

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201811084

中华蜜蜂“白头蛹”的病原检测及病因分析*

孙莉^{1,2#}, 李毓海^{2#}, 马鸣潇², 宋铭忻^{1**}

(1. 东北农业大学 动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 锦州医科大学 畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要:【目的】中华蜜蜂“白头蛹”是危害养蜂业最严重的病害之一, 至今尚未有中华蜜蜂“白头蛹”病因的确切报道。为此, 本研究将对“白头蛹”的发病原因进行分析。【方法】在河北秦皇岛、陕西安康和辽宁丹东三地收集临床表现为“白头蛹”的中华蜜蜂病死幼虫, 利用 RT-PCR 方法对常见蜜蜂病毒 CSBV、DWV、BQCV 和 ABPV 等进行检测, 利用鲜血琼脂培养基进行细菌分离、培养。接种的样品经 37 °C 培养 24 h, 挑选出培养基上不同形态的菌落 (特别是具有 β 溶血环的菌落) 进行菌落纯化培养。挑取单个菌落, 革兰氏染色法观察细菌镜下形态; 再对分离细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序, 微量生化鉴定管对其生化特性进行鉴定。在对“白头蛹”病因综合分析的基础上, 对粘质沙雷氏菌进行感染回归试验。【结果】病料中无常见蜂病毒; 从 3 个地区的病虫体内分离细菌 8 株, 包括粘质沙雷氏菌、表皮葡萄球菌、液化沙雷氏菌、肺炎克雷伯氏菌和蜡样芽孢杆菌, 其中粘质沙雷氏菌在所有的样品中都检测到, 鉴于此, 对粘质沙雷氏菌进行幼虫感染试验, 结果接种粘质沙雷氏菌幼虫不能正常化蛹、死亡, 病理组织学检查出现了类似于临床自然死亡虫体的病变。【结论】结合相关报道, 综合分析粘质沙雷氏菌可能是“白头蛹”的致病菌, 应激因素是“白头蛹”发生的诱因。本研究为中华蜜蜂“白头蛹”病的致病原因分析及其防治奠定了基础。

关键词: 中华蜜蜂; 白头蛹; 粘质沙雷氏菌; 病原鉴定

中图分类号: S 852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 04-0617-08

Pathogenic Detection and Etiological Analysis of White-headed Pupa of *Apis cerana*

SUN Li^{1,2}, LI Yuhai², MA Mingxiao², SONG Mingxin¹

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College Animal Husbandry and Veterinary, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract: [Purpose] White-headed pupae of Chinese honeybee is one of the most serious diseases endangering the beekeeping industry. At present, some people believe that the etiology of “white-headed pupae” of Chinese honeybee has not been accurately reported. Therefore, we aimed to find out the cause of this disease. [Method] The diseased *Apis cerana* larvae with “white-headed pupae” were collected from Qinhuangdao, Ankang, and Dandong. The frequently occurring honeybee viruses including CSBV, DWV, BQCV and ABPV, were detected by RT-PCR, and the bacteria were isolated and cultured using blood agar medium. The “white-headed pupae” samples were inoculated and incubated in the blood agar medium under the condition of 37 °C for 24 hours, then, colonies of different morphologies, especially colonies with β -hemolymph, were selected for purification culture. The 16S

收稿日期: 2018-11-28

修回日期: 2019-04-03

网络首发时间: 2019-06-20 17:12:38

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772760); 锦州医科大学大学生创新训练项目 (201828)。

作者简介: # 对本文贡献等同, 为并列第一作者。孙莉 (1980—), 女, 辽宁营口人, 在读博士研究生, 副教授, 主要从事动物疫病研究。E-mail: lilybaby80@163.com; 李毓海 (1993—), 男, 辽宁营口人, 在读硕士研究生, 主要从事动物疫病研究。E-mail: 1521515430@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 宋铭忻 (1968—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物寄生虫病研究。E-mail: songmx@neau.edu.cn

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20190620.1605.001.html>



rRNA gene of the isolated bacteria was amplified and sequenced by PCR, and its biochemical characteristics were identified by microbiobiochemical identification tube. Based on the comprehensive analysis of the etiology of “white-headed pupae”, the regression experiment of *Serratia marcescens* infection was carried out. [**Result**] No bee virus was found in the samples; 8 strains of bacteria were isolated from the insects in three areas, including *S. marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus cereus*. *S. marcescens* was detected in all samples. In view of this, the larval infection experiments of *S. marcescens* were carried out and the results were inoculated with *S. marcescens* larvae. Unable to pupate and die normally, pathological examination showed pathological changes similar to clinical natural death. [**Conclusion**] Combined with relevant reports, comprehensive analysis of *S. marcescens* may be the pathogen of “white-headed pupa”, and stress factors are the inducement of “white-headed pupa”. This study laid a foundation for the pathogenic analysis and prevention of “white-headed pupae” disease of Chinese honeybee.

Keywords: *Apis cerana* larvae; white-headed pupa; *Serratia marcescens*; pathogen identification

中华蜜蜂和意大利蜜蜂在中国被大量饲养,不但提供营养丰富的蜂产品,而且可为多种农作物授粉^[1],在农业生产中占有重要地位^[2-5]。病毒、细菌、真菌、寄生虫和原生动物等病原体的感染引起蜜蜂死亡或逃逸,甚至整个蜂群崩溃^[6-8],严重威胁养蜂业的发展。中华蜜蜂“白头蛹”是危害养蜂业最常见的病害之一,全国范围流行,至今仍无发病原因的确切报道,使其不能得到有效控制。中华蜜蜂“白头蛹”是指蜂群发生疾病并感染幼虫,导致蜜蜂的子脾遭到破坏,出现封盖期的脾盖被揭开、幼虫裸露的现象,这些裸露的虫体被称为“白头蛹”。患病蜂群常出现“见子不见蜂”现象,该病常发于大龄幼虫期,病虫体表无光泽度和丰满度,逐渐变为灰白色甚至深褐色,大多数虫体在蛹期死亡,尸体无臭味、无黏性,多呈干枯状,少数患病虫蛹可羽化成蜂,但不久死亡。目前认为该病的病原体是由巢虫、飞蚁及大蜂螨等引起^[9-12],也有认为“白头蛹”并非传染病^[5, 11],总之对其病因并没有确切报道。2015—2017年河北秦皇岛、陕西安康和辽宁丹东三地先后发生规模较大的中华蜜蜂“白头蛹”病,本研究根据三地蜂场发病情况和实验室病原体检测结果,并结合相关报道,对“白头蛹”的发病原因进行分析,有望为中华蜜蜂“白头蛹”病的致病原因分析及其防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从河北省秦皇岛市、陕西省安康市和辽宁省

丹东市的3个中华蜜蜂养殖场选取病蜂脾巢,实验室-80℃冰箱保存。

DNA/RNA isolation Kit DNA/RNA 共提取试剂盒、pMD18-T 克隆载体、2×TransTaqHigh Fidelity (HiFi) PCR SuperMix、氨苄青霉素 (Ampicillin)、Trans2K DNA Marker、10×缓冲液、胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、氢氧化钠、琼脂糖、DH5α、多聚甲醛、乙醇、液体石蜡、HE 染色液等由锦州医科大学生命科学研究院保存。

1.2 病理切片的制作与观察

分别从三地选取患病症状明显但未死亡的6日龄病虫和同日龄的健康幼虫,参考李慧^[13]的方法将其制作病理切片,每只虫体沿腹正中线方向制作切片3~5张。将固定好的虫体切片进行HE染色。

1.3 病毒检测

对蜜蜂常发病毒性传染病中华蜜蜂囊状幼虫病毒 (CSBV)^[14]、黑蜂王台病毒 (BQCV)^[14]、急性蜜蜂麻痹病毒 (ABPV)^[15]、慢性蜜蜂麻痹病毒 (CBPV)^[16]、残翼病毒 (DWV)^[16]、克什米尔蜜蜂病毒 (KBV)^[17]和以色列急性麻痹病毒 (IAPV)^[18]进行检测。

1.4 细菌的接种培养

在无菌环境下,从每个蜂场发病巢脾中随机捡取“白头蛹”蜜蜂30只,浸入生理盐水中,将完整的虫体浸入75%乙醇溶液中浸泡1~2 min,杀灭虫体表面细菌,再用无菌水将虫体表面的乙醇冲洗3~4次。将处理好的病虫破碎呈肉糜状,均匀涂抹在鲜血琼脂培养基上,进行细菌培养,观

察菌落形态及种类。挑取生长旺盛或具有 β 溶血特征的单菌落,分别混匀于装有10 mL LB液体培养基的50 mL离心管中,放在恒温振荡培养箱内37℃、200 r/min培养18 h,培养后利用革兰氏染色法^[19]观察菌落形态及有无杂菌,将筛选好的菌液用甘油法于-20℃保存、备用。

1.5 细菌的鉴定

采用革兰氏染色对纯化后分离菌进行染色镜检,观察其形态基本一致判定为纯化菌。参照文献^[20]对纯化后的细菌扩菌培养,提取DNA,用16S rRNA检测引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增。取DNA扩增后的产物5 μ L,进行琼脂糖凝胶电泳获得预期目的条带后,送至上海生工生物有限公司测序,结果进行BLAST比对。依据比对结果,确定细菌的种类及名称,分离菌株全部用生化反应管作基于生化反应表型鉴定,鉴定结果与文献^[21]对比后归类。

1.6 细菌致病性试验

尽管本研究从3个地区采集的样品中分离到多种细菌,但在所有样品中仅共同分离到粘质沙雷氏菌,结合相关研究报告^[22],本研究选取了能在所有样品中检测到的粘质沙雷氏菌进行致病性试验。挑选3~4日龄健康幼虫80只,随机分为4组,放于48孔细胞培养板内,加入幼虫基本食物(Basic larval diet, BLD: 蜂王浆50%、 $C_6H_{12}O_6$ 6%、果糖6%、酵母抽提物1%、无菌水37%)^[23]后,放入温度34℃、相对湿度95%的培养箱内,培育24 h后,将死亡幼虫检出,剩余健康幼虫进行细菌接种试验^[24-26]。将OD值为0.6左右(菌液密度约为 1.2×10^9 CFU/mL)新培养的细菌分别取1.0、2.0和3.0 mL与BLD充分混匀,定容至10 mL,饲喂于3个试验组蜜蜂幼虫,设不接种细菌的正常对照组。具体接种分组为:A组粘质沙雷氏菌菌液加入蜜蜂幼虫基础饲料的密度为10%,B组粘质沙雷氏菌菌液加入蜜蜂幼虫基础饲料的密度为20%,C组粘质沙雷氏菌菌液加入蜜蜂幼虫基础饲料的密度为30%,D组为对照组。

接菌24 h后换成不含细菌的正常饲料,并分别于饲喂24、48和72 h后,观察记录蜜蜂的生长状态、死亡情况,计算其死亡率,并对于死亡幼虫作进一步的病理组织学检测。

从各组随机挑选完整病死幼虫3只,按照上

述方法处理,挑取与接种细菌相似菌落,按照上述细菌鉴定步骤鉴定,根据生物公司测序结果,确定接种细菌是否收回,从而验证接菌试验是否成功,且该细菌是否在试验期间一直存在并作用于幼虫体内。同时,对接种细菌的所有蜂虫均通过RT-PCR技术检测CSBV、IAPV、KBV、DWV、CBPV、ABPV和BQCV^[11-12, 14-16]。上述试验重复3次。

2 结果与分析

2.1 病理切片的制作及观察结果

如图1所示:健康组中华蜜蜂幼虫整个组织HE染色后细胞排列紧凑完整,细胞核明显易见,表皮与真皮层完整,且有明显空隙;3个地区的发病幼虫整个组织HE染色可见细胞排列分散,结构模糊;大量的细胞发生变性、坏死,部分区域细胞溶解消失。患病幼虫的表皮与真皮层之间出现空洞,内含大量水状物。

2.2 常见蜂病毒的检测结果

RT-PCR检测结果表明:各地区蜂场所采集的“白头蛹”体内均未检测到常见蜂病毒。

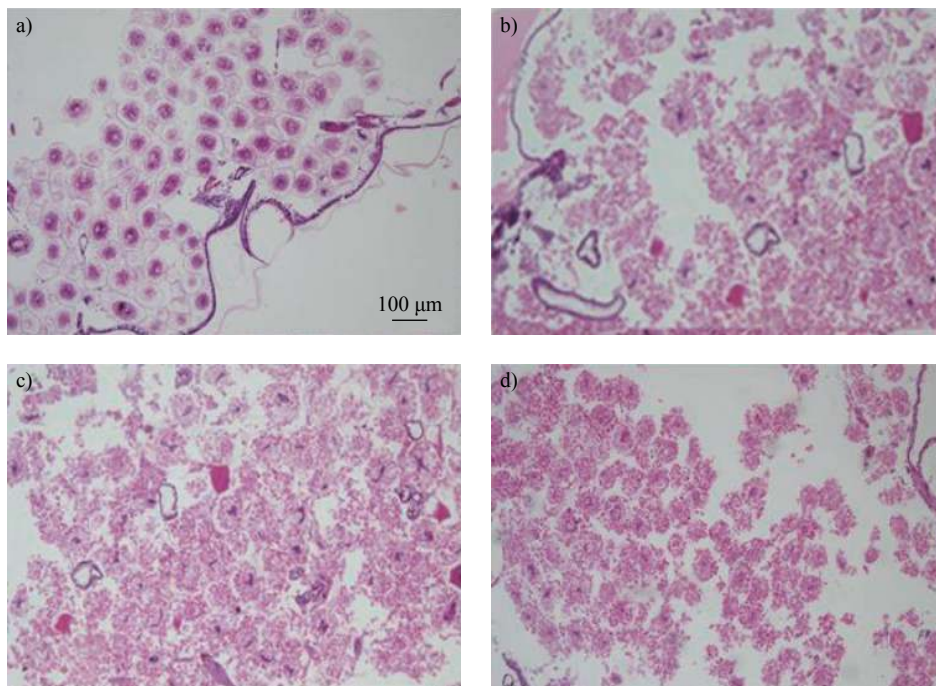
2.3 细菌的分离培养结果

秦皇岛地区病虫的组织在培养后,培养基上具有 β 溶血环的白色菌落菌株2株,以Q1、Q2标记命名;不具备溶血环、但生长极其旺盛的白色菌落2株,以Q3、Q4标记命名。安康地区病虫的组织在培养后,培养基上具有 β 溶血环的菌株1株,以A1标记命名;不具备溶血环、但生长极其旺盛的白色菌落1株,以A2标记命名。丹东地区病虫的组织在培养后,培养基上具有 β 溶血环的菌落2株,以D1、D2标记命名。

在鲜血琼脂培养基上,菌落呈现两种形态:Q1、Q2、A1、D1和D2菌落白色凸起,且发生 β 溶血;Q3、Q4和A2的菌落白色凸起,但边缘整齐。镜检观察到4种形态:Q1、Q4、A1和D2菌株革兰氏染色阴性、短杆菌、有鞭毛、无荚膜、无芽孢;Q2菌株革兰氏染色阴性、短粗杆菌、无鞭毛、有荚膜、无芽孢;Q3和A2菌株革兰氏染色阳性、葡萄串状球菌,无鞭毛,无荚膜,无芽孢;D2革兰氏染色阳性、长杆菌、有鞭毛、有芽孢、无荚膜。

2.4 PCR扩增与测序结果

如图2所示:条带大小为1 500 bp左右,将



注: a) 健康幼虫的组织切片; b) 秦皇岛地区发病幼虫的病理组织切片; c) 安康地区发病幼虫的病理组织切片; d) 丹东地区发病幼虫的病理组织切片。

Note: a) tissue section of healthy larvae; b) histopathological sections of pathogenic larvae in Qinhuangdao region; c) histopathological sections of pathogenic larvae in Ankang area; d) histopathological sections of larva in Dandong area.

图 1 病理组织切片检查

Fig. 1 Histopathological examination

PCR 产物测序结果进行 BLAST 比对, 表明 Q1、A1 和 D1 均为粘质沙雷氏菌, 且 A1 与 Q1 同源性为 98.6%, Q1 与 D1 同源性为 98.8%, A1 与 D1 同源性为 99.1%, 可以确定为同一种细菌; Q4 则为液化沙雷氏菌, 其与粘质沙雷氏菌 Q1、A1、D1 的同源性分别为 76.0%、76.4% 和 76.1%, 为同属不同种细菌; Q3 为表皮葡萄球菌, 与 A2 的同源性为 99.9%, 为同种细菌。

测序结果显示：Q1、A1 和 D1 是粘质沙雷氏菌；Q2 是肺炎克雷伯氏菌；Q3 和 A2 是表皮葡萄球菌；Q4 是液化沙雷氏菌；D2 是蜡样芽胞杆菌。

2.5 粘质沙雷氏菌的生化试验结果

使用生化微量试剂管对生物公司测序的粘质沙雷氏菌、液化沙雷氏菌进行验证, 验证结果如表 1 所示。结果表明: 上述两种细菌均具备生物公司测序结果中各细菌的生化特性。

2.6 细菌致病性试验结果

由表 2 可见：A、B 和 C 三组的试验菌液密度分别为 10%、20% 和 30%，随着粘质沙雷氏菌液浓度的增加，各时间段的死亡虫数与死亡率也同期增加，但 20% 菌液组与 30% 菌液组差距并不明显，对照组则没有明显的变化，这说明粘质沙雷氏菌能够引起中华蜜蜂幼虫发生疾病，且当菌液密度达到 20% 以上时，对中华蜜蜂幼虫的危害较为严重。针对感染死亡幼虫进行病理组织学检查，出现了类似于临床自然死亡虫体的病变，HE 染色呈粉红色，幼虫组织细胞形状分散和细胞核不规则且不易见等病理变化 (图 3)。



注：各条带从左到右 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 J 分别为 2 000 bp Marker、阴性对照、Q1、Q2、Q3、Q4、A1、A2、D1 和 D2，各细菌条带大小均为 1 500 bp 左右。

Note: Each band from left to right A, B, C, D, E, F, G, H, I and J is 2 000 bp Marker, negative control, Q1, Q2, Q3, Q4, A1, A2, D1 and D2 respectively. The size of each bacterial band is about 1 500 bp.

图 2 16S rRNA PCR 产物

Fig. 2 16S rRNA PCR product

表 1 粘质沙雷氏菌生化试验结果
Tab. 1 *Serratia liquefaciens* biochemical test results

项目 project	粘质沙雷氏菌结果 result	项目 project	粘质沙雷氏菌结果 result
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	—	阿东醇 (产酸) adenol (acid production)	+
鸟氨酸双水解酶 ornithine dihydrolase	+	乳糖 (产酸) lactose (acid production)	—
赖氨酸双水解酶 lysine dihydrolase	+	卫矛醇 (产酸) euonyl (acid production)	—
葡萄糖 (产气) glucose (gas production)	+	顺乌头酸 (利用) aconitic acid (utilization)	+
L-阿拉伯糖 (产酸) L-arabinose (acid production)	—	苹果酸 (利用) malic acid (utilization)	+

表 2 细菌致病性试验结果
Tab. 2 Bacterial regression test results

分组 group	不同时间点幼虫死亡数 number of dead larvae at different time			
	0 h	24 h	48 h	72 h
A	144	4	7	12
B	144	16	23	31
C	144	21	27	36
D	144	0	1	3

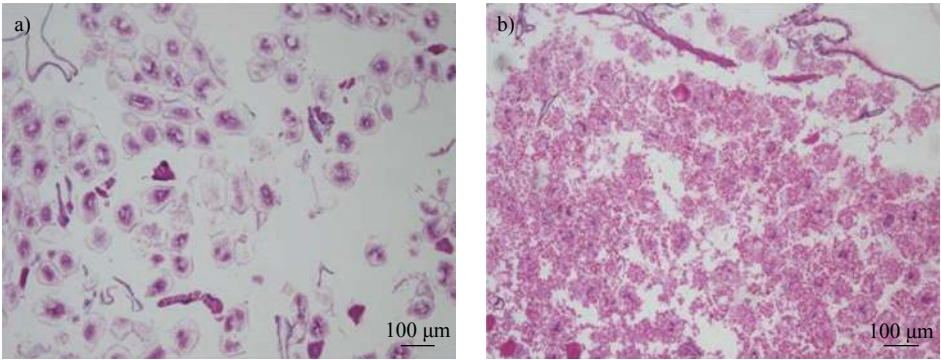
幼虫感染后的形态变化如图 4~5 所示: 幼虫接种细菌 24 h 后虫体表面颜色发生不同程度变化, 有的虫体表面出现黑色斑点、斑块, 有的虫体整个变黑; 接种细菌 48 h 后幼虫体型发育增大, 虫体几乎全部变黑; 接种细菌 72 h 后幼虫体型进一步发育增长, 虫体表面呈褐色或黑褐色, 质脆易破碎, 虫体内部组织软化似液体形态, 疑似感染 CSBD 的幼虫临床病变。菌液感染后 72 h 内死亡的幼虫, 虫体皮肤组织极其易碎, 呈褐色或黑褐色, 内部组织液化, 虫体极软; 感染细菌 72 h 内未死亡的幼虫, 身体表面出现不同程度和大小黑、褐色斑点或斑块, 虫体内部组织不同程度软化, 但仍可继续采食和生长。

2.7 细菌回收试验结果

回归试验中接种幼虫的细菌按照分组回收, 验证细菌在试验期间是否一直存在、并存在于幼虫体内。本次回收试验, 不同密度菌液试验组死亡幼虫, 涂板划线培养并经革兰氏染色观察确定, 都重新分离得到接种的粘质沙雷氏菌菌株, 从而证明: 粘质沙雷氏菌可以在幼虫体内生长繁殖, 并致其发病甚至死亡。粘质沙雷氏菌可能是中华蜜蜂“白头蛹”的主要致病菌。

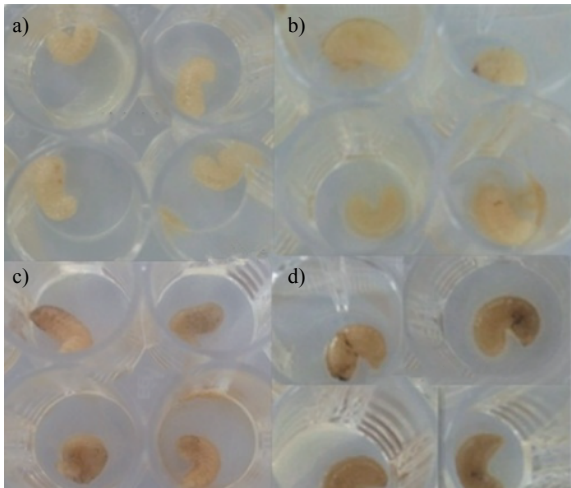
3 讨论

本研究对河北秦皇岛、陕西安康、辽宁丹东 3 个地区蜂场发病情况调查, 发现陕西省安康市某规模化中华蜜蜂养殖场在饲喂变质蜂蜜后约 5 d 发生“白头蛹”, 8~13 d 封盖后工蜂拖出死亡幼虫, 出现严重的蜜蜂飞逃现象; 河北省秦皇岛市某规模化中华蜜蜂养殖场, 2014 年春季发生中华蜜蜂囊状幼虫病并治愈, 约 2 个月后处于恢复期的蜂群发生了“白头蛹”, 蜜蜂幼虫表面颜色发黄, 暗淡无光泽, 蜂脾不封盖, 病虫常在 4~5 d 死亡, 严重出现飞逃及幼虫腐烂现象, 幼虫脾封



注: a) 阴性对照组; b) 接菌感染组。
Note: a) negative control group; b) infection group.

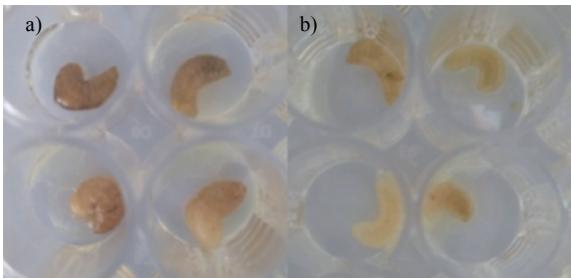
图 3 细菌致病性试验病理组织切片
Fig. 3 Pathological section of bacterial pathogenicity test



注: a) 健康幼虫; b) 接菌 24 h 未死亡幼虫; c) 接菌 48 h 未死亡幼虫; d) 接菌 72 h 未死亡幼虫。
Note: a) healthy larvae; b) undead larvae after infected for 24 h; c) undead larvae after infected for 48 h; d) undead larvae after infected for 72 h.

图 4 20% 菌液浓度病虫发病情况

Fig. 4 20% bacterial concentration of pests and diseases



注: a) 感染后死亡幼虫; b) 感染后未死亡幼虫。
Note: a) The larvae died after infection; b) The larvae did not die after infection.

图 5 感染后的死亡与未死亡幼虫

Fig. 5 Post-infection death and underage larvae

盖不整齐，封盖的与不封盖的参差不齐，巢房塌陷；辽宁丹东发病蜜蜂购买时经长途运输，到达蜂场后蜂群大范围发生“白头蛹”，并伴有巢虫侵害，发病虫体颜色发黄、暗淡无光，发病后 3~4 d 内死亡。

人们一直认为中华蜜蜂“白头蛹”病原体是巢虫^[10-11]，但巢虫得到有效控制后，许多蜂场仍有“白头蛹”病发生^[27]。此次 3 个蜂场发生的“白头蛹”，既不是巢虫也不是“死蛹病”。综合分析发现 3 个蜂场均受不同程度的应激因素刺激：秦皇岛地区蜂群的“白头蛹”发生于中蜂囊状病治愈后的恢复期；安康地区蜂群的“白头蛹”发生于饲喂变质蜂蜜之后；丹东地区蜂群的“白头蛹”发生于长途运输后，表明应激因素不同程度降低了蜂群及蜜蜂个体抵抗力，成为引发该病的诱因。

通过病理组织学切片观察发现：发病幼虫正

常组织形态发生改变，有共同特征性病理变化，且流行范围较广泛，说明该病可能是由某种病原体感染引起的，通过对常见蜂病毒的检测结果，推测该病的病原体可能是某种细菌、真菌或其他非病毒性病原。

鉴于此，本研究进行了细菌学检测，从秦皇岛地区分离到 4 株细菌分别命名为 Q1、Q2、Q3 和 Q4、安康地区分离到 2 株细菌分别命名为 A1 和 A2、锦州地区分离到 2 株细菌分别命名为 D1 和 D2，经鉴定该 8 株细菌分别属于粘质沙雷氏菌、肺炎克雷伯氏菌、表皮葡萄球菌、液化沙雷氏菌和蜡样芽胞杆，其中 D1、A1 和 Q1 经基因序列同源性比对后可以确定为同种细菌。BURRITT 等^[22]曾在沙特阿拉伯地区发现并报道了 1 株粘质沙雷氏菌 SS1 引起的蜜蜂细菌性疾病，该病发于冬季，主要感染成年蜜蜂，使其丧

失细胞免疫功能,最终死亡,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)也是医院获得性感染的重要病原体^[28],是一种抵抗多粘菌素的革兰氏阴性短杆菌,属于条件性致病菌,通常与呼吸道、伤口、绒毛膜羊膜炎和泌尿道的感染有关联^[29],近年对人体致病的报道越来越多,说明自然条件逐渐适合该菌生长繁殖并引发疾病。研究中的3个蜂场爆发“白头蛹”前,分别感染中蜂囊状幼虫病、饲喂变质蜂蜜和长途运输等应激因素,一定程度上降低了蜜蜂机体自身的免疫力,给粘质沙雷氏菌侵入机体引发疾病创造了条件。说明在秦皇岛、安康、丹东3个地区的中华蜜蜂养殖场中发生的大规模的“白头蛹”,其病原体可能是条件性致病菌粘质沙雷氏菌,且没有肺炎克雷伯氏菌、液化沙雷氏菌、表皮葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌并在蜜蜂和其他昆虫中引发疾病的相关报道,鉴于此,推测粘质沙雷氏菌可能是引起中华蜜蜂“白头蛹”的病原体。中华蜜蜂分离出的粘质沙雷氏菌后接种中华蜜蜂幼虫,可引起幼虫发病死亡,其剖检变化与自然感染的幼虫相似,进一步确定粘质沙雷氏菌可能是引发此次中华蜜蜂“白头蛹”的病原体,但由于没有对其他分离到细菌做进一步的分析,也不排除其他细菌引起“白头蛹”,未来我们将进一步研究肺炎克雷伯氏菌、液化沙雷氏菌、表皮葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌在“白头蛹”发病过程中所起的作用。

总之,本研究结果初步表明中华蜜蜂“白头蛹”的发生,是应激因素影响下,降低蜜蜂机体自身的免疫力,为粘质沙雷氏菌侵入机体创造了条件、而引发的,然而对于其他分离到细菌在本病发生中是否有作用或起到怎样的作用,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 曹兰,永平,刘佳霖,等.中蜂巢虫防治研究进展[J].中国蜂业,2016,67:33. DOI: 10.3969/j.issn.0412-4367.2016.07.008.
- [2] 罗文华,曹兰,高丽娇,等.不同蜂授粉对重庆设施草莓产量、品质及效益的影响[J].云南农业大学学报(自然科学),2017,32(3):498. DOI: 10.16211/j.issn.1004-390X(n).2017.03.015.
- [3] 陈盛禄.中国蜜蜂学[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [4] ROBINSON W S, NOWOGRODZKI R, MORSE, R A. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops[J]. American Bee Journal, 1989, 129(6): 411. DOI: 10.1073/pnas.0911965107.
- [5] LOSEY J E, VAUGHALL M. The economic value of ecological services provided by insects[J]. BioScience, 2006, 56(4): 311. DOI: 10.1641/0006-3568(2006)56[311:TEVOES]2.0.CO;2.
- [6] SCHMID-HEMPEL R, SCHMID-HEMPEL P. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *bombus terrestris*, in poor and variable environments[J]. Functional Ecology, 1998, 12(1): 22. DOI: 10.1046/j.1365-2435.1998.00153.x.
- [7] KLUSER, STÉPHANE, PEDUZZI, et al. Global pollinator decline: a literature review[J]. Geneva, Switzerland: UNEP/DEWA/GRID-Europe, 2007: 1.
- [8] LIU G N, ZENG Z J. Advances on technology of honeybee larvae reared *in vitro* and its application[J]. Journal of Bee, 2010, 30: 32. DOI: 10.3906/kim-1602-28.
- [9] 吴杰.蜜蜂学[M].北京:中国农业出版社,2012.
- [10] 梁勤,陈大福.蜜蜂保护学[M].北京:中国农业出版社,2009.
- [11] 何传学.中蜂白头蛹解析及其对策[J].蜜蜂杂志,1996,8: 18.
- [12] 杨爽,梁铖,陈顺安,等.东、西方蜜蜂对大蜡螟(*Galleria mellonella* L.)幼虫和成虫的清理行为差异研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2016,31(1): 189. DOI: 10.16211/j.issn.1004-390X(n).2016.01.030.
- [13] 李慧.病理组织石蜡切片制作体会及常见问题解析[J].临床与实验病理学杂志,2014,7(30): 811. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2014.07.032.
- [14] MA M X, YIN Y N, XU X L, et al. Genetic characterization of *VPI* gene of seven sacbrood virus isolated from three provinces in northern China during the years 2008-2012[J]. Virus Research, 2013, 176: 78. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.04.018.
- [15] GRABENSTINER E, BAKONYI T, RITTER W, et al. 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]. Journal of invertebrate pathology, 2007, 94(3): 222. DOI: 10.1016/j.jip.2006.11.006.
- [16] TENTCHEVA D, GAUTHIER L, ZAPPULLA N, et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7185. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004.
- [17] BLANCHARD P, CARLETTI J, SIDDE R, et al. Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 198(15): 82. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.12.006.
- [18] MIRANDA J R D, CORDONI G, BUDGE G. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 103 (Supplement): S30. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.014.
- [19] 蔡信之,黄君红.微生物学实验[M].3版.北京:科学出版社,2012.

- 版社, 2010.
- [20] WEISBURG W G, BAMS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697. DOI: [10.1128/jb.173.2.697-703.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991).
- [21] JOHE G H, NOEL R K, PETER H A S, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*[M]. 9th edn. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1994.
- [22] BURRITT N L, FOSS N J, NEENO-ECKWALL E C, et al. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167752. DOI: [10.1371/journal.pone.0167752](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167752).
- [23] 陈裕文, 江敬皓, 何铠光. 人工饲养蜜蜂幼虫的技术与应用[C]//海峡两岸蜜蜂生物学研讨会, 台北, 2000.
- [24] 戎映君, 苏松坤, 陈集双, 等. 一种新的蜜蜂细菌性幼虫病病原的分离鉴定[J]. *微生物学报*, 2006, 46(6): 994. DOI: [10.13343/j.cnki.wsxb.2006.06.026](https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.2006.06.026).
- [25] PENG Y S C, MUSSEN E, FONG A, et al. Tyler effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared *in vitro*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 60(2): 127. DOI: [10.1016/0022-2011\(92\)90085-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90085-1).
- [26] 李江红, 郑志阳, 洪双燕, 等. 蜜蜂患白垩病虫体内一株球囊菌拮抗细菌的分离与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(5): 973. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2012.05.019](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2012.05.019).
- [27] 韩荣昌. “白头蛹”辨析[J]. *蜜蜂杂志*, 2005(11): 27. DOI: [10.3969/j.issn.1003-9139.2005.01.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-9139.2005.01.010).
- [28] 孔丽清, 齐雅君, 唱丽敏, 等. 我院粘质沙雷氏菌的分布及耐药性分析[J]. *中国试验诊断学*, 2008, 12(12): 1581.
- [29] 王慧卿, 尹慧玲, 陈国华. 51 株粘质沙雷氏菌感染鉴定及药敏分析[J]. *齐鲁医学检验*, 2000, 11(2): 32. DOI: [10.3969/j.issn.1673-5013.2000.02.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5013.2000.02.019).

责任编辑: 何承刚