

DB13

河北省地方标准

DB13/T 5688—2023

蜜蜂微孢子虫病绿色防治技术规程

地方标准信息服务平台

2023-05-06 发布

2023-06-06 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由河北省农业农村厅提出。

本文件起草单位：石家庄赞皇县蕊源蜂业有限公司、中国农业科学院蜜蜂研究所、石家庄市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：王强、王荣申、王岳森、魏月、王岳峰、孟君丽、许亚改、王占江、陈海军、郭伟婷、张艳红、杜义明、刘旭东、孙继强、姚慧敏、谢峰、马丽荣、路伟、张晨、贾二国、王聪敏。

地方标准信息服务平台

蜜蜂微孢子虫病绿色防治技术规程

1 范围

本文件规定了蜜蜂微孢子虫病绿色防治的术语和定义、技术流程图、诊断与鉴定、防控等技术要求。

本文件适用于蜜蜂微孢子虫病症状、形态及分子生物学诊断和综合防治。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 19168 蜜蜂病虫害综合防治规范

SN/T 1683 蜜蜂微孢子虫病诊断方法

OIE 陆生动物卫生法典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蜜蜂微孢子虫

是一种侵染成年蜜蜂中肠上皮细胞引起蜜蜂发病的致病性真菌，包括蜜蜂微孢子虫和东方蜜蜂微孢子虫2个种。

3.2

消毒

指为杀灭包括蜜蜂疫病病原体或寄生虫而采取的一种措施，适用于可能被直接或间接污染的场所、工具及各种物体。

[来源：OIE 陆生动物卫生法典，有修改]。

3.3

监测

指系统而持续地收集、整理和分析与蜜蜂微孢子虫病有关的信息，并及时向相关人士传递信息以便采取相应的措施。

[来源：OIE 陆生动物卫生法典，有修改]。

4 蜜蜂微孢子虫病绿色防治技术

蜜蜂微孢子虫病绿色防治技术流程图(如图1)：

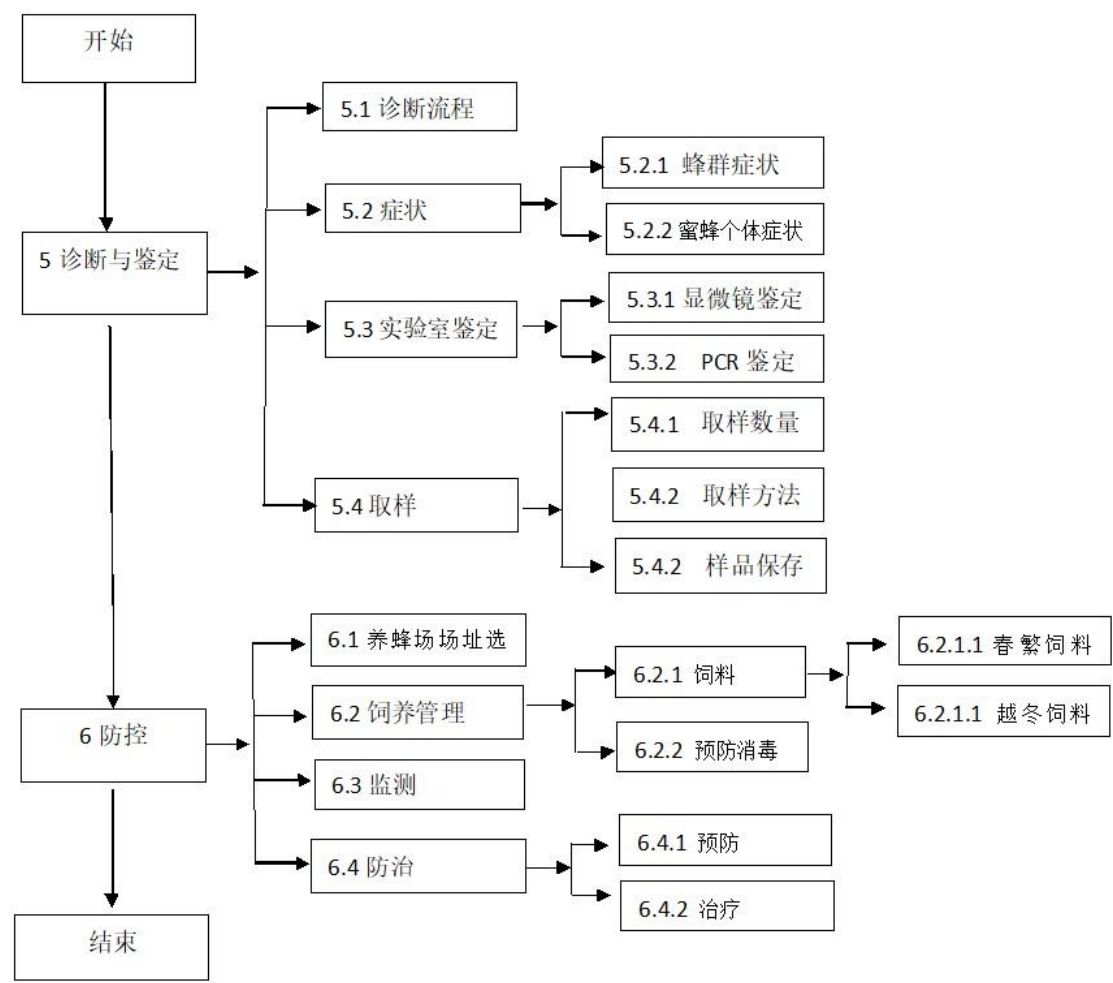


图1 蜜蜂微孢子虫病绿色防治技术流程图

5 诊断与鉴定

5.1 诊断流程

当观察到蜂群出现典型症状时，应遵循先通过个体症状观察初步确诊，再取样后通过显微镜鉴定即可确诊。如需对没有明显症状的蜂群进行早期诊断或例行养蜂场的病害监控则可采用PCR鉴定方法。

5.2 症状

5.2.1 蜂群症状

5.2.1.1 急性重症感染

当蜂群感染处于后期重症阶段时有如下症状：

- a) 蜂群粪便：蜂箱外壁或周围地面会出现大量棕色约 0.5 cm 长的细长条状粪便，或出现粪便变稀、颜色变深现象；
- b) 蜂群表现：在蜂巢入口处及养蜂场地面，会见到患病爬行的和死去的蜜蜂，且蜂群群势急速下降。

5.2.1.2 轻度感染

除了部分成年蜜蜂在蜂箱外爬行外，没有其他异常表现。

5.2.2 蜜蜂个体症状

蜜蜂个体感染病原后可通过如下症状进行初步判断。

- 病蜂活动状况，患病蜜蜂表现出行动迟滞，腹部膨大，飞翔无力等症状；
- 用镊子从具有典型症状的蜜蜂腹部末端夹出中肠及后肠仔细观察，健康蜜蜂中肠呈棕色，环纹明显，并且具有弹性和光泽。如观察到蜜蜂中肠膨大，呈乳白色，环纹不清，失去弹性和光泽，可初步确定为蜜蜂微孢子虫病。

5.3 实验室鉴定

5.3.1 显微镜鉴定

5.3.1.1 样品处理

将采集的蜜蜂样本，分离腹部置于研钵中，加入5 mL~10 mL蒸馏水研磨。取研磨的组织涂片，在明场或相差光学显微镜下以400~600倍进行检查。

5.3.1.2 鉴定

5.3.1.2.1 初诊

如在视野中见到长约5 μm ~7 μm ，宽约3 μm ~4 μm ，椭圆形的孢子，边界折光明显，则可初步确诊。

5.3.1.2.2 鉴别

按SN/T 1683相关方法与酵母、真菌孢子、脂肪体或马氏管变形虫囊包进行鉴别。

5.3.2 PCR 鉴定

5.3.2.1 DNA 提取

提取缓冲液配方见表1：

表1 DNA提取缓冲液配方

试剂名称	浓度
CTAB	0.03 M
Tris	0.05 M
EDTA	0.01 M
NaCl	1.1 M
注：缓冲液最终用ddH ₂ O将pH值调至8.0	

操作步骤如下：

- 取蜜蜂的中肠（取样部位见图1），置于一个预冷的（加入液氮）1.5 mL离心管中并匀浆；
- 离心管中加入 300 μL 提取缓冲液以及 4 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液，置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h
- 加入等体积（300 μL ）的苯酚:氯仿为 1 : 1 的混合液并轻轻混匀，13000 rpm 离心 15 min
- 将上清液移至另一个新管中，沉淀物重复用苯酚:氯仿为 1 : 1 的混合液混匀并离心 1 次，合并 2 次的上清液；
- 加入预冷的 600 μL 95%的乙醇后加入 30 μL 3mol/L 的 NaOAc，轻轻混匀，置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜；
- 10000 rpm 离心 15 min，移去上清液，沉淀用 1 mL 70%的乙醇洗涤两次
- 烘干 10 min 后加入 30 μL ddH₂O，置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min，轻轻溶解混匀管中的沉淀物；
- 10000 rpm 离心 10s 以除去未溶解的物质，即得蜜蜂中肠组织的 DNA；
- 提取的 DNA 溶液置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，备用。



标引序号说明:

- A—中肠;
- B—小肠;
- C—后肠;
- D—蛰针。

图2 蜜蜂中肠取样部位

5.3.2.2 PCR 扩增

将前步所提取的DNA样品稀释5倍进行PCR反应,反应体系及引物按附录A(表A.1、A.2)。将15 μ L PCR反应体系准确吸取至PCR板孔中,设定反应程序为:

- a) 94 $^{\circ}$ C 2.5 min;
- b) 94 $^{\circ}$ C 15 s, 61.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 36 个循环;
- c) 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min;

5.3.2.3 扩增产物的分离与鉴定

扩增产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳进行分离,GoldView染色,照胶。

5.3.2.4 诊断结果与辨别

通过以下凝胶中电泳条带的位置可最终判别蜜蜂是否感染微孢子虫病原及种类:

- a) 只有当凝胶中 115 bp 位置有明显条带时结果可信;
- b) 当凝胶中在 218 bp 位置有明显条带时即可认为样品中含有东方蜜蜂微孢子虫;
- c) 当凝胶中在 321 bp 位置有明显条带时即可判定样品中含有蜜蜂微孢子虫。

5.4 取样

5.4.1 取样数量

为保证所采集的样品具有代表性,应按以下标准确定样品数量。

- a) 蜂群数量 50 群(含)以下的养蜂场选取 1 群取样,每群取样约 20~30 只蜜蜂;
- b) 蜂群数量 50 群以上的养蜂场选取 3 群取样,每群取样约 20~30 只蜜蜂。

5.4.2 取样方法

不同的取样目的应分别遵循如下方法采集样品。

- a) 非定量诊断时,直接从蜂巢入口附近选取具有典型症状的成年蜜蜂;
- b) 定量调查蜂群受感染程度时,随机选取蜂群并随机提取群内 1 张巢脾,随机抓取脾上的成年蜜蜂。

5.4.3 样品保存

常温、干燥保存于纸盒内。

6 防控

6.1 养蜂场场址选择

养蜂场场址按GB/T 19168 3.1蜂场场址的选择给出的要求进行选择。

6.2 饲养管理

6.2.1 饲料

6.2.1.1 春繁饲料

春繁期饲喂蜂蜜花粉时，不使用来历不明的花粉，饲喂前应对花粉进行不少于20 min的蒸汽消毒。

6.2.1.2 越冬饲料

- a) 饲喂越冬饲料前应对饲料进行显微镜检查，如巢脾中的蜂蜜或花粉中发现有微孢子虫则应对巢脾及饲料进行消毒；
- b) 补饲选择蜂蜜或白糖，白糖需要高温溶解；
- c) 越冬饲料的储备量，视群势强弱与越冬期长短贮备蜜脾。

6.2.2 预防消毒

- a) 养蜂器具：春繁前应对养蜂器具进行修整，巢框、巢脾及起刮刀等养蜂器具用 2%~3%氢氧化钠溶液浸泡 30 min 后清水清洗晾干再使用。蜂箱消毒可用火焰喷灯灼烧至微变色；
- b) 巢脾、蜂箱：长期保存的巢脾应置于空蜂箱中，蜂箱应整齐叠放并将所有缝隙密封，然后将盛有 50 mL 浓度 4%冰醋酸的容器放入蜂箱进行熏蒸消毒；
- c) 病死蜂：随时收集养蜂场地面的病蜂及死亡蜂，集中焚烧或深埋，并在养蜂场地面撒生石灰消毒。

6.3 监测

每年从去除越冬包装开始，直至下次越冬包装前，应至少每3个月对蜂群进行1次蜜蜂微孢子虫病的病原监测，定量调查蜂群受感染程度。根据上两个年度的监测记录及当前监测结果随时调整本年度的防控措施。

6.4 防治

6.4.1 预防

结合蜂群的饲喂，将1 g食品级柠檬酸粉剂加入1000 g饲料中，持续饲喂7 d，越冬饲料里不得添加。

6.4.2 治疗

当蜂群出现大量因排泄不畅的爬蜂时，取4 g大黄苏打片，溶于1000 mL浓度为1:1的蔗糖水中，喷脾，每张脾100 mL。大流蜜期内及之前1个月内不得使用。

附 录 A
(规范性)
PCR 反应体系及引物序列

A.1 PCR 反应体系

表A.1 PCR 反应体系试剂配比

试剂	剂量 (μL)	浓度
5×PCR buffer	3	
引物	6	10 μM
One Taq 聚合酶	0.2	5 U/μL
dNTPs	0.5	10 mM
DNA 模板	2	
ddH ₂ O	3.3	
注1: 3对引物的正负引物各1 μL		
注2: 反应体系15 μL		

A.2 引物序列

表A.2 引物序列及扩增产物信息

病原名称	Forward Primer	Reverse Primer	产物大小 (bp)
东方蜜蜂微孢子虫 (<i>Nosema Ceranae</i>)	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	CCCAGTCATTCTCAAAACAAAAACCG	218
蜜蜂微孢子虫 (<i>Nosema Apis</i>)	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA	GGGGGGCGTTTAAATGTGAAACAACATATG	321
内参基因 (RpS5)	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	115