环境昆虫学报 2021，43（5）：1107－1112
Journal of Environmental Entomology
http：//hjkcxb. alljournals. net
doi：10. 3969/j. issn. 1674－0858. 2021. 05. 3

张丽娜，邓炎春，侯春生. 蜜蜂残翅病毒在中华蜜蜂及其蜂箱奇露尾甲的发生与进化分析［J］. 环境昆虫学报，2021，43（5）：1107－1112.

蜜蜂残翅病毒在中华蜜蜂及其蜂箱奇露尾甲的发生与进化分析

张丽娜[1,2]，邓炎春[1,2]，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）

摘要：蜜蜂残翅病毒（*Deformed wing virus*，DWV）广泛存在于我国规模化养殖的蜂群中，具有明显的季节流行特征。近年来，DWV 不断向野生授粉昆虫及其它昆虫传播，包括蜜蜂新的寄生性病害蜂箱奇露尾甲 *Aethina tumida*。前期本实验室已鉴定来源于中华蜜蜂 *Apis cerana* 与意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的蜂箱奇露尾甲均感染了蜜蜂病毒，但未调查来源于同一群的蜜蜂与蜂箱奇露尾甲是否感染了同一病毒，且在进化上有无差异。本研究调查了来源于同一群的中蜂及蜂箱奇露尾甲感染病毒情况，发现只感染了蜜蜂残翅病毒 A 型（DWV-A），未发现其它病毒。对 DWV-A 的 3 个片段进化分析表明，虽然 DWV-A 同时感染了中华蜜蜂和蜂箱奇露尾甲，但是 *VP3* 基因在不同的寄主中呈现明显不同的亲缘关系。这一结果为蜜蜂残翅病毒在蜜蜂及寄生病害中的进化提供了数据，为进一步研究病毒在不同寄主间的传播与进化奠定了基础。

关键词：蜜蜂残翅病毒；中华蜜蜂；蜂箱奇露尾甲；进化特征；共同感染
中图分类号：Q965；S89　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674－0858（2021）05－1107－06

Occurrence and phylogenetic analysis of deformed wing virus in *Apis cerana* and *Aethina tumida*

ZHANG Li-Na[1,2]，DENG Yan-Chun[1,2]，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）

Abstract：*Deformed wing virus*（DWV）is prevalence widely in managed honey bee colonies with an apparently seasonal characterization in China. Recently，DWV was expanding to wild bee species and other insects including an emerging parasite of honey bee，*Aethina tumida*. Our previous studies had showed that *A. tumida* from *Apis mellifera* and *Apis cerana* had been infected by several honey bee viruses but we did not investigate the difference in phylogeny of one virus infected simultaneously bees and *A. tumida*. Here，we examined the occurrence of honey bee viruses in *A. tumida* and *A. cerana*，and found that although DWV-A infected simultaneously *A. tumida* and *A. cerana*，phylogenetic analysis of *VP3* showed DWV-A was difference in phylogeny in different hosts. This study provided the evidences that DWV might employ the different strategy in different host during evolution.

Key words：*Deformed wing virus*；*Apis cerana*；*Aethina tumida*；phylogenetic analysis；co-infection

---

基金项目：国家自然科学基金（31811530276）
作者简介：张丽娜，硕士研究生，研究方向为蜜蜂病毒学，E－mail：zln77k@163. com
* 通讯作者 Author for correspondence：侯春生，博士，研究员，研究方向为分子病毒学，E－mail：houchunsheng@caas. cn
收稿日期 Received：2021－03－18；接受日期 Accepted：2021－05－29

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

随着国际贸易日益频繁与种蜂王的交换，蜜蜂感染病原的种类不断增加，新发或再发性病害严重影响蜜蜂的健康。其中，蜂箱奇露尾甲 *Aethina tumida*（鞘翅目：露尾甲科）是一种新的入侵性害虫，能导致蜜蜂群势下降，对规模化养蜂以及野生蜂种群均构成严重的生存威胁（Neumann *et al.*，2016）。蜂箱奇露尾甲最早在南非被发现，目前已扩散到北美洲、欧洲和亚洲（Neumann *et al.*，2016）。2017 年在我国首次发现蜂箱奇露尾甲入侵我国蜂群，并造成严重的影响，不仅危害蜂群个体与蜂产品（赵红霞等，2018），而且携带了多种蜜蜂病毒，包括蜜蜂残翅病毒（*Deformed wing virus*，DWV）（赵红霞等，2019）。

DWV 是危害全球蜜蜂种群发展最重要的病毒之一，为正义单链 RNA 病毒，属于小核糖核酸病毒 *Picornaviruses* 家族的传染性软腐病毒科 Iflaviridae。DWV 主要的结构蛋白由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种蛋白组成；非结构蛋白包括解旋酶、3C-蛋白酶（3C-pro）和 RNA 依赖 RNA 聚合酶（RdRp）（Berényi *et al.*，2007）。目前已经确定了三种主要的病毒毒株类型：A 型（Eugene *et al.*，2014）、B 型（Juliette *et al.*，2004）和 C 型（Mordecai *et al.*，2016）。

为明确我国中蜂群寄生的蜂箱奇露尾甲是否携带 DWV 及其进化关系，本文以同一蜂场不同蜂群的中华蜜蜂 *Apis cerana* 和蜂箱奇露尾甲 *Aethina tumida* 为样本，通过 RT-RCR 技术对蜜蜂常见病毒进行检测。由于只检测到了 DWV-A，本文将就 DWV-A 作进一步分析。同时对 DWV-A 的主要结构蛋白 VP3 和非结构蛋白 RdRp、*Lp* 基因分别进行扩增与测序，探讨 DWV-A 在同一蜂群同时感染蜂箱奇露尾甲和中蜂时的差异与进化关系。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

实验所用中华蜜蜂和蜂箱奇露尾甲采集于 2019 年 12 月 5 日，采样地点位于四川省普威镇龙潭村蜂场，在蜂场中随机选择 3 个蜂箱进行采样，其中一号和三号蜂箱蜜蜂和蜂箱奇露尾甲均可采集到，二号蜂箱仅采集到蜜蜂，未采集到蜂箱奇露尾甲。一号、二号和三号蜂箱分别采集蜜蜂 50 头、一号和三号蜂箱分别采集蜂箱奇露尾甲 15 头。将采集的蜜蜂和蜂箱奇露尾甲分别置于密封袋内带回，液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱长期保存直至用于检测。

1.2 实验材料与试剂

本实验所用 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司，反转录试剂盒 Goscript reverse transcription system 购自普洛麦格公司（Promega，Madison，WI，USA），聚合酶 2 × Es Taq MasterMix 购自康为世纪生物科技公司（CW Biotech），DNA 纯化回收试剂盒购自全式金公司（TransGen Biotech），DNA maker（DL-2029）购于北京美德华生检测技术有限公司，测序及引物合成在上海生工（Sangon，Shanghai）完成，其它化学试剂均为国产分析纯级试剂。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

分别取 5 ~ 7 头蜜蜂和 3 头蜂箱奇露尾甲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 离心管中提取总 RNA，所得总 RNA 用微量核酸蛋白测定仪测定 A268/280 比值在 2.0 以上后浓度定量到 100 μg/μL，取 2 μL 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。

1.4 RT-PCR 检测

反转录所得 cDNA 取 2 μL 作为模板进行 PCR 鉴定以确定其是否感染，所用引物序列及扩增条件分别见表 1 和表 2。

表 1 检测 DWV-A、B 和 C 型的引物

Table 1 Primers used for DWV-A, B and C detection

引物 Abbreviation	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	长度（bp） Length
DWV-A-F	GACTGAACCAAATCCGATGTC	376
DWV-A-R	TCTCAAGTTCGGGACGCATTC	
DWV-B-F	TACTAGTGCTGGTTTTCCTTT	155
DWV-B-R	CTCATTAACTGAGTTGTTGTC	
DWV-C-F	TACTAGTGCTGGTTTTCCTTT	152
DWV-C-R	CTCATTAACTGAGTTGTTGTC	

表 2 PCR 扩增条件

Table 2 Conditions for PCR amplification

引物对 Primer pair	扩增条件 Amplification conditions
F/R	2 min at 94℃, 30 s at 94℃, 30 s at 55℃, 30 s at 72℃ for 32 cycles, 5 min at 72℃ (2 × Es Taq MasterMix used)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5　核苷酸测序与分析

所得 cDNA 取 2 μL 作为模板使用高保真酶进行 PCR，所用引物序列及扩增条件分别见表 3 和表 4，将其送生工测序，将获得的序列结果使用 NCBI (National Centre for Biotechnology Information) 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 与 GenBank 中的序列进行比较分析。

表 3　扩增 Lp、RdRp 和 VP3 片段的引物
Table 3　Primers used for amplification L-protein, RdRp and VP3

引物 Abbreviation	引物序列 (5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	长度 (bp) Length
LP-F	ATTAAAAATGGCCTTTAGTTG	653
LP-R	CTTTTCTAATTCAACTTCACC	
RdRp-F	TCCATCAGGTTCTCCAATAACGGA	450
RdRp-R	CCACCCAAATGCTAACTCTAAGCG	
VP3-F	CCTGCTAATCAACAAGGACCTGG	355
VP3-R	CAGAACCAATGTCTAACGCTAACCC	

表 4　PCR 扩增条件
Table 4　Conditions for PCR amplification

引物对 Primer pair	扩增条件 Amplification conditions
F/R	3 min at 98℃, 10 s at 98℃, 20 s at 55℃, 30 s at 72℃ for 30 cycles, 10 min at 72℃ (Super cDNA Synthesis Kit used)

1.6　系统发育树的构建与分析

选择中华蜜蜂以及其他物种的 DWV 基因核苷酸序列使用 MEGA7.0 与 ClustalW 构建系统发育树，以 Tamura-Nei 模型 (Tamura and Nei, 1993) 为基础，采用最大似然法 (Maximum Likelihood) 对其演化过程进行推断，利用最大复合似然法 (Maximum Composite Likelihood, MCL) 估计的两两距离矩阵，通过邻域连接和 BioNJ 算法自动获得启发式搜索的初始树，然后选择具有较优对数似然值的拓扑，分析涉及 30 多个核苷酸序列，选择的序列及其具体信息如表 5 所示，所有包含空白和缺失数据的位置都被消除 (Kumar *et al.*, 2016) 。通过对蜂箱奇露尾甲和中华蜜蜂 DWV RdRp、Lp 和 VP3 的克隆与测序，共获得了 6 条基因序列并提交到 NCBI，分别命名为 *Aethina tumida*-RdRp (MT885269) , *Aethina tumida*-Lp (MT890634) , *Aethina tumida*-VP3 (MT899248) , *Apis cerana*-RdRp (MT885270) , *Apis cerana*-Lp (MT890635) , *Apis cerana*-VP3 (MT899249) 。

表 5　本研究中使用的 DWV 序列
Table 5　DWVs sequences used in this study

序号 ID	注册号 GenBank	地点 Location	宿主 Host	年份 Year
1	FJ347142		*Aethina tumida*	
2	KY909333	Italy	*Vespa crabro*	2016
3	JX878304	Korea	*Apis mellifera*	2012
4	KP734715	East Asia	*Varroa destructor*	2009
5	KP734719	East Asia	*Varroa destructor*	2009
6	AB242569	East Asia	*Varroa destructor*	2004
7	AB242590	East Asia	*Varroa destructor*	2004
8	KF929245	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
9	KF929246	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
10	KF929247	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
11	KF929258	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
12	KF929259	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
13	KF929285	Europe	*Bombus lapidarius*	2011
14	KP734803	New Zealand	*Varroa destructor*	2008
15	KP734718	New Zealand	*Varroa destructor*	2008
16	KP734804	New Zealand	*Varroa destructor*	2008
17	KP734597	New Zealand	*Varroa destructor*	2008
18	KP734551	New Zealand	*Varroa destructor*	2008
19	JX679473	East Asia	*Apis cerana*	2010
20	JX679474	East Asia	*Apis cerana*	2010
21	JX679475	East Asia	*Apis cerana*	2010
22	MN607197	Vitenam	*Apis cerana*	2016
23	MN607198	Vitenam	*Apis cerana*	2016
24	JX679477	China	*Apis cerana*	2010
25	MF092818	China	*Vepids wasp*	2017
26	MN542768	Malaysia	Ant	2016
27	JQ413340	Argentina	Stingless bees	2015
28	MT068464	New Zealand	*Vespula germanica*	2018
29	MT068465	New Zealand	*Vespula vulgaris*	2018
30	MT068468	New Zealand	*Polistes chinensis*	2018

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与分析

2.1 DWV 阳性率及感染情况

利用 RT-PCR 检测分别检测中华蜜蜂样品 3 份，蜂箱奇露尾甲样品 2 份，结果见图 1。其中 1 份中华蜜蜂样品中检测到 DWV-A，中华蜜蜂样品阳性检测率为 33.3%；2 份蜂箱奇露尾甲样品中均检测到 DWV-A，蜂箱奇露尾甲样品阳性检测率为 100%。中华蜜蜂检测出感染 DW-A 的蜂群是未采集到蜂箱奇露尾甲的二号蜂群，同时采集到蜜蜂和蜂箱奇露尾甲的一号和三号蜂群中，检测到蜂箱奇露尾甲感染 DWV-A，在中华蜜蜂中未检测到。

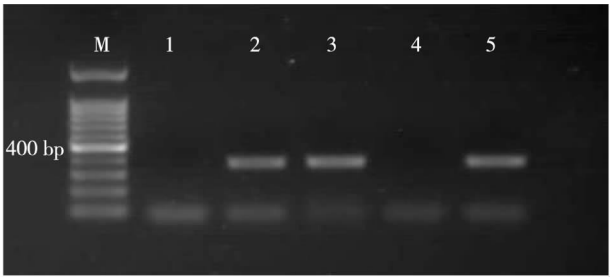

图 1 DWV 检测胶图

Fig. 1 Detection the presence of DWV

注：M 表示 DNA maker，泳道 1－5 分别表示一号蜂群中华蜜蜂、一号蜂群蜂箱奇露尾甲、二号蜂群中华蜜蜂、三号蜂群中华蜜蜂、三号蜂群蜂箱奇露尾甲。Note: M, DNA maker, the lane 1-2 represented *Apis cerana* and *Aethina tumida* of colony No. 1; the lane 3 represented *Apis cerana cerana* of colony No. 2; the lane 4-5 represented *A. cerana* and *A. tumida* of colony No. 3.

2.2 DWV 系统发育树分析

不同基因片段的进化分析所得到的亲缘关系与进化特点是不同的。基于 *RdRp* 和 *Lp* 两个基因的核苷酸序列系统进化分析结果（图 2）表明，来源于蜂箱奇露尾甲和中华蜜蜂的 DWV 亲缘关系高达 96%，均与胡蜂携带的 DWV 关系最为密切。而基于 *VP3* 基因的核苷酸序列的系统进化表明来源于蜂箱奇露尾甲和中华蜜蜂的 DWV 的亲缘关系较远，它们分别与无刺蜂和狄斯瓦螨的 DWV 株更为紧密。

3 结论与讨论

本研究采用四川同一蜂场不同蜂群的中华蜜蜂和蜂箱奇露尾甲作为样本，利用 RT-RCR 检测其是否感染 DWV，结果表明中华蜜蜂和蜂箱奇露尾甲均感染 DWV-A，其中中华蜜蜂样品阳性检测率为 33.3%，蜂箱奇露尾甲样品阳性检测率为 100%。由于本研究的样本量有限，该感染率并不能代表整个蜂群的感染情况。

DWV 在全球的蜂群及寄生螨-狄斯瓦螨中具有较高的流行率。为了更深入理解 DWV 在不同寄主的传播与进化特点，本研究对 DWV-A 毒株的结构蛋白 VP3 和非结构蛋白 RdRp 和 L-protein 进行了系统发育分析。结果表明不同基因的序列进化树之间有联系也有区别：RdRp 和 L-protein 在进化上与寄主并无太大关系，而 VP3 片段体现较强的寄主差异性。RdRp 对于病毒基因组的复制以及表观遗传控制和细胞基因表达的转录是必不可少的（Ng *et al.*，2008），它在病毒进化中具有高度保守性（Elena and Sanjuan，2005），病毒种群中该区域突变率的提高可以使宿主根据防御机制和其它环境因素选择性突变（Crotty *et al.*，2001）。根据本研究的 RdRp 系统发育分析，感染蜂箱奇露尾甲的 DWV 并没有形成独立的分支。基于 Lp 的进化结果与 RdRp 的相类似，这表明，DWV 可能并不依赖于寄主的变化而变化。但是基于 *VP3* 基因序列的系统进化分析表明中蜂和蜂箱奇露尾甲的分支并不在同一簇，亲缘关系较远。其结果显示来源于蜂箱奇露尾甲的 DWV 与狄斯瓦螨的更接近；来源于中蜂的 DWV 与其它已报道的感染中蜂的 DWV 更相近。由此推断，蜂箱奇露尾甲的 DWV 可能来源于狄斯瓦螨，而不是蜜蜂，是否具有较强的致病性需要进一步验证。另一方面，表明 DWV 的 VP3 可能对病毒宿主的选择具有重要的作用，以便更好地适应宿主环境。这些推断，仍需对这 3 个基因的全长作进一步分析才能确定，因为本研究只选择了 VP3，L-protein，RdRp 3 个基因的部分片段进行的进化分析，可能会导致信息不全面。

DWV 在中国以至全球范围内都是非常常见的蜜蜂病毒，且受狄斯瓦螨的影响较大（Wilfert *et al.*，2016）。在本次检测中 DWV-B 和 DWV-C 基因型均未出现，可能是本研究选择的样本量较少。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

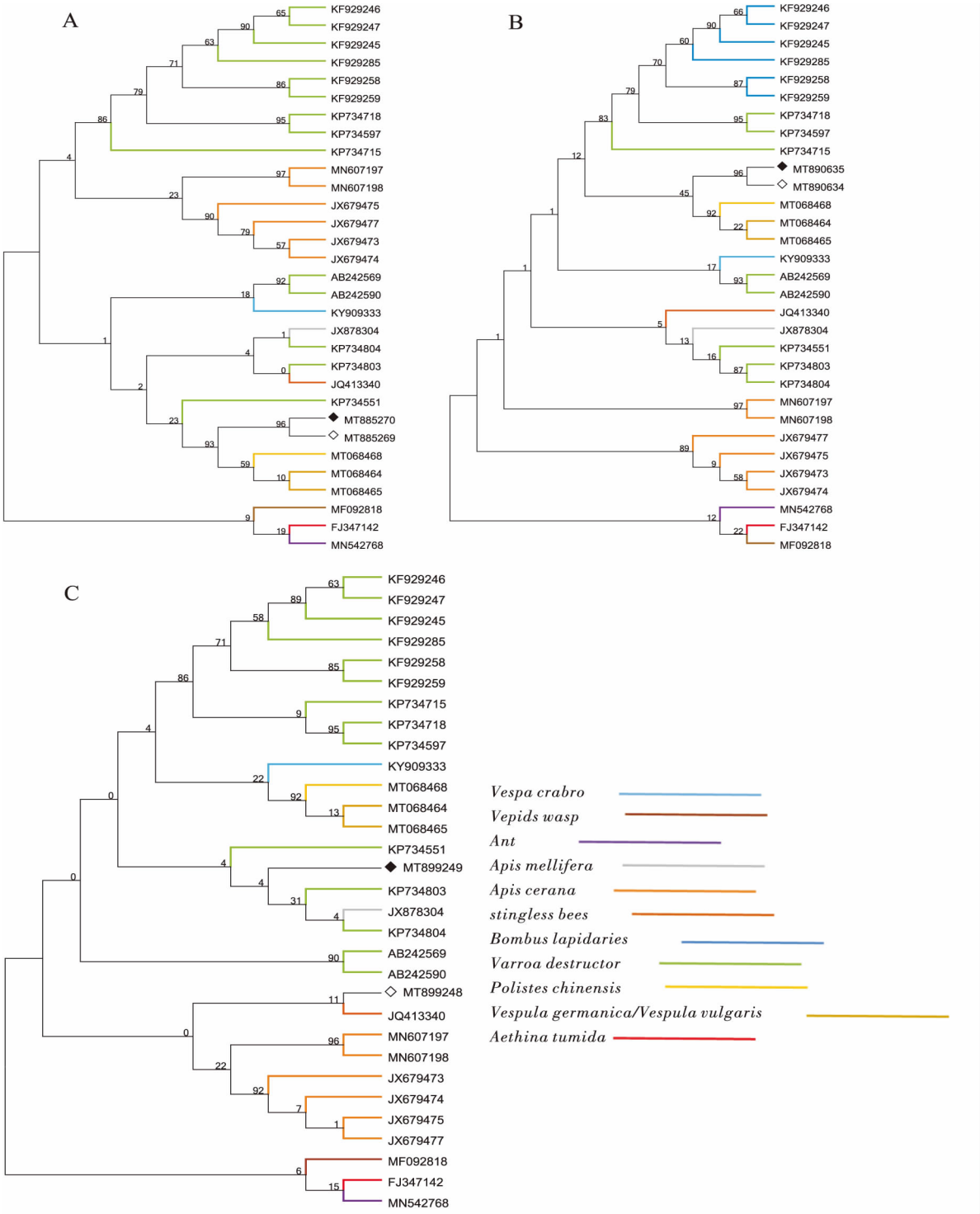

图 2　对来源于不同寄主的 DWV 分离株进化分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of DWV strains from different hosts

注：(A) 基于 DWV RdRp 片段的系统进化树。(B) 基于 DWV L-protein 片段的系统进化树。(C) 基于 DWV VP3 片段的系统进化树。采用最大似然法 (ML) 和 bootstrap 重采样 (1 000 次重复) 构建系统发育树。系统发育树各分枝上的数目代表 bootstrap 值 (1 000 次重复)，不同颜色的分支表示不同的 DWV 感染的不同物种。◆代表本文获得的来自中华蜜蜂的 DWV 序列，◇代表本文获得的来自蜂箱奇露尾甲的 DWV 序列。Note: Phylogenetic analysis based on the DWV RdRp (A), L-protein (B) and VP3 (C) fragment. The phylogenetic tree constructs were used the maximum likelihood method (ML) and bootstrap resampling (1 000 repetitions). The number on each branch of the phylogenetic tree represented the bootstrap value (1 000 repetitions). The branches with different colors indicated different species infected with DWV. ◆ and ◇represented the *Apis cerana* and *Aethina tumida*.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

也有可能是该蜂场并未感染 DWV-B 和 DWV-C，因为中华蜜蜂本身感染螨的机率小，即使感染了通过自身的清理行为能有效的清除，使狄斯瓦螨对中蜂并不构成威胁。本研究虽然在蜂箱奇露尾甲中鉴定到 DWV，并发现 VP3 片段在该寄生与中蜂上进化差异，但是 VP3 的精准致病作用及其特点仍需进一步证实。另外，感染 DWV 后的蜂箱奇露尾甲是否对中蜂有更大的危害也需进一步鉴定，因为新入侵性物种对本地物种的生态及病原传播都可能产生重要的影响（赵紫华等，2019）。

参考文献（References）

Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, *et al.* Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (11): 3605 – 3611.

Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98 (12): 6895 – 6895.

Elena SF, Sanjuan R. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: Separating causes from consequences [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (18): 11555 – 11558.

Eugene VR, Graham RW, Jessica MF, *et al.* A virulent strain of *deformed wing virus* (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor* – mediated, or *in vitro*, transmission [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10 (6): e1004230.

Juliette RO, Dick P, Jean – Marc B, *et al.* Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor* [J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85 (12): 3747 – 3755.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33: 1870 – 1874.

Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, *et al.* Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10 (5): 1264 – 1273.

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

Ng KS, Arnold JJ, Cameron CE. Structure – function relationships among rna – dependent rna polymerases [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2008, 320: 137 – 156.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, 10: 512 – 526.

Wilfert L, Long G, Leggett HC, *et al.* Deformed wing virus is a recent global epidemic in honey bees driven by varroa mites [J]. *Science*, 2016, 351: 594 – 597.

Zhao HX, Huang WZ, Ji CH, *et al.* Investigation of the honey bee viruses vectored by the small hive beetle *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) from different host bee species [J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46 (6): 1383 – 1384. [赵红霞，黄文忠，姬聪慧，等. 不同寄主来源的蜂箱奇露尾甲携带蜜蜂病毒情况调查 [J]. 植物保护学报，2019，46 (6): 1383 – 1384]

Zhao ZH, Su M, Li ZH, *et al.* Invasion ecology of alien species [J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46 (1): 1 – 5. [赵紫华，苏敏，李志红，等. 外来物种入侵生态学 [J]. 植物保护学报，2019，46 (1): 1 – 5]

Zhao HX, Wang HT, Hou CS, *et al.* Identification, occurrence and damage investigation of *Aethina tumida* invading China [J]. *Apiculture of China*, 2018, 69 (11): 29 – 31. [赵红霞，王华堂，侯春生，等. 入侵中国的蜂箱小甲虫鉴定及发生为害调查 [J]. 中国蜂业，2018，69 (11): 29 – 31]

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net