是检测样本的数量限制导致的，为确切说明问题，后期还需进一步进行样品的收集与检测。

4　结论

30 份样品检测结果显示，在所有样品中均未检测到 ABPV 和 CBPV，IAPV（93%）感染率最高，然后依次是 DWV（60%），SBV（47%），BQCV（30%），只有 13%蜂群单纯感染某种病毒，90%都是混合感染的现象，对 PCR 产物经序列测定分析后，确定确实检测到这 4 种病毒。说明这 4 种病毒可能在北京地区广泛分布，由于目前检测样品数量的限制还不能确切说明问题，还需进一步进行临床样品的收集与检测。

参考文献 (References)

Ai H, Yan X, Han R, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invert. Pathol.*, 109: 160–164.

Allen MF, Ball BV, 1996. The incidence and worldwide distribution of the honeybee virus. *Bee World*, 77(3): 141–162.

Baker AC, Schroeder DC, 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J. Invert. Path*., 98(2): 239–242.

Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglberger H, Nowotny N, 2006.Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol*., 72(4): 2414–2420.

Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees(*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invert. Pathol.*, 73(1): 101–106.

Bromenshenk JJ, Henderson CB,Wick CH , Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW, Cramer RA, 2010．Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE*, 5(10): e13181．

Carletto J, Gauthier A, Regnault J, Blanchard P, Schurr F, Ribière-Chabert M, 2010. Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *EuroReference*, (4): 13–15.

Chen YP, Siede R, 2007. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res*., (70): 33–80.

Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu HT, Evans JD, Feldlaufer MF, 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J.Invert. Pathol.*, 87(2): 84–93.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes E, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp 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.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012. Dead or alive: deformed wing virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbial*., 78(4) : 981–987.

Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4): 88–101.

Gallai N, Sallesc JM, Setteled J, Vaissie`rea BF, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.*, 68(3): 810–821.

Gisder S, Aumeier P, Genersch E, 2009. Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 90(2): 463–467.

Grabensteiner E, Bokonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N, 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee *(Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, black queen cell virus and Sacbrood

virus. *J. Invert. Pathol.*, 94(3): 222–225.

Li J, Qin HR, Wu J , Sadd BM, Wang XH, Evans JD, Peng WJ, Chen YP, 2012 . The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE*, 7(11), e47955.

Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007． Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination．*J. Gen. Virol.*, 88(12): 3428–3438.

Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I, 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with colony collapse disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol*., 18 (1): 55–60.

Meeus I, Smagghe G, Siede R, Jans K, de Graaf DC, 2010. Multiplex TR-PCR with broad range primers and an exogenous internal amplification control for the detection of honeybee viruses in bumblebees. *J. Invert. Pathol.*, 105(2): 200–203.

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Vedova GD, Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F, 2012. Synergistic parasite pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog*, 8(6): e1002735.

Ribiere M, Ball BV, Aubert M, 2008．Natural history and geographic distribution of honey bee viruses //Aubert M, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, Bernardinelli I (eds.) .Virology, and the Honey Bee. Luxembourg: European Communities. 15–84．

Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, Pecoraro MR, 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 194(1): 102–106.

Tentcheva D, Gauthier L, Jouve S, Canabady-Rochelle L, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Ball BV, Bergoin M, 2004a. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4): 431–439.

Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004b. Seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol*., 70(12): 7185–7191.

Yan X, Liu X, Chen J, Zhang Y, Han R, 2009a. First detection of Israel acute paralysis virus (IAPV) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in China. *Sociobiology*, 54 (1): 95–100.

Yang B, Peng GD, Li TB, Tatsuhiko K, 2013. Molecular and Phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecology and Evolution*, 3(2): 298–311.

Yue C, Genersch E, 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees(*Apis mellifer*a) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 86(12): 3419–3424.

van Engelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(1): 80–95.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003． Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1) : 115–124.

周婷, 姚军, 兰文升 , 温建新, 王 强, 2004. 蜜蜂 KBV 和 APV 病毒 RT-PCR 检测技术研究. 畜牧兽医学报, 35(4): 459–462. [ZHOU T, YAO J, WEN JX, WANG Q, 2004. Study on detection of Kashmir Bee Virus and Acute Paralysis Virus by RT-PCR in honeybees. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 35(4): 459–462.]