



## 生物实验室

## 检测蜜蜂急性麻痹病毒 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 方法的建立和初步应用

张体银<sup>\*1</sup> 黄嫦娇<sup>1</sup> 田国宁<sup>2</sup> 林素洁<sup>1</sup> 王武军<sup>1</sup> 张志灯<sup>1</sup>

1 福州海关技术中心 福建省检验检疫技术研究重点实验室 福建 福州 350003

2 潍坊海关技术中心 山东 潍坊 261041

**摘要:**【背景】蜜蜂急性麻痹病毒(Acute Bee Paralysis Virus, ABPV)是一种高毒力的蜜蜂病毒,可以引起蜜蜂的大批死亡和蜂群衰竭。【目的】建立一种快速、灵敏的 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法。【方法】根据 ABPV 衣壳蛋白基因保守序列设计引物和探针,通过对引物、探针浓度和退火温度等反应条件进行优化,建立基于 TaqMan 探针检测 ABPV 的实时荧光 RT-PCR 方法,并对方法的灵敏性、特异性和稳定性进行验证。【结果】ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法在  $9.8 \times 10^1$ – $9.8 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L 之间呈现良好的线性关系,线性相关系数  $R^2$  为 0.998,扩增效率为 103.8%。该方法的检测灵敏度为 9.8 copies/ $\mu$ L; 对其他蜜蜂病毒不发生交叉反应,具有良好的特异性;重复性试验结果显示组内和组间的变异系数分别为 0.19%–0.80%和 0.57%–1.07%,重复性良好。对 2018 年–2019 年在福建地区采集的 70 份蜜蜂样品进行 ABPV 检测,阳性率为 2.86%。【结论】建立的 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法能用于该病的实验室检测、流行病学调查和疫情监测。

**关键词:** 蜜蜂急性麻痹病毒, 实时荧光 RT-PCR, 衣壳蛋白基因

## Establishment and preliminary application of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for detecting acute bee paralysis virus

ZHANG Tiyan<sup>\*1</sup> HUANG Changjiao<sup>1</sup> TIAN Guoning<sup>2</sup> LIN Sujie<sup>1</sup> WANG Wujun<sup>1</sup>  
ZHANG Zhideng<sup>1</sup>

1 Fujian Provincial Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Technology Center of Fuzhou Customs, Fuzhou, Fujian 350003, China

2 Technology Center of Weifang Customs, Weifang, Shandong 261041, China

**Abstract:** [Background] Acute bee paralysis virus (ABPV) is a highly virulent bee virus that causes the death of honeybee and colony exhaustion. [Objective] This experiment was conducted to develop a rapid and sensitive real-time RT-PCR method for the detection of ABPV. [Methods] The primers and probe were designed according to the conservative sequence of capsid protein gene of ABPV registered in GenBank. By optimizing the reaction conditions such as primers, probe concentration, and alternating temperature, a

**Foundation items:** Foreign Cooperation Projects of the Fujian Province (2018I0022); Science and Technology Project of Fuzhou Customs (FK2020-21)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-591-87065537; E-mail: zhty5337@163.com

**Received:** 13-03-2021; **Accepted:** 29-03-2021; **Published online:** 14-04-2021

**基金项目:** 福建省对外合作项目(2018I0022); 福州海关科技计划项目(FK2020-21)

**\*通信作者:** Tel: 0591-87065537; E-mail: zhty5337@163.com

**收稿日期:** 2021-03-13; **接受日期:** 2021-03-29; **网络首发日期:** 2021-04-14

detection method for ABPV based on TaqMan probes was successfully established, and the sensitivity, specificity and stability of the method were tested. **[Results]** The real-time RT-PCR assay showed a good linear relationship between  $9.8 \times 10^1$ – $9.8 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$ , linear correlation coefficient  $R^2$  was 0.998, and amplification efficiency was 103.8%. The sensitivity limit of the method was 9.8 copies/ $\mu\text{L}$ , and there was no cross-reaction with other honey bee viruses, which represents showing high sensitivity and specificity. The coefficient of variation (CV) for intra-assay and inter-assay repeatability were 0.19%–0.80% and 0.57%–1.07% respectively. In 70 samples of honey bee collected from Fujian regions in 2018 and 2019, the ABPV detection rate was 2.86%. **[Conclusion]** The ABPV real-time RT-PCR detection method can be used for laboratory testing, epidemiological investigation and epidemic monitoring.

**Keywords:** acute bee paralysis virus, real-time RT-PCR, capsid protein gene

授粉昆虫是维护自然界生物多样性和发展农业生产的一个关键因子, 蜜蜂作为其中最重要的一个群体, 在长期的适应性进化中形成了独特的授粉优势, 已成为自然生态链环中不可缺少的重要组成部分, 世界上 80% 的被子植物属于虫媒植物, 总数大约有 3 万种, 其中 17 000 种需要通过蜜蜂来传播授粉<sup>[1]</sup>。我国拥有丰富的蜜蜂资源, 仅本土蜂种就有 5 种, 另外还引进了西方蜜蜂蜂种, 东方蜜蜂和西方蜜蜂饲养量均居世界首位, 所以蜂群的健康发展对于我国的生态平衡和农业生产具有十分重要的意义<sup>[2]</sup>。

但是, 近几十年来世界范围内蜜蜂种群数量急速下降, 损失将近 100 多万群蜜蜂, 导致了全球农业生产的授粉危机<sup>[3-5]</sup>。在造成蜜蜂种群迅速减少的原因中, 病毒性疾病被认为是主要因素, 是引发蜜蜂蜂群大量死亡及蜂群衰竭的关键原因<sup>[6-7]</sup>。目前在蜜蜂体内发现的病毒已经有 30 多种, 其中最常见、最具危害性的主要有 7 种, 包括蜜蜂急性麻痹病毒(Acute Bee Paralysis Virus, ABPV)、黑蜂王台病毒(Black Queen Cell Virus, BQCV)、蜜蜂克什米尔病毒(Kashmir Bee Virus, KBV)、以色列急性麻痹病毒(Israeli Acute Paralysis Virus, IAPV)、囊状幼虫病病毒(Sacbrood Virus, SBV)、残翅病毒(Deformed Wing Virus, DWV)、蜜蜂慢性麻痹病毒(Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV)<sup>[8-10]</sup>。ABPV 作为 7 种常见蜜蜂病毒之一, 已被确认为是引起蜜蜂死亡的重要病因, 尤其是和瓦螨共同感染蜂群时, 危害更为严

重<sup>[11-12]</sup>。然而目前对该病毒的研究却是 7 种常见病毒中最少的, 尤其是有关检测技术的报道, 为此, 本研究通过设计特异性的引物和探针, 建立 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法, 为该病的诊断、流行病学调查和疫情监测提供一种快速的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

ABPV 和 BQCV 由长春海关技术中心提供; CBPV、KBV 和 DWV 由福建农林大学提供; IAPV 由中国农业科学院蜜蜂研究所提供; SBV 由本实验室分离、鉴定并保存。70 份蜜蜂样品为 2018 年–2019 年采自福建省不同地区的养蜂场, 每个蜂群采集 30 只左右表现状态不良、无法飞行、在蜂箱周围爬行的工蜂作为 1 份样品, 采集后放入 RNA 保存液中带回实验室, 充分浸入后–80 °C 保存备用。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

RNA 保存液, 上海碧云天生物技术有限公司; SteadyPure Virus RNA Extraction Kit、Evo M-MLV One Step RT-PCR Kit 和 Evo M-MLV One Step RT-qPCR Kit, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; T7 体外转录试剂盒, 北京百奥莱博科技有限公司; RNeasy mini Kit, QIAGEN 公司。核酸蛋白测定仪, 瑞典安玛西亚公司; PCR 仪, Bio-Metra 公司; 荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

## 1.2 引物、探针的设计与合成

根据 GenBank 公布的 ABPV 衣壳蛋白基因 (Capsid Protein Gene) 序列, 筛选保守基因片段, 应用 Primer Premier 3.0 设计特异性引物和探针, 通过 BLAST 比对检验其特异性后, 选取可扩增出一段约 191 bp 序列的引物 ABPV-F/R 和探针 ABPV-P, 探针 ABPV-P 的 5'端采用荧光基团 FAM 进行修饰, 3'端采用 BHQ1 进行修饰(表 1)。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 用 RNase-Free H<sub>2</sub>O 溶解, 贮存浓度为 100 μmol/L, 使用浓度为 10 μmol/L, -20 °C 保存备用。

## 1.3 核酸提取

将病毒原液或蜜蜂组织样本按照 SteadyPure Virus RNA Extraction Kit 说明书提取核酸, 最后加入 30 μL RNase-Free H<sub>2</sub>O 洗脱吸附柱上的核酸, -80 °C 保存备用。

## 1.4 阳性标准品的制备

以 ABPV RNA 为模板, 使用 Evo M-MLV One Step RT-PCR Kit 进行常规 RT-PCR, PCR 反应体系: One Step Enzyme Mix 1 μL, 2×One Step Reaction Solution 12.5 μL, 上、下游引物 ABPV-F/R (10 μmol/L) 各 1 μL, RNA 模板 2 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 50 °C 30 min; 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。反应结束后, 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像仪观察电泳结果。将扩增的目的片段回收后委托福州尚亚生物技术有限公司合成至 pUC57 质粒上, 按照 T7 体外转录试剂盒说明书进行目的基因的 RNA 体外转录, 利用 RNeasy mini Kit 对 RNA 体外转录产物进行纯化, 最后使用核酸蛋白

表 1 ABPV 实时荧光 RT-PCR 引物和探针序列  
Table 1 Primers and probe sequences for real-time RT-PCR detection of ABPV

Primers and Probes	Sequences (5'→3')	Size (bp)
ABPV-F	TGAATGCAGCGTTCCGAAAT	191
ABPV-R	GCTCCGAGCCGATGAAGTAT	
ABPV-P	ACGCAACTCGCGTCGACCTC	

测定仪测定 RNA 浓度后, 再用 RNase-Free H<sub>2</sub>O 进行 10 倍梯度稀释, 分装后放 -80 °C 保存备用。

## 1.5 实时荧光 RT-PCR 反应体系和反应条件的优化

根据 Evo M-MLV One Step RT-qPCR Kit 说明书, 进行实时荧光 RT-PCR 反应: 42 °C 5 min; 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 60 °C 延伸同时收集荧光信号。在 20 μL 反应体系中 Taq 酶和一步法反应液的量不变, 采用方阵配比试验对上、下游引物终浓度(0.1–1.0 μmol/L)、探针终浓度(0.1–0.5 μmol/L)进行优化。在建立好反应体系的基础上, 根据仪器梯度自动设置, 选择 55.0、55.7、57.0、59.0、61.4、63.3、64.5、65.0 °C 这 8 个梯度对退火温度进行优化, 筛选和优化以最低的 C<sub>t</sub> 值和较高的荧光强度增加值为标准。

## 1.6 标准曲线的建立

将构建的阳性标准品进行 10 倍梯度稀释, 以浓度为 9.8×10<sup>1</sup>–9.8×10<sup>8</sup> copies/μL 的标准品为模板, 按照 1.5 中优化好的反应体系和反应条件进行实时荧光 RT-PCR 试验, 每个梯度做 3 个重复, 反应完成后以模板浓度为横坐标、C<sub>t</sub> 值为纵坐标绘制标准曲线, 给出标准曲线的斜率、截距和扩增效率。

## 1.7 特异性试验

按照 SteadyPure Virus RNA Extraction Kit 说明书分别提取 ABPV、CBPV、KBV、SBV、IAPV、DWV、BQCV 核酸为模板, 根据 1.5 中建立的反应体系和反应条件进行实时荧光 RT-PCR 试验, 验证该方法的特异性。

## 1.8 敏感性试验

分别以 9.8×10<sup>0</sup>–9.8×10<sup>9</sup> copies/μL 的 RNA 标准品作为模板, 按照优化好的反应体系和反应条件进行实时荧光 RT-PCR 试验, 得出该方法的最低检出拷贝数。

## 1.9 重复性试验

以 9.8×10<sup>3</sup>、9.8×10<sup>5</sup>、9.8×10<sup>7</sup> copies/μL 低、中、高 3 个浓度 RNA 标准品作为模板, 进行实时

荧光 RT-PCR 反应, 每个梯度做 3 个重复, 根据  $C_t$  值计算组内变异系数。同样条件下再做 3 次独立的实时荧光 RT-PCR 反应来验证组间的重复性。

### 1.10 蜜蜂样品的检测

对收集的 70 份蜜蜂样品用本研究建立的 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法进行检测, 对检出的阳性样品送福州尚亚生物技术有限公司进行测序, 验证方法的可行性, 了解福建省内 ABPV 流行情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物的特异性

用本研究设计的引物 ABPV-FR 从 ABPV 核酸中扩增出大小约 191 bp 的目的片段(图 1), 扩增产物进行回收后送福州尚亚生物技术有限公司进行测序, 测序结果显示目的片段长度为 191 bp, 大小与预期结果相符, 碱基序列与 GenBank 中收录的 ABPV 序列相似性为 100%。

### 2.2 反应条件和反应体系的优化

通过对引物和探针浓度进行优化, 当改变引物浓度时对  $C_t$  值大小无影响, 提高探针浓度会使  $C_t$  值降低, 但变化不明显; 对于荧光强度, 单独提高引物或探针浓度, 荧光强度变化不明显, 若同时提高引物和探针浓度, 浓度越高, 荧光强度

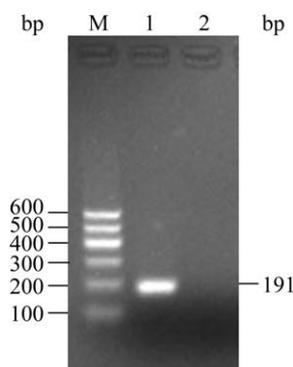


图 1 普通 RT-PCR 扩增的目的片段

Figure 1 Target gene fragment of conventional RT-PCR amplification

注: M: 50 bp DNA Marker; 1: ABPV; 2: 阴性对照

Note: M: 50 bp DNA Marker; 1: ABPV; 2: Negative control

越强, 但扩增反应无明显平台期, 扩增曲线不是标准的“S”型, 综合比较, 选择引物 ABPV-F/R 终浓度为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , 探针 ABPV-P 终浓度为 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 这样既有较强的荧光强度, 还呈现标准的“S”型, 而且  $C_t$  值相对较低, 所以最终确定反应体系为: 2 $\times$ One Step RT-qPCR Buffer 10  $\mu\text{L}$ , Pro Taq HS DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , Evo M-MLV RTase Enzyme Mix 0.4  $\mu\text{L}$ , ABPV-F/R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ), ABPV-P (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.6  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.3  $\mu\text{mol/L}$ ), ABPV 模板 1.0  $\mu\text{L}$ , RNase-Free H<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu\text{L}$ 。退火温度的优化结果显示, 退火温度对  $C_t$  值无明显影响, 但荧光强度随着温度的升高越来越强, 在 63.3  $^{\circ}\text{C}$  时平均荧光强度最高, 因此选择 63  $^{\circ}\text{C}$  为退火温度, 最终反应条件: 42  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 63  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。

### 2.3 标准曲线的建立

用建立的实时荧光 RT-PCR 检测方法对  $9.8 \times 10^1 - 9.8 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  RNA 标准品进行检测, 获得标准曲线方程  $y = -3.234x + 36.710$ , 相关系数  $R^2$  为 0.998, 扩增效率为 103.8% (图 2), 结果表明梯度稀释的标准品与  $C_t$  值之间具有良好的线性关系。

### 2.4 灵敏性试验

用建立好的实时荧光 RT-PCR 方法对  $9.8 \times 10^0 - 9.8 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  的 RNA 标准品进行敏感性试验, 结果显示每个浓度均能得到特异的扩增曲线, 最低检出限为 9.8 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3), 具有较好的灵敏性。

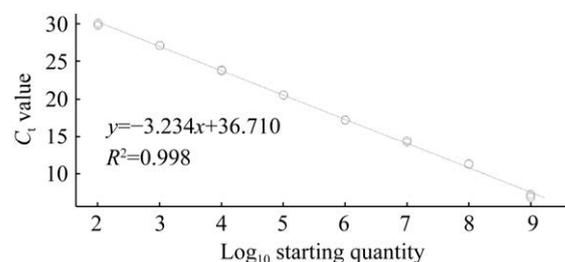


图 2 ABPV 实时荧光 RT-PCR 标准曲线

Figure 2 Standard curve of the real-time RT-PCR for ABPV

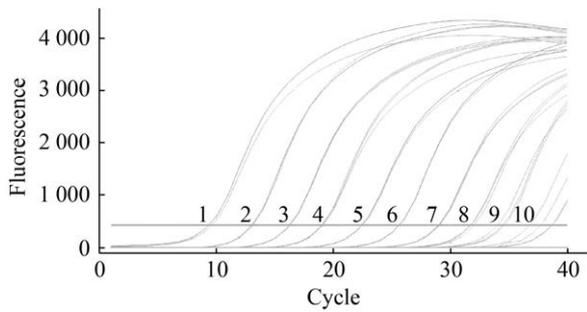


图3 ABPV 实时荧光 RT-PCR 灵敏性试验

Figure 3 Sensitivity of the real-time RT-PCR for ABPV

注: 1-10 分别为 RNA 标准品浓度  $9.8 \times 10^9$ – $9.8 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L  
 Note: 1-10 is a tenfold dilution series of RNA standards ranging from  $9.8 \times 10^9$ – $9.8 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L

### 2.5 特异性试验

应用本研究建立的实时荧光 RT-PCR 方法对 ABPV、CBPV、KBV、SBV、IAPV、DWV、BQCV 核酸样品进行检测, 结果显示, 只有 ABPV 出现特异性扩增曲线, 其他常见蜜蜂病毒均无任何扩增 (图 4), 表明该方法具有良好的特异性。

### 2.6 重复性试验

所建方法的组内变异系数为 0.19%–0.80%, 组间变异系数为 0.57%–1.07% (表 2), 结果均小于 1.5%, 证明本方法具有良好的重复性。

### 2.7 蜜蜂样品检测结果

用本研究建立的 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法对本实验室采集的 70 份蜜蜂样品进行检测, 检测结果显示, 70 份蜜蜂样品中有 2 份为 ABPV 阳性, 检出率为 2.86%。检出的 2 份阳性 PCR 产

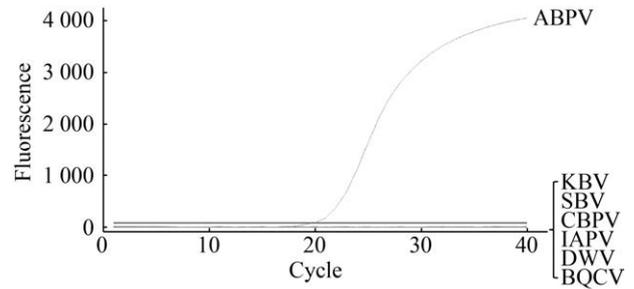


图4 ABPV 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

Figure 4 Specificity of the real-time RT-PCR for ABPV

物经测序证实均为 ABPV 核酸片段, 进一步证明了该方法可用于 ABPV 的检测。

## 3 讨论与结论

ABPV 是 Bailey 等<sup>[13]</sup>在进行 CBPA 传染性试验时发现的, 在试验过程中, 当蜜蜂感染 ABPV 后很快就会死亡, 而感染 CBPA 则能存活数天, 存在明显的区别。ABPV 主要感染西方蜜蜂, 不同发育阶段的蜜蜂均能感染, 蜜蜂被感染后很快会出现麻痹症状, 无法飞行, 然后 1–2 d 后死亡。ABPV 除了能感染西方蜜蜂外, 还能感染巴西蜜蜂且感染率可达 100%<sup>[14]</sup>。另外 ABPV 还可以感染多个熊蜂蜂种, 给蜂类带来极大危害<sup>[15]</sup>。ABPV 一般情况下并不引起明显的发病症状, 多数呈隐性感染, 但是当和狄斯瓦螨协同感染时, 可导致蜜蜂的大批死亡。狄斯瓦螨还是病毒的传播媒介, ABPV 通过狄斯瓦螨进入到寄主的血淋巴中, 加快了蜜蜂的死亡<sup>[16]</sup>。东方蜜蜂对 ABPV 不易感, 引起死亡的

表2 ABPV 实时荧光 RT-PCR 重复性试验

Table 2 Repeatability test of the real-time RT-PCR for ABPV

RNA 浓度 Concentration of RNA (copies/ $\mu$ L)	$C_t$			$C_t$ 平均值 Mean $C_t$	标准偏差 SD	变异系数 CV	
	1	2	3				
组内 Intra-assay	$9.8 \times 10^7$	14.94	14.93	14.69	14.85	0.12	0.80
组间 Inter-assay	$9.8 \times 10^5$	21.05	20.96	21.06	21.02	0.04	0.19
	$9.8 \times 10^3$	27.56	27.47	27.61	27.55	0.06	0.22
组内 Intra-assay	$9.8 \times 10^7$	14.85	15.14	14.76	14.92	0.16	1.07
	$9.8 \times 10^5$	21.02	21.24	20.97	21.08	0.12	0.57
组间 Inter-assay	$9.8 \times 10^3$	27.55	27.82	27.42	27.60	0.17	0.62

事件报道不多,但西方蜜蜂是 ABPV 等多种病毒的感染对象,十分易感,我国有着丰富的蜜蜂蜂种资源,东方蜜蜂虽然是我国的主要本土蜂种,但随着西方蜜蜂的引入,国内西方蜜蜂的保有量已经超过东方蜜蜂,占到总数的三分之二左右<sup>[2]</sup>。因此,为了维护蜂群的健康发展和生态平衡,要加强对 ABPV 的监测和流行病学调查,做到早发现,早防治。

ABPV 的流行与暴发会给养蜂业和自然生态造成巨大损害,而且同其他动物病毒病一样,无法进行有效的药物治疗。然而蜜蜂病毒的多样性和长期以低浓度隐性感染的方式广泛存在导致蜂群中病毒病难以诊断<sup>[17]</sup>。蜜蜂个体或群体内较低的蜜蜂病毒携带量并不对蜂群造成明显的危害,但一旦被外界压力激活,随即快速增殖,造成疾病暴发与流行<sup>[10]</sup>。因此最有效的预防措施就是建立灵敏、特异的检测和诊断技术,定期对蜂群进行监测,实时掌握蜂群健康状态。常见的蜜蜂疾病诊断技术包括临床诊断、显微镜形态学观察、基于免疫学的 ELISA 抗体检测技术和病原核酸检测技术。由于蜜蜂病毒病的隐性感染,典型的发病症状并不多见,无法通过临床症状进行诊断,而且一旦出现明显的症状,疫病已经无法控制。ELISA 检测技术由于灵敏度高等优点多被用于抗体的检测,但是由于蜜蜂病毒间具有高度的基因同源性,如 ABPV 和 IAPV 间达 65%、ABPV 和 KBV 间达 67%,容易发生交叉反应,特异性不强,使得这一技术无法用于检测蜜蜂病毒并进一步推广应用<sup>[18]</sup>。实时荧光 PCR 技术由于灵敏度高、特异性强、简捷、快速等优点,已成为病原体检测的首选方法。

目前,针对 ABPV 的分子生物学检测方法主要有 Kukielka 等建立的双重 RT-qPCR 方法,可以同时检测 SBV 和 ABPV,但灵敏度不高,只有 389 copies/ $\mu\text{L}$ <sup>[19]</sup>; Jamnikar 等建立的 TaqMan 探针 RT-PCR 灵敏度又进一步提高,也只能达到 44 copies/ $\mu\text{L}$ ,不适于对低浓度隐性感染蜂群的检测<sup>[20]</sup>; Kim 等建立的巢式超快速 PCR 方法,整个

扩增过程需要 50 min 左右,但灵敏度有所降低,最低检测限只有 100 copies/ $\mu\text{L}$ <sup>[21]</sup>。本研究基于 ABPV 衣壳蛋白基因保守序列建立的实时荧光 RT-PCR 方法,灵敏度可达到 9.8 copies/ $\mu\text{L}$ ,有了明显提高,与其他常见的 6 种蜜蜂病毒无交叉反应,特异性良好,重复性试验结果组内、组间变异系数均小于 1.0%和 1.5%,具有良好的稳定性,包括 RNA 提取在内,整个检测过程也不会超过 2 h,可以用于 ABPV 的快速检测。

对于蜜蜂样品的检测,本研究 ABPV 的检出率为 2.86% (2/70),而丁桂玲等<sup>[2]</sup>和 Hassanyar 等<sup>[22]</sup>在福建地区内均未检出。检出率不同的主要原因可能是采样个体不同,本研究采集的蜜蜂主要是状态不良、无法飞行的个体,可能已经受到病虫害的侵袭或者生长状态不佳,更容易受到 ABPV 的侵害,而后者主要采自健康蜂群,无明显症状,不带毒或者病毒含量低。另外也有可能跟采样时间、采样地点和检测方法有关,尤其是检测方法,本研究建立的检测方法灵敏度相对于普通 RT-PCR 方法有明显提高,不易漏检。但总体来说,相对于其他地区,福建省内 ABPV 的感染率不算太高,但也不能掉以轻心,受到不良环境或其他因素的影响,也存在进一步暴发的可能。ABPV 等蜜蜂病毒病的流行与暴发导致每年大量蜂群丧失,已经引起了我国蜜蜂生物多样性的快速下降<sup>[23]</sup>,所以,要提高对蜜蜂病毒病的认识,加强疫病监测和防控,切实维护养蜂业和自然生态的健康发展。综上,本研究成功建立了一种 ABPV 实时荧光 RT-PCR 检测方法,可以用于蜜蜂 ABPV 快速、准确地检测,为该病的实验室检测、流行病学调查和疫情监测提供新的技术支持。

## REFERENCES

- [1] Calderone NW. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37235
- [2] Ding GL, Shi W. Investigation of seven viruses in *Apis*

- cerana* and *Apis mellifera* of China[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2015, 46(10): 1822-1828 (in Chinese)  
丁桂玲, 石巍. 我国东、西方蜜蜂中七种病毒感染状况的调查[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(10): 1822-1828
- [3] Stankus T. A review and bibliography of the literature of honey bee colony collapse disorder: a poorly understood epidemic that clearly threatens the successful pollination of billions of dollars of crops in America[J]. Journal of Agricultural & Food Information, 2008, 9(2): 115-143
- [4] Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(2): 110-113
- [5] Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline[J]. Ecological Economics, 2009, 68(3): 810-821
- [6] Carreck NL, Ball BV, Martin SJ. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*[J]. Journal of Apicultural Research, 2010, 49(1): 93-94
- [7] Cornman RS, Tarpy DR, Chen YP, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, VanEngelsdorp D, Evans JD. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43562
- [8] Jacques A, Laurent M, Consortium E, Ribière-Chabert M, Saussac M, Bougeard S, Budge GE, Hendriks P, Chauzat MP. A Pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0172591
- [9] Galbraith DA, Fuller ZL, Ray AM, Brockmann A, Frazier M, Gikungu MW, Francisco Iturralde Martinez J, Kapheim KM, Kerby JT, Kocher SD, et al. Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 8879
- [10] Grozinger CM, Flenniken ML. Bee viruses: ecology, pathogenicity, and impacts[J]. Annual Review of Entomology, 2019, 64: 205-226
- [11] Godfray HC, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR. A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators[J]. Proceedings Biological Sciences, 2015, 282(1818): 20151821
- [12] Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers[J]. Science, 2015, 347(6229): 1255-1257
- [13] Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus)[J]. Virology, 1963, 21(3): 390-395
- [14] Žvokelj L, Bakonyi T, Korošec T, Gregorc A. Appearance of acute bee paralysis virus, black queen cell virus and deformed wing virus in Carniolian honey bee (*Apis mellifera carnica*) queen rearing[J]. Journal of Apicultural Research, 2020, 59(1): 53-58
- [15] Gamboa V, Ravoet J, Brunain M, Smagghe G, Meeus I, Figueroa J, Riaño D, De Graaf DC. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: a case study[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2015, 129: 36-39
- [16] Posada-Florez F, Ryabov EV, Heerman MC, Chen YP, Evans JD, Sonenshine DE, Cook SC. *Varroa destructor* mites vector and transmit pathogenic honey bee viruses acquired from an artificial diet[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242688
- [17] Tlak Gajger I, Kolodziejek J, Bakonyi T, Nowotny N. Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: a case study from Croatia[J]. Apidologie, 2014, 45(6): 701-706
- [18] De Miranda JR, Cordon G, Budge G. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 103: 30-47
- [19] Kukielka D, Sánchez-Vizcaino JM. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of sacbrood honeybee and acute bee paralysis viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 161(2): 240-246
- [20] Jamnikar Ciglenečki U, Toplak I. Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 184(1/2): 63-68
- [21] Kim M, Kim J, Kim B, Kim S, Yoon B. Development of nested ultra-rapid PCR method for the accurate detection of acute bee paralysis virus (ABPV)[J]. Journal of Apiculture, 2018, 33(3): 165-180
- [22] Hassanyar AK, Huang SK, Li ZG, Rizwan M, Mehmood S, Raza MF, Qasim M, Hussain M, Su SK. Prevalence of bee viruses in *Apis cerana* cerana populations from different locations in the Fujian Province of China[J]. Microbiology Open, 2019, 8(9): e00830
- [23] Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 109(1): 156-159

(卷终)