



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 35908—2018

---

## 蜜蜂白垩病诊断技术

Diagnostic techniques for chalkbrood of honey bees

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前言 .....	I
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 缩略语 .....	1
4 试剂和材料 .....	1
4.1 水 .....	1
4.2 固定液、染色液和培养基 .....	1
4.3 PCR 检测方法试剂 .....	1
4.4 引物序列及对照样品 .....	1
5 仪器设备 .....	2
6 临床诊断 .....	2
6.1 流行病学 .....	2
6.2 箱外观察 .....	2
6.3 开箱检查 .....	2
6.4 结果判定 .....	2
7 实验室诊断 .....	2
7.1 采样 .....	2
7.2 镜检法 .....	3
7.3 分离培养 .....	3
7.4 PCR 检测 .....	4
8 综合判定 .....	5
附录 A (规范性附录) 固定液、染色液和培养基配方 .....	6
附录 B (规范性附录) PCR 检测方法试剂的配方 .....	7
附录 C (资料性附录) 蜜蜂白垩病发病蜂群的巢门前死虫和病虫症状 .....	9
附录 D (资料性附录) 蜜蜂白垩病发病蜂群的病脾状态 .....	10
附录 E (资料性附录) 蜂球囊菌的光镜下显微图像 .....	11
附录 F (资料性附录) 蜂球囊菌 PCR 产物电泳图 .....	13
附录 G (资料性附录) 蜂球囊菌 PCR 产物参考序列 .....	14

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、福建农林大学、福建赛福食品检测研究所有限公司。

本标准主要起草人:郑腾、张体银、宋战昀、黄少康、李宋钰、张志灯、陈日春、王武军、白泉阳、林素洁。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191212052109 防伪编号: 2019-1212-1035-1662-8515 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

# 蜜蜂白垩病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了蜜蜂白垩病的诊断技术。  
本标准适用于蜜蜂白垩病诊断和病原检测。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EB:溴化乙锭(Ethidium bromide)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

## 4 试剂和材料

### 4.1 水

本标准所用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格要求。

### 4.2 固定液、染色液和培养基

乳酸苯酚固定液(配方见附录 A 中的 A.1)、乳酸棉蓝染色液(配方见 A.2)、病原菌分离培养基(配方见 A.3)。

### 4.3 PCR 检测方法试剂

亚精胺-SDS 缓冲液(配方见附录 B 中的 B.1)、饱和酚、氯仿、3 mol/L 的醋酸钠(pH 5.5)(配方见 B.2)、TE 缓冲液(配方见 B.3)、0.5×TBE 缓冲液(配方见 B.4)、上样缓冲液(配方见 B.5)、1.5%琼脂糖凝胶(配方见 B.6)、Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)、10×PCR 缓冲液、dNTP Mix(10 mmol/L)。

### 4.4 引物序列及对照样品

上游引物(F):5'-TGT CTG TGC GGC TAG GTG-3';

下游引物(R):5'-GAW CAC GAC GCC GTC ACT-3';扩增产物为 442 bp。

蜜蜂蜂球囊菌阳性对照,由指定单位提供或合成含有阳性片段的质粒。

蜜蜂蜂球囊菌阴性对照,可以选用健康且无白垩病临床症状的幼虫作为阴性对照。

## 5 仪器设备

- 5.1 光学显微镜。
- 5.2 恒温培养箱(35 ℃±1 ℃)。
- 5.3 A2 型二级生物安全柜。
- 5.4 冰箱(2 ℃~8 ℃和-20 ℃)。
- 5.5 PCR 仪。
- 5.6 电泳仪。
- 5.7 冷冻离心机。
- 5.8 凝胶成像系统。

## 6 临床诊断

### 6.1 流行病学

西方蜜蜂的幼虫易患蜜蜂白垩病,病虫和病菌污染的饲料、蜂具是主要的传染源。菌丝和孢子均具有侵染性,它们可由成年蜂或蜂螨体表携带并在蜂群内或蜂群间传播。白垩病主要引起老熟幼虫和封盖幼虫死亡,3 日龄~4 日龄雄蜂幼虫和 4 日龄~5 日龄工蜂幼虫最易感染白垩病,蜂场内蜂群的发病率可达 10%~50%,幼虫感染率为 5%~40%,成年蜂虽不易感染,但是病原的携带者和传播者。白垩病的发生有明显的季节性,多发生在春夏的 6 月~8 月高温、高湿季节。凡是日照长、地势高燥的地方,白垩病发病率低,一般为 3%~5%,或根本不发病;而气温高、湿度大、光照不足的地方,白垩病危害严重。

### 6.2 箱外观察

患病蜂群的巢门口可见被工蜂拖出的幼虫干尸,质硬,有的干尸呈苍白色,似葵花仁状,表面有一层绒毛膜,掰开幼虫干尸可见内心为浅棕色;有的干尸为部分或全部黑色,似西瓜子状,表面有一层黑色颗粒状物质。(参见附录 C)

### 6.3 开箱检查

从患病蜂群中提出封盖子脾,在已封盖的部分有呈星点式分布被工蜂咬开的巢房,可见内有向一侧贴壁的幼虫干尸,形态完整,质地柔韧,无光泽,无臭味,用镊子取出后,可见有的为白色,有的为部分或全部黑色。健康的蜜蜂幼虫是呈有光泽、珍珠样外观。(参见附录 D)

### 6.4 结果判定

结合该病的流行特点,若蜂群出现 6.1 和 6.2 的典型症状,即可判定为临床诊断阳性。

## 7 实验室诊断

### 7.1 采样

根据临床诊断结果,选择疑似感染的蜂群采集蜜蜂幼虫样品。采样时,应尽量无菌采集变色或死亡幼虫,样品保存于 2 ℃~8 ℃的条件下,24 h 内送实验室检测。

## 7.2 镜检法

### 7.2.1 处理方法

取虫尸样品于无菌培养皿中,用无菌解剖刀刮取样品表面物质置于干净的载玻片上,加1滴~2滴水或乳酸苯酚固定液,在显微镜下观察,可见呈白色的似棉花般的菌丝或黑色的含有孢子球的孢囊。也可用乳酸棉蓝染色液进行染色,染色后菌丝呈蓝色(参见附录 E)。

### 7.2.2 典型特征

镜检时,蜂球囊菌的子实体为特征性的鉴定部位,墨绿色的孢囊呈球形(参见附录 E),自外向内有3层结构:最外层为墨绿色的闭囊壳,其中包裹着许多球形的子囊,子囊无外膜,子囊中又有大量的椭圆形的子囊孢子,不同子囊果中子囊的大小和数目也有不同(参见附录 E)。待子实体成熟后,子囊壁消融,子囊孢子积聚成为孢子球,并被有外膜。子囊及带有孢子的子囊在该菌生长过程中很少见,一般待孢囊成熟,子囊壁已不存在,所以显微镜下看见的孢囊内的球形孢子团只是孢子球,每个孢子球的大小不一,内含的孢子数也不同。成熟的孢囊会自行破裂,释放出孢子(参见附录 E)。蜂球囊菌有两个变种,即大孢球囊霉和蜜蜂球囊霉,其区别在于成熟的滋养细胞和孢囊、孢子大小不同,两变种间彼此不能杂交。蜜蜂球囊霉的孢囊直径通常为  $32\ \mu\text{m}\sim 99\ \mu\text{m}$ ,平均为  $65.5\ \mu\text{m}$ ,孢子( $3\ \mu\text{m}\sim 3.8\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $1.5\ \mu\text{m}\sim 2.3\ \mu\text{m}$ );大孢球囊霉的孢囊直径一般为  $88.4\ \mu\text{m}\sim 168.5\ \mu\text{m}$ ,平均  $128.4\ \mu\text{m}$ ,孢子比前者大10%。

### 7.2.3 结果判定

根据镜检观察到的典型特征可判为疑似阳性。

## 7.3 分离培养

### 7.3.1 培养方法

无菌操作条件下,将虫样剪成  $1\ \text{mm}\times 2\ \text{mm}$  的小方块,置于  $75\%\pm 5\%$  的乙醇中消毒 2 min 后接种于病原菌分离培养基平板上,  $35\ \text{C}\pm 1\ \text{C}$  下培养 5 d~7 d,逐日检查菌丝生长和孢囊产生的情况,待孢囊产生后挑取孢囊纯化至纯培养。

### 7.3.2 生长特性

在分离培养时,可见蜂球囊菌的菌落呈白色,较致密,中央凸起,菌落老化时颜色变成浅棕色至棕色。菌丝多呈分支状,二叉分枝间距较大,菌丝体呈疏松的蛛网状。菌丝均匀具横隔膜,直径为  $2.5\ \mu\text{m}\sim 6.0\ \mu\text{m}$ ,菌丝细胞多核,雌性菌丝能长出有横隔壁隔离的藏卵器,雄性菌丝能形成体积很小的呈纺锤形的藏精器,雌雄菌丝相交后几小时内即可形成黑色的孢子带,而同性菌丝相交处则没有黑色的孢子带,有时两性菌丝混合长成一个菌落,往往成为不规则的黑色孢子带。

### 7.3.3 镜检

分别挑取少量的菌丝和子实体置于载玻片上,加1滴~2滴无菌水或乳酸苯酚固定液,在400倍~600倍的显微镜下观察,可见树枝状分支的有隔菌丝和墨绿色孢囊,孢囊内含有许多大小不等的孢子球,破裂的孢囊可释放出大量的子囊孢子(参见附录 E)。

### 7.3.4 动物感染试验

试验应在严格的隔离设施中进行,并应符合 GB 19489 中有关实验室的生物安全要求。将已分离

纯化的蜂球囊菌接种于病原菌分离培养基,35℃±1℃培养5d~7d,待孢囊发育成熟并释放出子囊孢子时,用水将产生孢囊的菌丝制成菌悬液,菌悬液至少应含有 $2 \times 10^6$ 个孢子/mL。选用无病群健康的西方蜜蜂幼虫脾,以1日龄~2日龄健康的西方蜜蜂幼虫为试验对象,以水为对照液,分别给健康的幼虫滴喂菌悬液和对照液,滴喂量为2μL。

蜜蜂幼虫经滴喂菌悬液后,第1天~第3天无异常,感染幼虫与健康幼虫无明显区别;第4天起有部分感染幼虫出现死亡,随后每天的死亡数量逐日增加;第6天~第7天时死亡量达到高峰;第10天左右死亡幼虫体壁开始长出白色菌丝,开始呈苍白色,继而发展为暗灰色,继续发展变成僵硬的石灰质块。

幼虫发病初期膨胀柔软,腹面出现菌丝,巢房壁上也粘有菌丝。至中期虫体布满菌丝,较初期萎缩且逐渐硬僵化,形状似粉笔块,部分虫体有黑色子实体覆于体表。病至末期,部分虫体被成年工蜂拖出巢房,散布于箱底、箱门口或蜂箱前地面。留有白垩病幼虫尸的巢房口被一层白色或淡黄色的菌丝封闭。

### 7.3.5 结果判定

依据病原在分离培养过程中的生长特性以及镜检结果进行判定,与7.3.2和7.3.3的结果相符的可判为阳性,必要时可以进行动物感染试验。

## 7.4 PCR检测

### 7.4.1 病原培养

培养方法同7.3.1。

### 7.4.2 DNA抽提

取0.5g~2.0g纯化好的新鲜或者冷冻的菌丝体放入灭菌研钵中,加入液氮充分研磨,将研磨好的菌丝粉转移到装有15mL亚精胺-SDS缓冲液的试管中,充分振荡20min后,用等体积的饱和酚进行抽提,重复抽提1次。取水相用等体积的氯仿进行萃取,再取水相加入1/10水相体积的3mol/L的醋酸钠(pH 5.5)和2倍水相体积预冷的无水乙醇,颠倒混匀,4℃下10000g离心10min;弃上清,沉淀用预冷的70%乙醇清洗,4℃下10000g离心10min,弃上清,沉淀干燥后加1mL TE缓冲液溶解,-20℃保存备用。本步骤也可采用等效DNA提取试剂及方法。

### 7.4.3 PCR扩增

按下列方法配制25μL的PCR扩增反应体系:

10×PCR缓冲液	2.5 μL
10 mmol/L dNTP Mix	0.5 μL
Taq DNA聚合酶(5U/μL)	0.5 μL
上游引物 F(10 mmol/L)	1 μL
下游引物 R(10 mmol/L)	1 μL
DNA模板	1 μL
水	18.5 μL

反应程序:94℃预变性10min;94℃45s,60℃45s,72℃60s,运行30个循环;72℃10min;4℃保存。以水作为空白对照,同时设阳性对照和阴性对照。

### 7.4.4 PCR产物的检测

制备1.5%的琼脂糖凝胶,取扩增产物、阳性对照、阴性对照和空白对照各10μL进行电泳,恒压

5 V/cm~8 V/cm,电泳 30 min~60 min;紫外检测仪下观察结果。

#### 7.4.5 试验成立的条件

蜜蜂球囊菌 PCR 标准阳性对照出现一条约 442 bp 的特异 DNA 条带,标准阴性对照和空白对照没有任何核酸条带,说明试验成立。

#### 7.4.6 结果判定

待检样品 PCR 扩增产物经电泳出现约 442 bp 的 DNA 条带,可以初步判为蜜蜂球囊菌核酸阳性(参见附录 F)。确证时需对 PCR 扩增产物进行测序,与参考序列(参见附录 G)进行比对。

### 8 综合判定

凡具有第 6 章的临床症状,并满足 7.2 和 7.3,或满足 7.4 均可判为蜜蜂白垩病。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

## 附录 A

(规范性附录)

## 固定液、染色液和培养基配方

## A.1 乳酸苯酚固定液的制备

乳酸	10 mL
结晶苯酚	10 g
甘油	20 mL
水	10 mL

将酚、乳酸、甘油混合,徐徐加热溶解即可。

## A.2 乳酸棉蓝染色液的制备

乳酸	20 mL
结晶苯酚	20 g
甘油	40 mL
棉蓝(水溶苯胺蓝)	0.05 g
水	20 mL

将酚、乳酸、甘油混合,徐徐加热溶解后,加入棉蓝混匀溶解。

## A.3 病原菌分离培养基的制备

## A.3.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基的制备

将去皮马铃薯 200 g 切成片,加水 1 000 mL,煮沸 30 min~40 min,过滤,将 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂,趁热加入溶化,调节 pH 至 7.0,在 0.105 MPa 的压力下,高温灭菌消毒 15 min。

## A.3.2 病原菌分离培养基的制备

马铃薯葡萄糖琼脂培养基	95 mL
酵母粉	5 g
氯霉素	5 mg

将以上各种成分混合溶解,在 0.105 MPa 的压力下,高温灭菌消毒 20 min。

## 附录 B

(规范性附录)

## PCR 检测方法试剂的配方

## B.1 亚精胺-SDS 缓冲液的制备

## B.1.1 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 50 mL 的配制

Tris 碱 6.06 g, 加水 40 mL 溶解, 滴加浓 HCl 约 2.1 mL 调 pH 至 8.0, 定容至 50 mL。

## B.1.2 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 50 mL 的配制

称取 EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9.306 g, 加水 35 mL, 剧烈搅拌, 用约 1 g NaOH 颗粒调 pH 至 8.0, 定容至 50 mL。

B.1.3 1 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇 100 mL 的配制

2-巯基乙醇原液	6.5 mL
水	93.5 mL

B.1.4 亚精胺-SDS 缓冲液 (4 mmol/L 亚精胺; 10 mmol/L EDTA; 0.1 mol/L NaCl; 0.5% SDS; 10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 的配制

亚精胺	1.02 g
NaCl	5.85 g
SDS	5 g
1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	20 mL
1 mol/L $\beta$ -巯基乙醇	10 mL

加水调整体积至 1 000 mL。

## B.2 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.5) 的制备

NaAc $\cdot$ 3H <sub>2</sub> O	40.8 g
水	40 mL

搅拌溶解, 加入冰醋酸调节 pH 值至 5.5, 加水定容至 100 mL。

## B.3 TE 缓冲液的制备

## B.3.1 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 50 mL 的配制

Tris 碱	6.06 g
水	40 mL

溶解后滴加浓 HCl 约 2.1 mL 调 pH 至 8.0, 加水定容至 50 mL。

### B.3.2 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)50 mL 的配制

称取 EDTA-Na<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 9.306 g,加水 35 mL,剧烈搅拌,用约 1 g NaOH 调 pH 至 8.0,加水定容至 50 mL。

### B.3.3 1×TE(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;1 mmol/L EDTA, pH 8.0)的配制

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	0.2 mL

加水定容至 100 mL。

### B.4 0.5×TBE 缓冲液制备

按以下过程配制相关溶液:

a) 先按以下要求配制 5×TBE 缓冲液:

Tris 碱	54 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL

加水定容至 1 000 mL。

b) 再使用 5×TBE 缓冲液配制 0.5×TBE 缓冲液:  
取 5×TBE 缓冲液 100 mL,加水定容至 1 000 mL。

### B.5 上样缓冲液制备

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g

加水定容至 100 mL。

### B.6 1.5%琼脂糖凝胶的制备

琼脂糖	0.75 g
0.5×TBE 缓冲液	50 mL

加热溶解,冷却到 50 °C~60 °C 左右时加入 5 μL 的 EB(也可用其他核酸染料),倒入胶槽内自然凝固。

附录 C  
(资料性附录)

蜜蜂白垩病发病蜂群的巢门前死虫和病虫症状

蜜蜂白垩病发病蜂群的巢门前死虫和病虫症状见图 C.1 和图 C.2。



图 C.1 巢门口死虫



图 C.2 病虫状态

附 录 D

(资料性附录)

蜜蜂白垩病发病蜂群的病脾状态

蜜蜂白垩病发病蜂群的病脾状态见图 D.1。

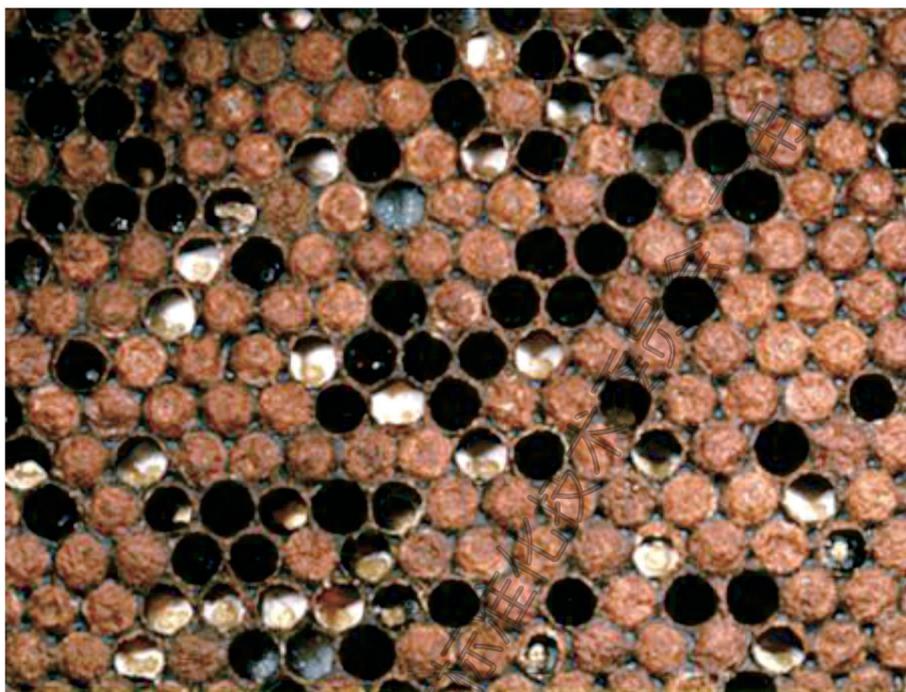


图 D.1 病脾状态

附录 E  
(资料性附录)

蜂球囊菌的光镜下显微图像

蜂球囊菌的光镜下显微图像见图 E.1~图 E.4。

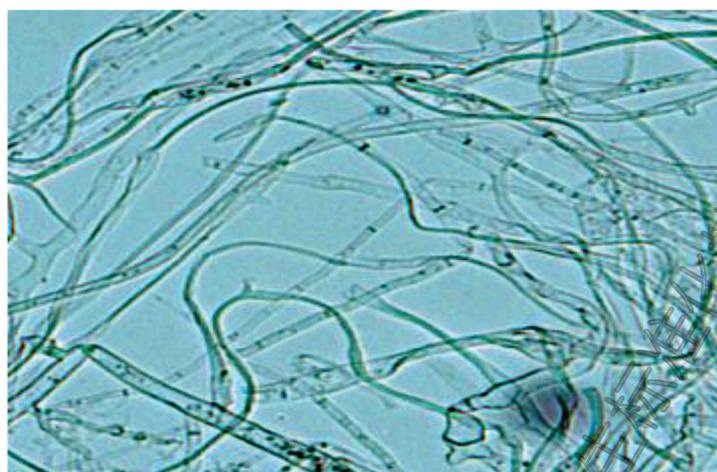


图 E.1 菌丝的形态(100×)

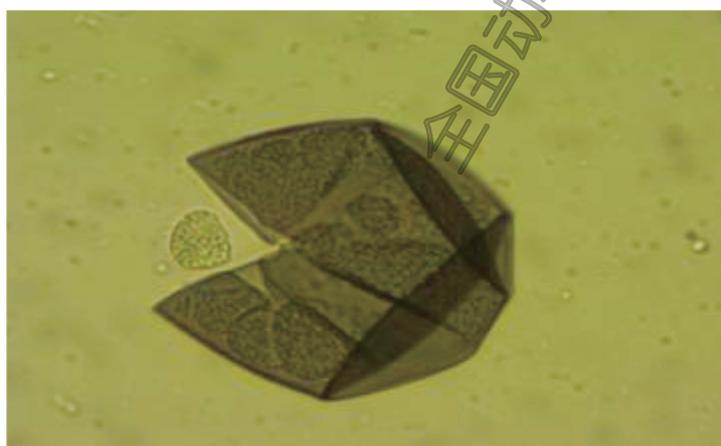


图 E.2 破裂的子囊果(400×)

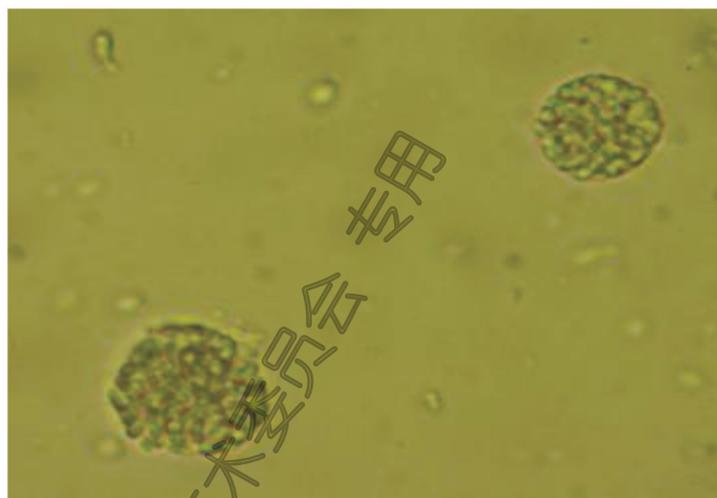


图 E.3 子囊(1 000×)

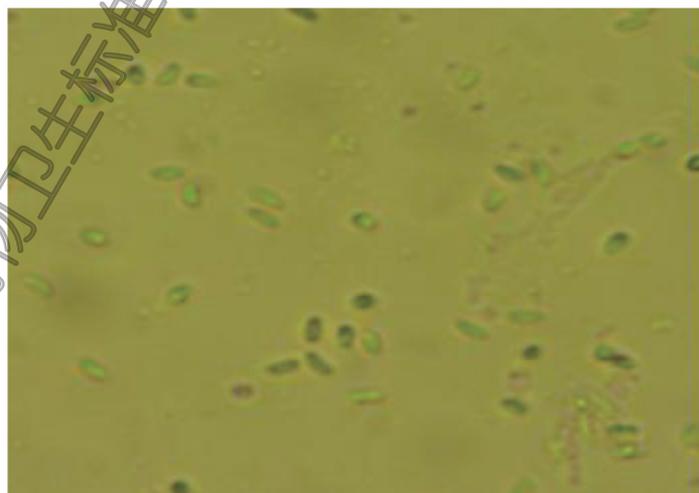
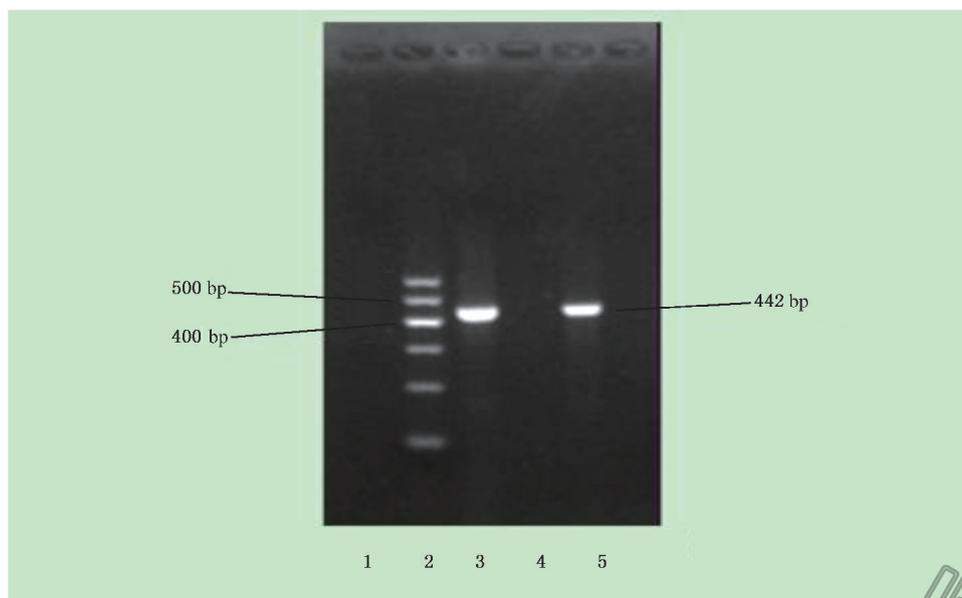


图 E.4 子囊孢子(1 000×)

附录 F  
(资料性附录)  
蜂球囊菌 PCR 产物电泳图

蜂球囊菌 PCR 产物电泳图见图 F.1。



说明：

- 1——空白对照；
- 2——DNA Marker；
- 3——阳性对照；
- 4——阴性对照；
- 5——样品。

图 F.1 PCR 产物电泳图

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 G  
(资料性附录)

蜂球囊菌 PCR 产物参考序列

1     tgtctgtgcg gctaggtgcc cctaaacaag gcctgcccgc gcactcccac  
51     ccttgtctac cttacctgtt gcttcggcgg gcctgcccgt tctcgcgagc  
101    ctgtgccgg aggggttagt tccccctgg ctagecgtccg ccgaagataa  
151    acgaactcca gtcgaagatt gaagtctgaa gaaaattgat aaataaatca  
201    aaactttcaa caacggatct cttggttccg acatcgatga agaacgcagc  
251    gaaatgcgat aagtaatgtg aattgcagaa ttcgtgaat catcgaatct  
301    ttgaacgcac attgcgcct ctggtattcc ggggggcatg cctgtccgag  
351    cgtcattgca accctcaagc acggtttgtg tgttgggcga tcgtcccgtc  
401    ttaggaggga cgcgcccgaag aggcagtgac ggcgtcgtgt tc

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

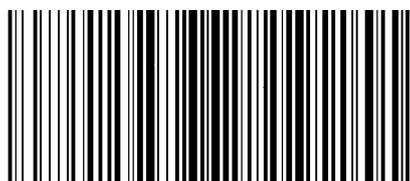
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网  
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 35908-2018  
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会  
订单号: 0100191212052109  
防伪号: 2019-1212-1035-1662-8515  
时 间: 2019-12-12  
定 价: 36元



GB/T 35908-2018

中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

蜜蜂白垩病诊断技术

GB/T 35908—2018

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年2月第一版

\*

书号: 155066·1-59557

版权专有 侵权必究