

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2837—2015

蜜蜂瓦螨鉴定方法

Identification of *Varroa* from honey bees

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)制定的《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2012 版)。

本标准由农业部兽医局归口。

本标准起草单位:中国农业科学院蜜蜂研究所。

本标准主要起草人:周婷、王强、代平礼、吴艳艳、周玮、徐书法、王星、段俊明、黄智勇。

蜜蜂瓦螨鉴定方法

1 范围

本标准规定了蜜蜂主要体外寄生瓦螨鉴定方法。

本标准适用于蜜蜂瓦螨——狄斯瓦螨(*Varroa destructor*)、雅氏瓦螨(*V. jacobsoni*)、林氏瓦螨(*V. rindereri*)和恩氏瓦螨(*V. underwoodi*)的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

NY/T 1954 蜜蜂螨病病原检查技术规范

SN/T 1684 瓦螨病诊断方法

3 试剂、材料和仪器

见附录 A。

4 瓦螨的分离方法

4.1 碎屑分离法

4.1.1 随机分离法

将包有铁纱网的薄铁板置于蜂箱底部,通常 1 d~2 d 内产生的碎屑中可见少量的瓦螨。

4.1.2 药物分离法

按照 NY/T 1954 的规定执行。

4.2 封盖子分离法

用刀割去封盖子脾的房盖,再将温水喷淋巢脾,下面放置双层网筛,抖出巢房内的大幼虫或蜂蛹,使蜜蜂大幼虫和蜂蛹留在上层粗网筛上(孔径 2.2 mm),而瓦螨落在下层细网筛中(孔径 1 mm)。

4.3 成年蜜蜂糖粉或面粉分离法

将蜜蜂抖落于大漏斗内,利用 500 mL 或 1 000 mL 容量的广口瓶收集大漏斗内的蜜蜂,约占瓶容量的 1/3。取 10 g 80 目的细糖粉或面粉倒入装有蜜蜂的广口瓶中,瓶口用 3 mm 孔径铁纱网封严;将广口瓶横置放于平面上来回滚动 3 min,使糖粉或面粉均匀黏附至每只蜜蜂体上。将广口瓶瓶口朝下剧烈振荡,使糖粉或面粉及瓦螨振落于光滑白纸上,再分离收集掉落的瓦螨。

5 瓦螨的鉴定方法

5.1 形态学鉴定

利用体视解剖镜观察并记录瓦螨的大小、形状、背板颜色、胸板、生殖腹板、肛板、腹侧板和后足板形状,刚毛对数和足等的形态特征。

5.2 分子生物学鉴定

5.2.1 样本采集

按照第 4 章的分离方法取得瓦螨,并将瓦螨浸于 70%乙醇溶液中,−20℃保存。

5.2.2 总 DNA 简易提取法

单个瓦螨用无菌水洗涤,吸水纸吸干表面;将瓦螨置于 1.5 mL 离心管内,加入 40 μ L 2 \times WLB 缓冲液(其中,蛋白酶 K 终浓度 50 μ g/mL)后进行研磨,50 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min~15 min,冷却至室温,加入 40 μ L 超纯水,1 000 g 离心 5 s 备用。

5.2.3 PCR 扩增瓦螨 mtDNA CO-I 基因片段

5.2.3.1 引物序列

上游引物:5'-GGAGGAGATCCAATTCTATATCAAC-3';

下游引物:5'-CCTGTTATAATAGCAAATAC-3';

预期扩增产物为 458 bp。

5.2.3.2 PCR 扩增体系

| | |
|--------------------------------|--------------|
| PCR 扩增体系总体积为 | 50 μ L; |
| 总 DNA 提取液 | 10 μ L |
| 上、下游引物 | 各 1 μ L |
| Taq 酶 | 0.5 μ L |
| 10 \times buffer | 5 μ L |
| 10 \times dNTP(各 2.5 mmol/L) | 1 μ L |
| 超纯水 | 31.5 μ L |

5.2.3.3 PCR 程序

| | | |
|-----------------|----------|-------------------|
| 94 $^{\circ}$ C | 5 min | } \times 30 个循环 |
| 94 $^{\circ}$ C | 60 s | |
| 50 $^{\circ}$ C | 75 s | |
| 72 $^{\circ}$ C | 90 s | |
| 72 $^{\circ}$ C | 5 min | |
| 4 $^{\circ}$ C | ∞ | |

5.2.3.4 PCR 扩增产物凝胶电泳检测

1.2%琼脂糖凝胶配制方法见附录 A.1.3;5 μ L 扩增产物加 1 μ L 上样缓冲液(6 \times DNA Loading Buffer),DNA Marker I(0.05 mg DNA/mL)用量 4 μ L。120 V,30 min;凝胶成像仪观察,并记录分析;阳性 PCR 产物送测序公司进行序列测定。

5.2.4 瓦螨 mtDNA CO-I 基因限制性内切酶反应体系

5.2.4.1 Sac I 限制性内切酶消化体系

| | |
|----------|-----------|
| Buffer L | 2 μ L |
| Sac I | 1 μ L |
| PCR 产物 | 7 μ L |
| 超纯水 | 8 μ L |

37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,1.2%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,电泳及凝胶成像方法参见 5.2.3.4。

5.2.4.2 Xho I 限制性内切酶消化体系

| | |
|----------|-----------|
| Buffer H | 2 μ L |
| Xho I | 1 μ L |
| PCR 产物 | 7 μ L |
| 超纯水 | 8 μ L |

37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,1.2%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,电泳及凝胶成像方法参见 5.2.3.4。

6 结果判定

6.1 形态学鉴定

狄斯瓦螨形态学鉴定按照 SN/T 1684 和 NY/T 1954 (见图 1); 雅氏瓦螨(体长平均 1 063.0 μm , 宽 1 506.8 μm)与狄斯瓦螨(体长平均 1 167.3 μm , 宽 1 708.9 μm)形态相似, 但前者比后者的体型偏小, 而且更接近圆形(见图 1 和图 2); 林氏瓦螨(体长平均 1 180 μm , 宽 1 698 μm)与狄斯瓦螨相似, 胸板上的刚毛和隙孔数目较少, 气管长且弯曲度较大, 须肢转节无刚毛, 而其他 3 种瓦螨的相应部位均有一根刚毛(见图 1 和图 2); 恩氏瓦螨(体长平均 746.6 μm , 宽 1 167.6 μm)明显小于其他 3 种瓦螨, 体形较狄斯瓦螨横宽; 腹面和背面构造与狄斯瓦螨十分相似, 区别为背板两侧靠后缘各具 15 根~19 根向外放射的粗长刚毛(见图 1 和图 2)。

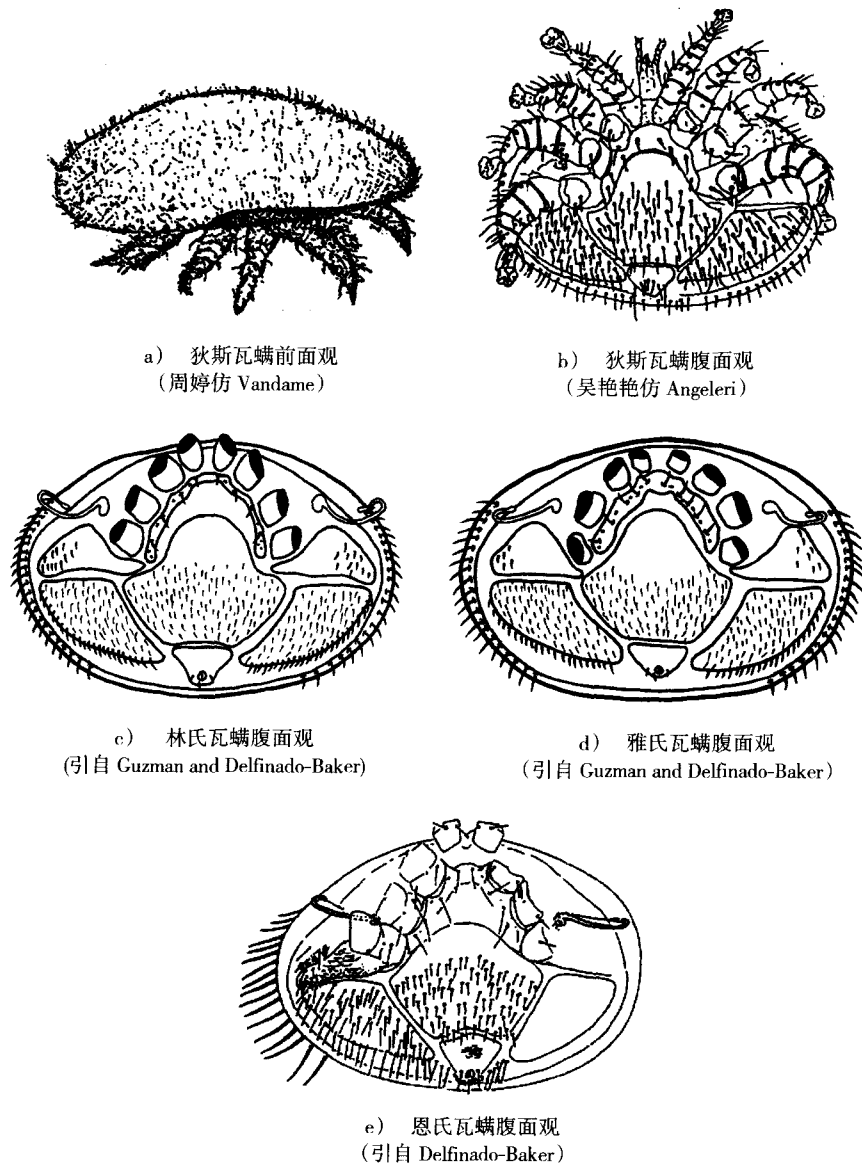


图 1 4 种瓦螨雌螨形态示意图

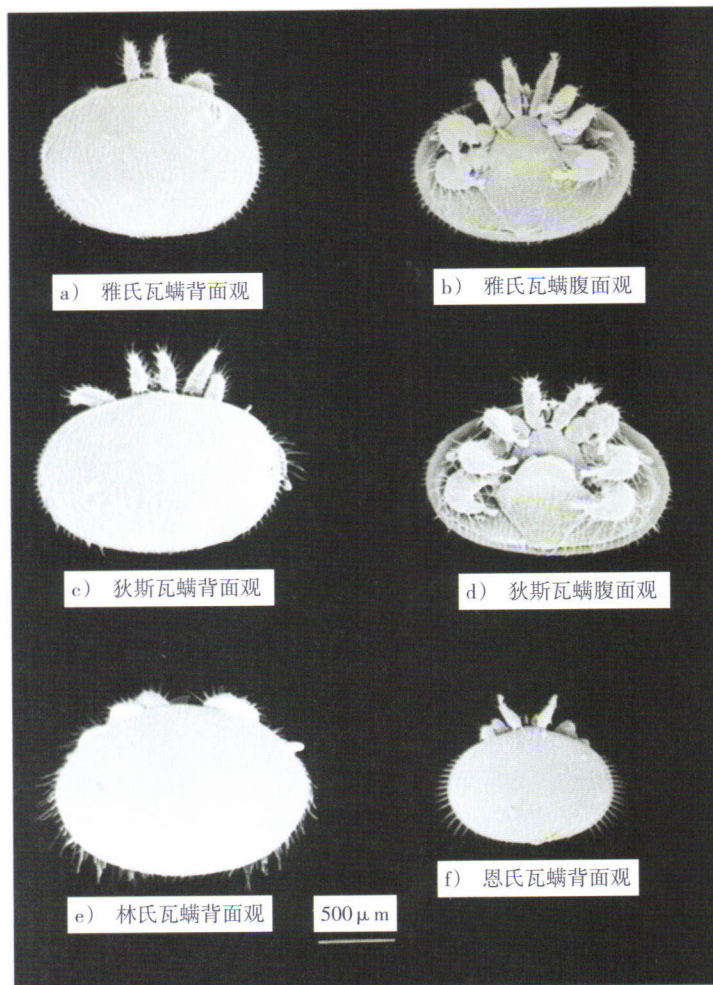


图 2 4 种瓦螨雌螨背面观或腹面观示意图

(引自 Anderson and Trueman)

6.2 分子生物学鉴定

6.2.1 瓦螨 mtDNA CO-I 基因酶切结果鉴定

在形态学初步判断出瓦螨类型。其中,分布在我国的狄斯瓦螨可根据酶切结果快速判定是否属于附录 B 中所列的 3 种基因型(参见图 B. 1)。

6.2.2 瓦螨 mtDNA CO-I 基因核酸序列比对分析

PCR 扩增产物若出现 458 bp 特异性片段,将扩增产物进行测序,对此片段序列与已知瓦螨基因型进行比较分析(参见表 B. 1);若核酸序列与已知瓦螨基因型同源性为 100%,可鉴定为相应瓦螨类型及基因型;若与已知基因型有差异,则为瓦螨新基因型。

附录 A
(规范性附录)
试剂、材料和仪器

A.1 试剂**A.1.1 蜂群中分离瓦螨的试剂**

主要为氟胺氰菊酯条和双甲脒溶液(有效成分 0.05%)。

A.1.2 2× 寄生虫裂解缓冲液(WLB)

| | |
|---------------------------|----------|
| 1 mol/L KCl | 10 mL |
| 1 mol/L Tris | 2 mL |
| 2 mol/L MgCl ₂ | 0.25 mL |
| Tween 20 | 4.5 mL |
| 20% NP-40(乙基苯基聚乙二醇) | 4.5 mL |
| 1% 明胶 | 2 mL |
| 超纯水 | 76.75 mL |

A.1.3 1.2% 琼脂糖凝胶制备

琼脂糖 1.2 g 与 0.5×TBE 电泳缓冲液混合至 100 mL,微波炉中完全融化。待冷至 50℃~60℃ 时,加 Goldenview 溶液 10 μL,摇匀,倒入电泳槽内,待凝固后取下梳子备用。

A.2 材料和仪器**A.2.1 蜂群中分离蜂螨所用材料**

主要为铁纱网(3 mm、2.2 mm 和 1 mm 孔径)、凡士林、放大镜、广口瓶(500 mL 或 1 000 mL)、薄铁板和过 80 目的砂糖粉或面粉。

A.2.2 形态学和分子检测主要仪器

普通解剖显微镜、PCR 扩增仪、核酸电泳仪和水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻离心机、微波炉和恒温水浴锅。

附录 B
(资料性附录)

狄斯瓦螨的 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点情况及基因型序列信息

分布在我国 3 种狄斯瓦螨基因型对应的 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点见图 B. 1; 瓦螨相关基因型序列登录号见表 B. 1。

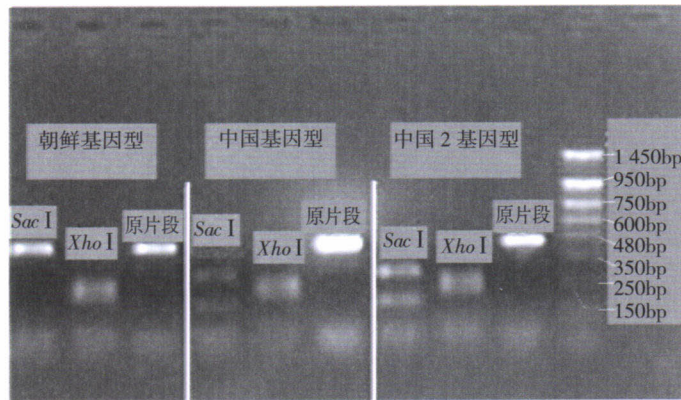


图 B. 1 分布在我国 3 种狄斯瓦螨基因型对应的 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点情况

表 B. 1 瓦螨相关基因型序列登录号

| 瓦螨类型 | 基因型 | GenBank 登录号 |
|------|-------|-------------|
| 狄斯瓦螨 | 朝鲜 | AF106899 |
| | 日本/泰国 | AF106897 |
| | 中国 | AF106900 |
| | 中国 2 | AY372063 |
| | 尼泊尔 | AF106898 |
| | 斯里兰卡 | AF106896 |
| | 越南 | AF106901 |
| 雅氏瓦螨 | 安汶 | AF106908 |
| | 巴厘岛 | AF106909 |
| | 婆罗洲 | AF106907 |
| | 婆罗洲 2 | AY037890 |
| | 弗洛勒斯岛 | AF106902 |
| | 爪哇岛 | AF106910 |
| | 龙目岛 | AF106904 |
| | 马来西亚 | AF106906 |
| | 苏门答腊 | AF106905 |
| | 松巴哇 | AF106903 |

表 B.1 (续)

| 瓦螨类型 | 基因型 | GenBank 登录号 |
|------|------|-------------|
| 未定种 | 吕宋 1 | AF106894 |
| | 吕宋 2 | AF106895 |
| | 棉兰老岛 | AF106893 |
| 林氏瓦螨 | — | AF107261 |
| 恩氏瓦螨 | — | AF107260 |
