

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1938—2007

蜜蜂白垩病检疫规范

Quarantine protocol for chalkbrood disease of bees

2007-08-06 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
蜜 蜂 白 垩 病 检 疫 规 范
SN/T 1938—2007

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字

2007年11月第一版 2007年11月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-18193 定价 12.00 元

前 言

本标准的附录 A 是规范性附录,附录 B、附录 C 和附录 D 是资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:郑腾、孙颖杰、张志灯、白泉阳、赵兴存、王武军、李志方。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

蜜蜂白垩病检疫规范

1 范围

本标准规定了蜜蜂白垩病的检疫规范。

本标准适用于蜜蜂白垩病的检疫,可用于蜜蜂蜂球囊菌的分离与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

蜂王 queen bee

又称母蜂,是由受精卵发育而成的生殖器官发育完全的雌蜂,具二倍染色体,在蜂群中专司产卵,是蜜蜂品种种性的载体,并起到团结蜂群的作用。

3.2

工蜂 worker bee

由受精卵发育而来的生殖器官发育不完全的雌性蜂,具二倍染色体,有执行巢内外工作的器官。工蜂在蜂群中个体最小,而数量却占绝大多数,担负着蜂群内外的主要工作。

3.3

雄蜂 drone bee

由未受精的卵发育而成的蜜蜂,具单倍染色体,头近圆形,身体粗壮,体毛多而长,色深,翅大覆盖整个体表。它是季节性蜜蜂,职能是平衡性别关系和寻求与处女王交配,只有在蜂群需要时才出现。

3.4

蜂巢 honeybee nest

蜜蜂繁衍生息、贮藏食粮的场所,由工蜂泌蜡筑造的1片或多片与地面垂直、间隔并列的巢脾构成,巢脾上布满蜂房。

3.5

巢脾 comb

一般是由12日龄~18日龄的工蜂分泌蜡鳞筑造而成,每片巢脾称为子脾。从事造脾的工蜂,吸饱蜂蜜后连成串蜂链,悬挂在造脾施工点或附近,数小时后,蜡液外泌到蜡镜并凝固成蜡鳞,经充分咀嚼并混入上颚腺的分泌物后,将成海绵状的蜡块固定在巢脾上。

3.6

封盖巢房 capped cell

在子脾上,封盖子一般位于巢脾的中下部,巢房呈黄褐色,形状规则,轮廓清晰;封盖蜜则位于巢脾的上部至两角向下发展,色浅,巢房轮廓不清晰,具波浪纹。西方蜜蜂雄蜂房封盖突出,似馒头状。

4 检验检疫

4.1 设备、材料和试剂

4.1.1 设备

- 4.1.1.1 光学显微镜。
- 4.1.1.2 恒温培养箱。
- 4.1.1.3 超净工作台。
- 4.1.1.4 药品冷藏箱(2℃~8℃)。

4.1.2 材料

- 4.1.2.1 无菌培养皿。
- 4.1.2.2 载玻片。
- 4.1.2.3 试管(10 mL)。
- 4.1.2.4 无菌镊子。
- 4.1.2.5 无菌解剖刀。
- 4.1.2.6 无菌解剖剪。
- 4.1.2.7 移液器。
- 4.1.2.8 血球计数板。

4.1.3 试剂

- 4.1.3.1 试验用水:本标准所用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格要求。
- 4.1.3.2 乳酸苯酚固定液(配方见附录 A)。
- 4.1.3.3 乳酸棉蓝染色液(配方见附录 A)。
- 4.1.3.4 75%酒精。
- 4.1.3.5 0.85%无菌生理盐水。
- 4.1.3.6 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(配方见附录 A)。
- 4.1.3.7 酵母粉。
- 4.1.3.8 氯霉素。

4.2 检验检疫方法

4.2.1 现场检验检疫

4.2.1.1 箱外检查

患病蜂群的蜂箱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 B)。

4.2.1.2 开箱检查

从患病蜂群的蜂箱中提出幼虫的封盖子脾,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 C)。

4.2.2 采样

4.2.2.1 采样比例

当蜂群数量小于或等于 10 群时,所有蜂群均采样。当数量在 10 群~100 群时,以 10 群采样量为基础,每增加 10 群,采样量增加 1 群。当蜂群数量为 101 群~200 群时,按总群数的 15% 采样。当蜂群数量为 201 群以上时,按总群数的 10% 采样。采样时,每群蜂取 10 只~20 只幼虫送实验室检疫。若现场检验检疫时,发现蜂群疑似感染蜂球囊菌时,可以根据实际情况,增加采样的比例。

4.2.2.2 采样方法

从每个蜂群中随机抽取子脾一张,按照5点式采样方法,分别从巢脾四角与中央各开启封盖幼虫房2个~4个,观察是否有患病幼虫存在。采样时,应尽量无菌采集变色或死亡幼虫尽快送实验室检查,样品可保存于2℃~8℃的条件下。

4.2.3 实验室检测

4.2.3.1 镜检法

取虫尸样品于无菌培养皿中,用经消毒的解剖刀刮取样品表面物质置于干净的载玻片上,加1滴~2滴无菌蒸馏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。

4.2.3.2 分离培养

无菌操作条件下,将虫样剪成1 mm×2 mm的小方块,置于75%的酒精中消毒2 min后接种于病原菌分离培养基(配方见附录A)平板上,35℃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。若还有采集蜂蜜样品,每个蜂蜜样品取5 mL,加入5 mL 0.85%的无菌生理盐水,充分混合均匀,在3个无菌培养皿中分别加入1 mL的稀释样,再加入约10 mL~15 mL病原菌分离培养基,35℃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。

接种时分别挑取少量的菌丝和子实体置于载玻片上,加1滴~2滴无菌蒸馏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。也可用乳酸棉蓝染色液进行染色,染色后菌丝呈蓝色。

4.2.4 动物感染试验

以下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℃培养5 d~7 d,待孢囊发育成熟并释放出子囊孢子时,用灭菌蒸馏水将产生孢囊的菌丝制成菌悬液,每毫升菌悬液至少应含有 2×10^6 个孢子。

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,以灭菌蒸馏水为对照液,用移液器分别给健康的幼虫滴喂菌悬液和对照液,滴喂量为2 μ L。

蜜蜂幼虫经滴喂菌悬液后,第1天至第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天至第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。

4.2.5 结果判定

在现场检验检疫时,若见到巢门前、箱底或巢脾上有长有白色菌丝或黑白两色的幼虫尸等临床症状时,可做出初步判断。

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 μ m~6.0 μ 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。

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D),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D)。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D)。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 $(3\sim 3.8)\ \mu\text{m}\times(1.5\sim 2.3)\ \mu\text{m}$;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%。

一般通过现场检验检疫、分离培养和镜检后,即可对蜜蜂白垩病进行确诊。若需要时,可以结合动物感染试验,做出最终判断。

附录 A

(规范性附录)

固定液、染色液和培养基的配方

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, 蒸馏水 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, 蒸馏水 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。染色时, 将染色液滴加于载玻片上, 挑取待检菌于染液中, 置显微镜下观察。

A.3 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.4 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

(资料性附录)

蜜蜂白垩病发病蜂群的巢口死虫和病虫症状



图 B.1 巢口死虫

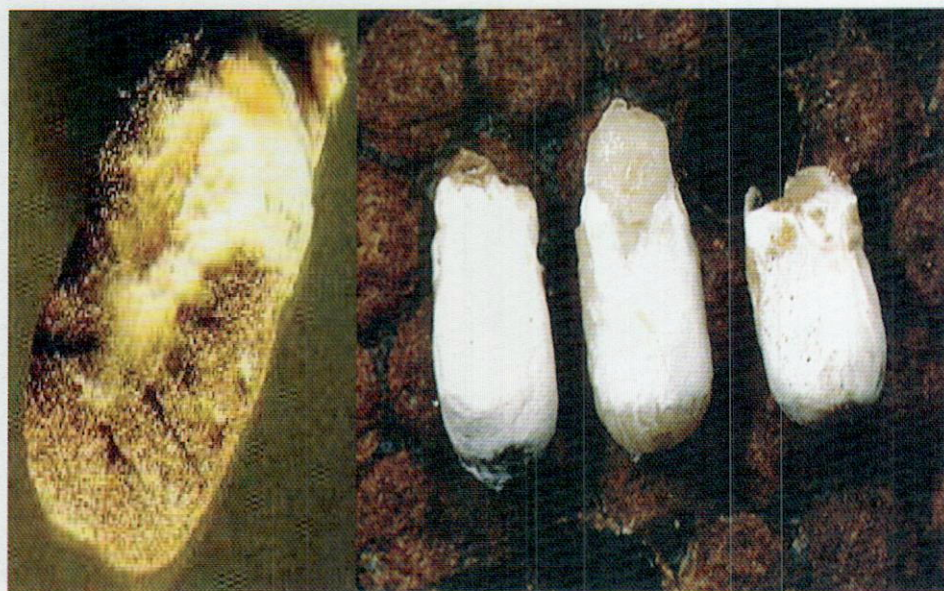


图 B.2 病虫状态

附录 C
(资料性附录)

蜜蜂白垩病发病蜂群的病脾状态

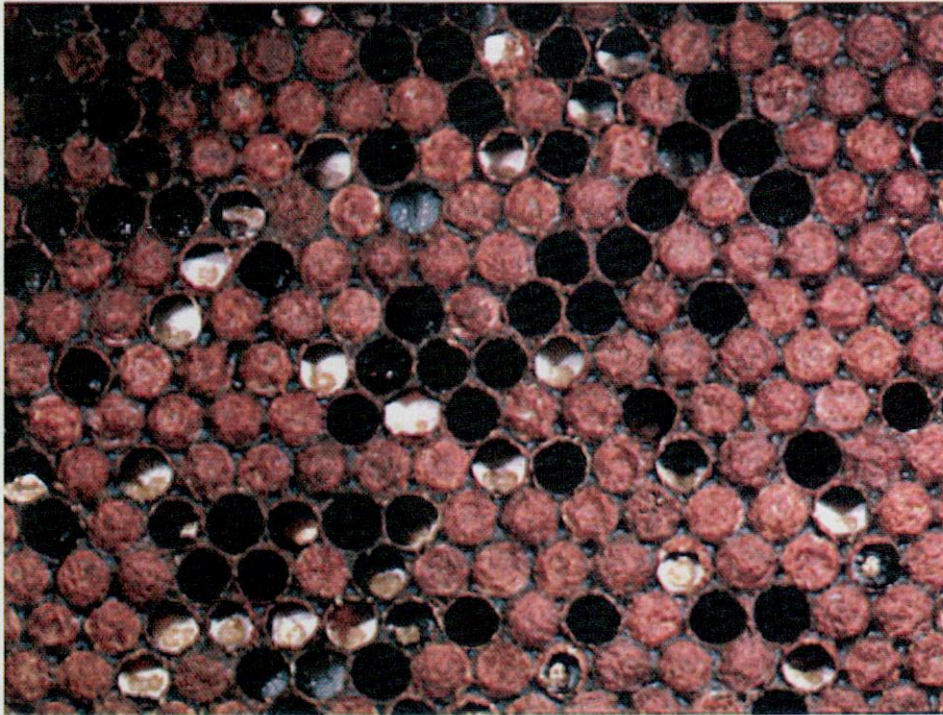


图 C.1 病脾状态

附录 D
(资料性附录)
蜂球囊菌子实体的显微图像

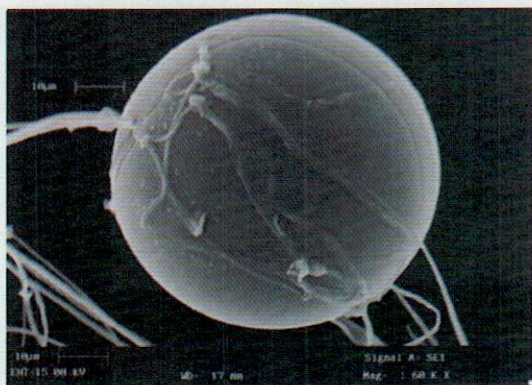


图 D.1 孢囊

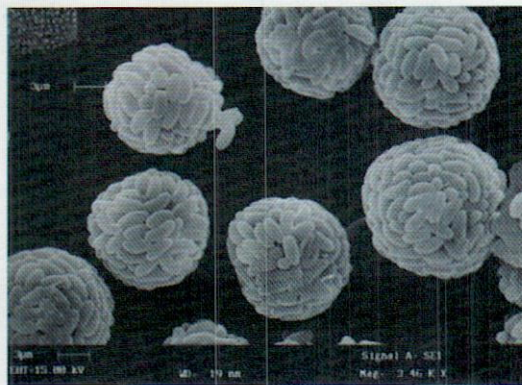


图 D.2 包含子囊孢子的子囊

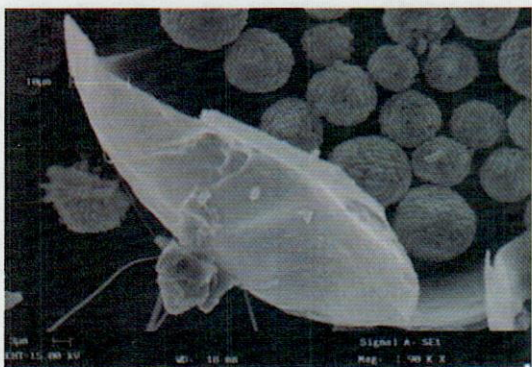
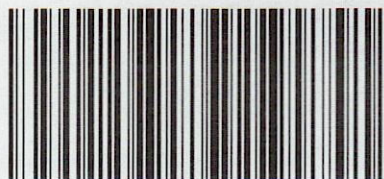
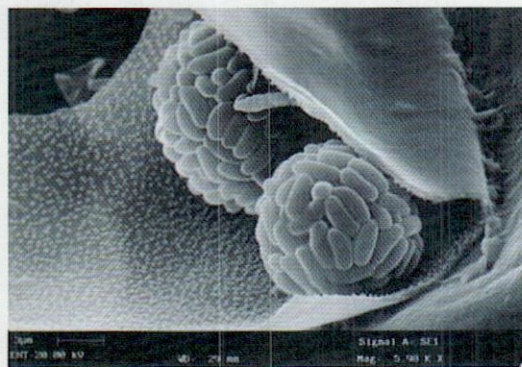


图 D.3 破裂的孢囊



SN/T 1938—2007

书号:155066·2-18193

定价: 12.00 元