



邓洁, 王帅, 陈功文, 胡福良, 郑火青. 狄斯瓦螨和蜜蜂病毒对意大利蜜蜂蜂群越冬的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (4): 1003 - 1009.

狄斯瓦螨和蜜蜂病毒对意大利蜜蜂蜂群越冬的影响

邓洁, 王帅, 陈功文, 胡福良, 郑火青*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 越冬期是蜂群损失最主要的阶段。通过比较分析 45 个意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 蜂群在繁殖越冬蜂前的狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 寄生率和病毒感染情况、越冬表现及越冬期存活蜂群的病毒感染情况等, 探究与越冬期蜜蜂健康紧密相关的影响因素。结果表明, 繁殖越冬蜂前蜂群的狄斯瓦螨寄生率与蜜蜂残翅病毒 (DWV) 和以色列急性麻痹病毒 (IAPV) 基因组拷贝数呈中等线性相关关系 ($p_{DWV} = 0.003$, $p_{IAPV} = 0.001$), 且狄斯瓦螨寄生率低于 9% 的蜂群与 DWV 感染程度相关性更高, 而寄生率高于 9% 的蜂群与 IAPV 的相关性更高。越冬期死亡蜂群在繁殖越冬蜂前的狄斯瓦螨寄生率和 IAPV 病毒基因组拷贝数均显著高于存活蜂群。狄斯瓦螨和 IAPV 是本次实验中意大利蜜蜂越冬期健康的首要影响因素。结合狄斯瓦螨寄生率和 IAPV 基因组拷贝数的正相关性, 本研究认为在繁殖越冬蜂前将蜂螨寄生率控制在较低水平 (9% 以下) 能有效减少越冬期意大利蜜蜂蜂群损失。

关键词: 意大利蜜蜂; 狄斯瓦螨; 蜜蜂病毒; 越冬期蜂群损失

中图分类号: Q968.1; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 04-1003-07

Impacts of *Varroa destructor* and honeybee viruses on the overwintering of *Apis mellifera ligustica* colonies

DENG Jie, WANG Shuai, CHEN Gong-Wen, HU Fu-Liang, ZHENG Huo-Qing* (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The overwintering period is the most important stage of colony loss. To explore the factors associated with the health of honey bee colonies during overwintering, we investigated the viral infections and *Varroa destructor* infestations before breeding overwintering bees, overwintering performance and viral infections when overwintering of 45 *Apis mellifera ligustica* colonies in an apiary. The results showed that the infestation rate of *V. destructor* was moderately linearly correlated with genome copy number of Deformed wing virus (DWV) and Israeli acute paralysis virus (IAPV) before breeding overwintering bees ($p_{DWV} = 0.003$, $p_{IAPV} = 0.001$). When below 9%, the infestation rate of *V. destructor* correlated with the infection level of DWV with a higher correlation coefficient; when above 9%, the correlation coefficient of the infestation rate of *V. destructor* and the infection level of IAPV was higher. The infestation rate of *V. destructor* and the genome copy number of IAPV in the colonies died during overwintering period were significantly higher than that in surviving colonies before breeding overwintering bees. These results suggested *V. destructor* and IAPV were the primary factors that affected the winter losses of *A. m. ligustica* colonies. Considering the positive correlation between the infestation rate of *V. destructor* and the infection

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项 (CARS-44)

作者简介: 邓洁, 女, 1995 年生, 四川宜宾人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂病毒学及分子生物学, E-mail: 21817033@zju.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 郑火青, 副教授, 研究方向为蜜蜂病原生物学, E-mail: hqzheng@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-05-29; 接受日期 Accepted: 2021-06-05

level of IAPV, it was suggested that controlling the infestation rate of *V. destructor* at a low level (below 9%) before breeding overwintering bees was critical to reduce the loss of bee colonies during overwintering.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; *Varroa destructor*; honeybee viruses; winter losses

蜜蜂是一种重要的经济昆虫, 不仅能生产蜂产品, 还能通过为植物授粉提高农作物产量和质量及维护生态平衡 (Potts *et al.*, 2016)。然而, 近几十年来, 北美、欧洲、非洲等地的蜂群损失加剧, 对农业授粉和生态系统安全造成严重威胁 (Aston, 2010; Pirk *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015)。

引起蜂群损失的因素包括病原微生物、寄生虫、外界环境、农药、杀螨剂和生产压力等, 其中狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 和蜜蜂病毒被认为是影响蜜蜂健康的两大主要生物因素 (Goulson *et al.*, 2015; Nazzi and Pennacchio, 2018)。狄斯瓦螨是一种蜜蜂体表寄生虫, 除影响蜜蜂发育外, 还能携带、传播蜜蜂病毒, 甚至降低蜜蜂的免疫力, 使蜜蜂体内的病毒有机会大量增殖 (Dainat *et al.*, 2012; Nazzi *et al.*, 2012)。狄斯瓦螨与蜜蜂病毒的这种协同作用对蜂群健康产生系统性影响 (Rosenkranz *et al.*, 2010)。已知感染蜜蜂的病毒达 30 多种 (Remnant *et al.*, 2017; Schoonvaere *et al.*, 2018), 其中最常见包括急性蜜蜂麻痹病毒 (*Acute bee paralysis virus*, ABPV)、黑蜂王台病毒 (*Black queen cell virus*, BQCV)、慢性蜜蜂麻痹病毒 (*Chronic bee paralysis virus*, CBPV)、残翅病毒 (*Deformed wing virus*, DWV)、以色列急性麻痹病毒 (*Israeli acute paralysis virus*, IAPV)、克什米尔蜜蜂病毒 (*Kashmir bee virus*, KBV) 和囊状幼虫病毒 (*Sacbrood virus*, SBV)。这些常见病毒中, 在我国西方蜜蜂 *Apis mellifera* 群中流行率最高的是 DWV 和 BQCV (Li *et al.*, 2012; 丁桂玲和石巍, 2015)。

越冬期是西方蜜蜂蜂群最易出现损失的阶段 (Desai *et al.*, 2012)。例如, 2013–2014 年, 美国西方蜜蜂蜂群在越冬期的损失占全年蜂群损失的 87.7% (Lee *et al.*, 2015)。Genersch 等 (2010) 对德国蜂群损失现象进行了 5 年的跟踪调查, 发现狄斯瓦螨在冬季蜂群损失中起到了关键作用。Dainat 等 (2012) 的研究证明, 在蜜蜂的主要病虫害中, 狄斯瓦螨和蜜蜂病毒 (主要为 DWV) 是冬季蜂群死亡的两个最主要的预测指标。

Liu 等 (2016) 在 2010–2013 年对我国 12 个省份的越冬蜂进行调查, 发现我国越冬期蜂群的年平均损失约为 77 万群, 约占我国饲养蜂群总数的 10.1%。近年来, 西方蜜蜂 (主要为意大利蜜蜂, 简称意蜂) 在我国江浙一带也出现了大量损失的现象 (郑火青等, 2016; 华启云等, 2016), 初步调查表明狄斯瓦螨、蜜蜂病毒、微孢子虫等是导致这些损失的主要原因 (郑火青等, 2016)。陈功文等 (2018) 研究了浙江省 3 个意蜂蜂场的蜂群越冬前与越冬后的病毒感染情况, 认为 IAPV 是影响越冬期意蜂健康的最主要病毒。

为进一步探析影响越冬期意蜂健康的因素及其相互关系, 本文研究了蜂螨寄生率差异较大的 45 个意蜂群的常见病毒感染情况、狄斯瓦螨寄生率以及蜂群越冬表现, 以期减少越冬期蜜蜂死亡提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 蜂群准备和样品采集

1.1.1 供试蜂群准备

2018 年 8 月, 在位于浙江绍兴的实验蜂场准备 45 个群势基本一致 (10~12 框蜂) 的意蜂群。实验前, 所有蜂群采取同样的生产管理措施, 并及时防治蜂螨。8 月后, 所有蜂群都不治螨, 直至 12 月中旬。浙江意蜂越冬期一般在 11 月中旬至 12 月下旬之间, 10 月中旬开始繁殖越冬蜂。本试验中, 在 10 月初蜂群蜂螨寄生率已普遍达到较高水平, 且从 11 月开始蜂群逐渐出现死亡, 于 10 月初采集繁殖越冬蜂前的蜜蜂样本共 45 份, 12 月中旬采集越冬期存活的蜜蜂样本共 28 份。

1.1.2 样品采集

每个蜂群随机采集约 100 头成年工蜂, 其中 30 头用于常见病毒检测, 30 头用于微孢子虫感染情况鉴定。为检测各个蜂群的蜂螨寄生率, 10 月初取样时, 在每个蜂群随机分散性地割取 3 块封盖子脾 (每块巢脾不少于 100 个封盖巢房)。因越冬期蜂群无封盖子, 本实验未测定越冬期蜂群巢房内蜂螨寄生率。

1.2 微孢子虫孢子计数

将 30 头蜜蜂低温麻醉处理, 解剖中肠, 收集于研钵中, 加 30 mL 蒸馏水, 充分研磨并混匀制得研磨液, 稀释至适宜浓度, 取 10 μ L 研磨液于血球计数板上, 于显微镜 10 \times 40 倍视野下观察计数。计数选择计数板大格中四角的 4 个中格以及中心的 1 个中格共计 80 个小格进行计数, 计数总数为 N 。每头蜜蜂中微孢子虫孢子数计算公式为:

$$\frac{N}{80} \times 400 \times 10 \times \text{单头蜜蜂组织液量 (1 000 } \mu\text{L)} \times \text{稀释倍数。}$$

1.3 狄斯瓦螨寄生率检测

逐一打开封盖巢房, 仔细检查是否有狄斯瓦螨寄生。狄斯瓦螨寄生率为有瓦螨的巢房数占检查的巢房总数的比例。

1.4 RNA 提取

取 30 头蜜蜂, 在研钵内加液氮后将其研磨至粉末, 取粉末 170 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL RL 裂解液, 充分震荡后室温放置 15 min, 参照 RNeasy 超纯总 RNA 快速提取试剂盒 (TaKaRa, 日本) 的操作说明提取总 RNA, 用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定所提 RNA 的浓度。

1.5 反转录反应

采用 FSQ-201 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日

本)。于 200 μ L 离心管中加入 800 ng RNA, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后置于冰上快速冷却, 在离心管中加入 4 μ L 5 \times RT Master Mix; 再用 RNase free water 补足体积至 20 μ L。离心管震荡离心后进行反转录, 反转录条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 50 $^{\circ}$ C 5 min, 98 $^{\circ}$ C 5 min, 然后置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.6 常见蜜蜂病毒定量检测

采用 qRT-PCR 定量检测 ABPV、BQCV、CBPV、DWV、IAPV 和 SBV 等 6 种常见蜜蜂病毒。配制 10 μ L qPCR 反应体系, 其中 cDNA 模板 1 μ L, 上游和下游引物各 0.5 μ L (引物序列见表 1), TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 5 μ L 以及 3 μ L 的 RNase free water, 以 H₂O 替代 cDNA 为空白对照。荧光定量 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 40 个循环反应: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min; 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s。

参照温政胜 (2019) 的方法对 BQCV、DWV、IAPV 等 3 种病毒基因组拷贝数进行绝对定量。将质粒标准品以 10 倍浓度梯度依次稀释 6 个不同的浓度, 以不同浓度的质粒溶液为模板进行荧光定量 PCR, 并建立各病毒定量的标准曲线, 通过标准曲线和每个样本对应的 CT 值计算目标病毒的基因组拷贝数。

表 1 定量检测 ABPV、BQCV、CBPV、DWV、IAPV 和 SBV 的引物序列

Table 1 Primer sets used for quantitative detection of ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV and SBV

引物 Primers	靶病毒 Target virus	序列 Sequence (5'-3')	参考文献 References
qABPV-F qABPV-R	急性蜜蜂麻痹病毒 <i>Acute bee paralysis virus</i>	GAAACGGCTACCACATCTAAGGA TGACATAGGGAGGTAGTGACAAGAAA	Sachman-Ruiz <i>et al.</i> , 2015
qBQCV-F qBQCV-R	黑蜂王台病毒 <i>Black queen cell virus</i>	GGAGTCGCAGAGTTCCAAAT GTGGGAGGTGAAGTGGCTAT	温政胜, 2019
qCBPV-F qCBPV-R	慢性蜜蜂麻痹病毒 <i>Chronic bee paralysis virus</i>	GGCACCTCAAGATCGTCCAAGTTAC ACGGAGATGGTGACCTGGTATGG	温政胜, 2019
qDWV-F qDWV-R	残翅病毒 <i>Deformed wing virus</i>	CGTGGTGTAGTAAGCGTCGT TCATCCGTAGAAAGCCGAGT	蔺哲广, 2017
qIAPV-F qIAPV-R	以色列急性麻痹病毒 <i>Israeli acute paralysis virus</i>	TCGCTGAAGGCATGTATTTTC ATTACCACTGCTCCGACACA	蔺哲广, 2017
qSBV-F qSBV-R	囊状幼虫病毒 <i>Sacbrood virus</i>	AACGTCCACTACACCGAAATGTC ACACTGCGCGTCTAACATTCC	Blanchard, <i>et al.</i> , 2014

1.7 统计分析

病毒基因组拷贝数与狄斯瓦螨寄生率间的相关性采用线性回归 (linear regression) 方法进行分析, 其它参数的显著性分析采用单因素方差 (one-way ANOVA) 进行分析。所有的统计分析均在 SPSS 21.0 (IBM, 美国) 中进行。

2 结果与分析

2.1 蜂群病原感染情况和越冬表现

本实验中的蜂群受微孢子虫感染程度很轻。在所有的样本中, 仅在繁殖越冬蜂前的 3 个蜂群样本中检测到微孢子虫, 且孢子数均低于 5×10^4 个/蜜蜂, 因此未将蜂群微孢子虫感染情况纳入后续分析。经过两个月的不治螨管理, 86.67% 蜂群检测到蜂螨寄生, 且不同蜂群封盖巢房的瓦螨寄生率差异较大 (0~39.9%)。

在繁殖越冬蜂前, 蜂群中仅检测出了 DWV 和 IAPV, 感染率分别为 100% 和 97.78%, 未检测到 ABPV、BQCV、CBPV 和 SBV。在越冬期, 除了

DWV 和 IAPV, 还检测到了 BQCV, DWV 和 IAPV 的蜂群感染率均达到了 100%, BQCV 的感染率为 88.89%。在两个取样时间点之间, 共有 17 群蜜蜂死亡。

2.2 繁殖越冬蜂前蜂群狄斯瓦螨寄生率和病毒基因组拷贝数相关性分析

通过对繁殖越冬蜂前蜂群狄斯瓦螨寄生率和病毒基因组拷贝数的相关性进行分析, 发现瓦螨寄生率与蜂群 DWV 和 IAPV 病毒基因组拷贝数间存在显著正相关关系 (DWV: $R^2 = 0.435$, $p = 0.003$; IAPV: $R^2 = 0.499$, $p = 0.001$; 图 1-a)。尝试在不同的瓦螨寄生率范围内分析瓦螨寄生率和病毒量的相关性, 发现瓦螨感染率低于 9% 的蜂群 DWV 基因组拷贝数与瓦螨感染率间显示出更高的相关性 ($R^2 = 0.524$, $p = 0.002$, 图 1-b), IAPV 基因组拷贝数与瓦螨感染率间的相关系数则明显更低 ($R^2 = 0.241$, $p = 0.183$)。而瓦螨感染率超过 9% 的蜂群 IAPV 基因组拷贝数与瓦螨感染率相关性更高 (DWV: $R^2 = 0.072$, $p = 0.816$; IAPV: $R^2 = 0.626$, $p = 0.029$, 图 1-c)。

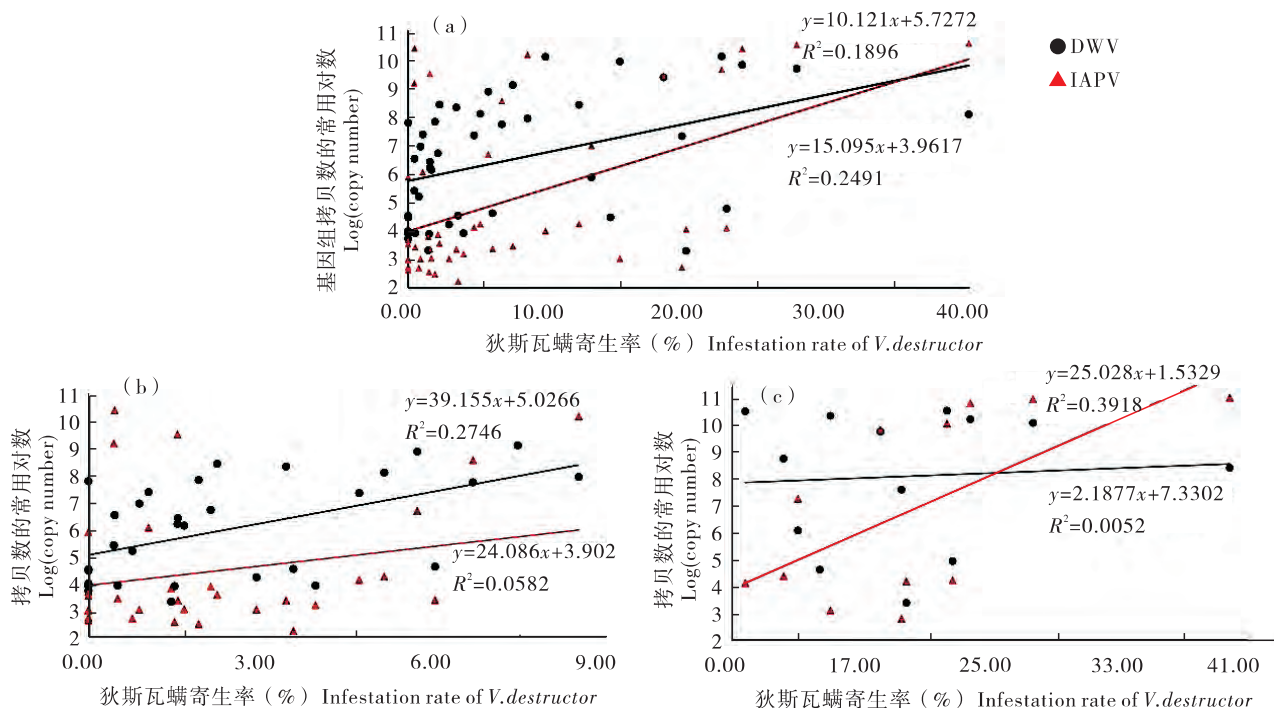


图 1 不同狄斯瓦螨寄生率与 DWV 和 IAPV 基因组拷贝数的关系

Fig. 1 The correlation between infestation rate of *Varroa destructor* and genomic copies of DWV and IAPV

注: (a), 所有蜂群狄斯瓦螨寄生率与 DWV 和 IAPV 基因组拷贝数的相关性; (b), 狄斯瓦螨寄生率小于 9% 时与 DWV 和 IAPV 基因组拷贝数的相关性; (c), 狄斯瓦螨寄生率大于 9% 时与 DWV 和 IAPV 基因组拷贝数的相关性。
Note: (a), Correlation between infestation rate of *V. destructor* and genomic copies of DWV and IAPV of all colonies; (b), Correlation between infestation rate of *V. destructor* (<9%) and genomic copies of DWV and IAPV; (c), Correlation between infestation rate of *V. destructor* (>9%) and genomic copies of DWV and IAPV.

2.3 死亡蜂群和存活蜂群在繁殖越冬蜂前的蜂螨寄生率和病毒感染情况比较

死亡的 17 个蜂群在 10 月初取样时蜂螨寄生率达到了 $12.83\% \pm 2.25\%$ ，显著高于存活的蜂群同期取样时的蜂螨寄生率 ($4.48\% \pm 1.47\%$; χ^2 检

验, $\chi^2 = 0.269$, $p = 0.034$, 图 2-a); 且前者的平均 IAPV 基因组拷贝数也显著高于后者 (one-way ANOVA, $p = 0.033$; 图 2-b), 但两者在 DWV 基因组拷贝数上无显著差异 (one-way ANOVA, $p = 0.114$; 图 2-b)。

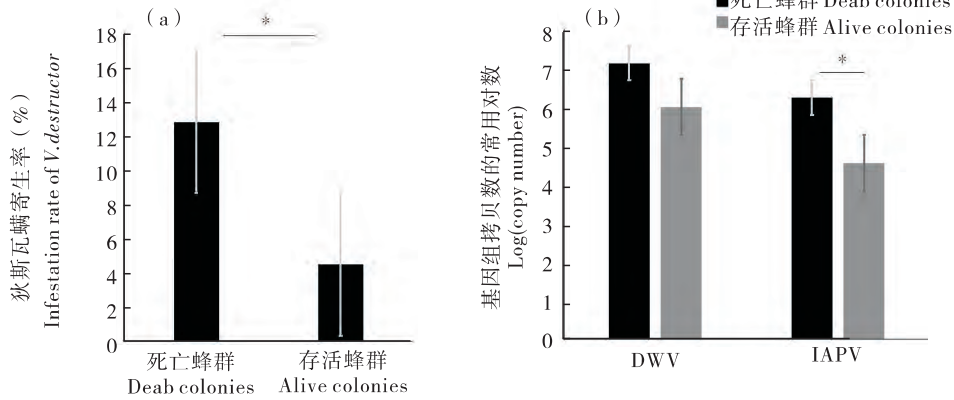


图 2 死亡蜂群与存活蜂群的比较

Fig. 2 Comparison between dead and alive colonies

注: (a), 狄斯瓦螨寄生率比较; (b), DWV 及 IAPV 病毒基因组拷贝数比较。“*”表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Note: (a), Infestation rate of *V. destructor*; (b), Viral genome copies of DWV and IAPV. “*” represented significant difference while $P < 0.05$.

2.4 存活蜂群在繁殖越冬蜂前和越冬期病毒基因组拷贝数比较

通过对存活蜂群在繁殖越冬蜂前与越冬期的病毒基因组拷贝数的分析, 发现存活蜂群在两个时间点之间的 DWV、IAPV 平均病毒基因组拷贝数均无显著差异 (one-way ANOVA, $p_{DWV} = 0.242$; $p_{IAPV} = 0.818$; 图 3)。存活蜂群在繁殖越冬蜂前未检测到 BQCV, 在越冬期 BQCV 病毒基因组拷贝数也很低。

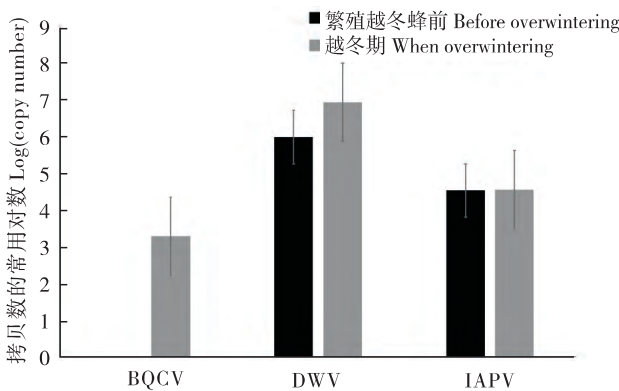


图 3 存活蜂群繁殖越冬蜂前与越冬期病毒基因组拷贝数比较
Fig. 3 Comparison on viral genome copies of surviving colonies between before overwintering and during overwintering period

3 结论与讨论

为使蜂群蜂螨寄生率达到较高水平, 本研究在实验期间停止治螨。在 10 月初时, 蜂群间蜂螨寄生率已存在较大差异, 部分蜂群蜂螨寄生率达到很高的水平, 这可能和不同蜂群的抗螨能力差异或实验前不同蜂群蜂螨寄生率存在差异有关。这种差异化的蜂螨寄生率和越冬表现也为本研究的开展创造了条件。

微孢子虫是影响蜜蜂健康的重要因素 (许瑛瑛等, 2018)。Botias 等 (2013) 研究发现微孢子虫感染与蜜蜂的寿命缩短及冬季死亡率增加有关。但在本研究中, 蜂群微孢子虫感染率很低, 可以排除在本实验中微孢子对蜂群越冬期健康的显著影响。通过对实验蜂群进行几种常见蜜蜂病毒的检测, 本研究发现其主要感染 DWV、IAPV 和 BQCV 等 3 种病毒, 这与此前陈功文等 (2018) 的研究结果相似。BQCV 在繁殖越冬蜂前的蜂群中并未检测出, 在越冬期的蜂群中检出率达到 88.89%, 这可能和实验期间蜂群健康水平持续下降致使蜂群携带的病毒出现增殖有关。但即使在越冬期, BQCV 病毒基因组拷贝数也处于较低水

平。因此,可以认为 BQCV 也不是影响越冬期蜜蜂健康的主要因素。

在本实验过程中,共有 17 个蜂群死亡,其中死亡蜂群的蜂螨寄生率和 IAPV 病毒量在繁殖越冬蜂前都显著高于存活蜂群,说明蜂螨寄生率和 IAPV 病毒量是意蜂群越冬期健康的重要影响因素,进一步验证了陈功文等(2018)中“ IAPV 是影响意蜂越冬期健康的最主要病毒”的结论。

狄斯瓦螨对意蜂蜂群健康产生系统性影响。众多研究都表明狄斯瓦螨寄生率是影响西方蜜蜂蜂群越冬期健康的重要因素(秦瑶等,2018)。例如, Guzman-Novoa 等(2010)的调查表明加拿大安大略省超过 85% 的冬季死亡蜂群与秋季瓦螨感染相关; Genersch 等(2010)对德国蜜蜂越冬期寿命降低原因的调查发现, DWV 和瓦螨的共同作用缩短了冬季蜜蜂的寿命。本研究结果也清晰地表明蜂群繁殖越冬蜂前的狄斯瓦螨寄生率是影响越冬期蜂群健康的最重要因素。

狄斯瓦螨和多种蜜蜂病毒存在直接或间接的协同作用,瓦螨感染率高的蜂群会增加 DWV 和 IAPV 传播的机会,并增加蜜蜂被病毒侵染的可能性(Cox-Foster *et al.*, 2007; Schroeder and Martin, 2012)。同时,瓦螨也能被 DWV、BQCV 等蜜蜂病毒侵染(Wang *et al.*, 2019)。瓦螨迁移时,也会加速病毒的传播。Kielmanowicz 等(2015)的研究表明,当狄斯瓦螨寄生率小于 3% 时, DWV 感染程度与蜂群瓦螨寄生率呈正相关,而当瓦螨寄生率大于 3% 时, DWV 和 IAPV 两种病毒的基因组拷贝数与瓦螨寄生率都有显著的线性关系。在西班牙南部,通过对蜂群内 4 种蜜蜂病毒(DWV、BQCV、SBV 和 IAPV)的感染与狄斯瓦螨的寄生情况进行调查,发现狄斯瓦螨和 DWV 是影响蜂群健康的主要因素(Barroso-Arevalo *et al.*, 2019)。本实验中, DWV、IAPV 感染程度和瓦螨寄生水平之间也呈线性正相关(图 1)。随着狄斯瓦螨的寄生率上升, DWV 和 IAPV 病毒量也呈上升趋势,但两种病毒的增长趋势存在差异。当瓦螨寄生率较小时(小于 9%), DWV 病毒量与瓦螨寄生率的相关性较高;而当瓦螨寄生率较高时(大于 9%), IAPV 病毒量与瓦螨寄生率的相关性更高。与 IAPV 相比, DWV 在不同瓦螨感染率的蜂群中病毒拷贝数差异不显著,可能是因为 DWV 的致病力相对于急性病毒 IAPV 较弱(Schroeder and Martin, 2012), IAPV 对高瓦螨感染蜂群的致病效果更为显著。

本研究表明,狄斯瓦螨和 IAPV 病毒的协同作

用是影响意蜂蜂群越冬表现的综合因素。结合这两项指标自身存在的紧密正相关性,养蜂生产中,在繁殖越冬蜂前将狄斯瓦螨寄生率控制在较低水平(9% 以下),是减少越冬期蜜蜂死亡的重要措施。

参考文献 (References)

- Aston D. Honey bee winter loss survey for England, 2007 - 8 [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2010, 49 (1): 111 - 112.
- Blanchard P, Guillot S, Antunez K, *et al.* Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan[®] assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 197 (1): 7 - 13.
- Botias C, Martinhernandez R, Barrios L, *et al.* *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44 (1): 25.
- Chen GW, Wen ZS, Qin Y, *et al.* Virus species affecting the health of overwintering honey bee (*Apis mellifera ligustica*) colonies [J]. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2018, 44 (2): 223 - 229. [陈功文, 温政胜, 秦瑶, 等. 影响越冬期意大利蜜蜂健康的病毒种类研究 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2018, 44 (2): 223 - 229]
- Cox-Foster D, Conlan S, Holmes EC, *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder [J]. *Science*, 2007, 318 (5848): 283 - 287.
- Dainat B, Evans JD, Chen Y, *et al.* Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (4): 981 - 987.
- Desai SD, Eu YJ, Whyard S, *et al.* Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion [J]. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21 (4): 446 - 455.
- Ding GL, Shi W. Investigation of seven viruses in *Apis cerana* and *Apis mellifera* of China [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46 (10): 1822 - 1828. [丁桂玲, 石巍. 我国东、西方蜜蜂中七种病毒感染状况的调查 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46 (10): 1822 - 1828]
- Genersch E, Der Ohe WV, Kaatz H, *et al.* The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies [J]. *Apidologie*, 2010, 41 (3): 332 - 352.
- Goulson D, Nicholls E, Botias C, *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers [J]. *Science*, 2015, 347 (6229): 1435.
- Guzman-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, *et al.* *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada [J]. *Apidologie*, 2010, 41 (4): 443 - 450.
- Hua QY, Su XL, Zhao DX, *et al.* Analysis and countermeasures of the

- death of overwintering honeybees in Jinhua, Zhejiang [J]. *Apiculture of China*, 2016, 67 (6): 23–24. [华启云, 苏晓玲, 赵东绪, 等. 浙江金华地区越冬意蜂群大量死亡原因分析与应对措施 [J]. 中国蜂业, 2016, 67 (6): 23–24]
- Kielmanowicz MG, Inberg A, Lerner IM, et al. Prospective large-scale field study generates predictive model identifying major contributors to colony losses [J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11 (4): e1004816.
- Lee K, Steinhauer N, Rennich K, et al. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA [J]. *Apidologie*, 2015, 46 (3): 292–305.
- Li J, Qin H, Wu J, et al. The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (11): e47955.
- Lin ZG. Comparison Between *Apis Cerana* and *Apis mellifera* in the Host-parasite Interactions with *Varroa destructor* [D]. Hangzhou: Zhejiang University Master Thesis, 2017. [蔺哲广. 东方蜜蜂和西方蜜蜂与狄斯瓦螨间寄主-寄生虫互作关系的对比研究 [D]. 杭州: 浙江大学硕士论文, 2017]
- Liu Z, Chen C, Niu Q, et al. Survey results of honey bee (*Apis mellifera*) colony losses in China (2010–2013) [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2016, 55 (1): 29–37.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, et al. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8 (6): e1002735.
- Nazzi F, Pennacchio F. Honey bee antiviral immune barriers as affected by multiple stress factors: A novel paradigm to interpret colony health decline and collapse [J]. *Viruses*, 2018, 10 (4): 159.
- Pirk CW, Human H, Crewe RM, et al. A survey of managed honey bee colony losses in the republic of South Africa – 2009 to 2011 [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2014, 53 (1): 35–42.
- Potts SG, Imperatrizfonseca VL, Ngo HT, et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being [J]. *Nature*, 2016, 540 (7632): 220–229.
- Qin Y, Lin ZG, Hu FL, et al. The parasite-host relationship between *Varroa destructor* and honeybees [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (4): 825–833. [秦瑶, 蔺哲广, 胡福良, 等. 狄斯瓦螨与蜜蜂的寄生关系 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (4): 825–833]
- Remnant EJ, Shi M, Buchmann G, et al. A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91 (16): e00158–17.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, et al. Biology and control of *Varroa destructor* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103 (1): 96–119.
- Sachmanruiz B, Narvaezpadilla V, Reynaud E, et al. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México [J]. *Biological Invasions*, 2015, 17 (7): 2043–2053.
- Schoonvaere K, Smagghe G, Francis F, et al. Study of the metatranscriptome of eight social and solitary wild bee species reveals novel viruses and bee parasites [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 177.
- Schroeder DC, Martin SJ. Deformed wing virus: The main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide [J]. *Virulence*, 2012, 3 (7): 589–591.
- Wang S, Chen G, Lin Z, et al. Occurrence of multiple honeybee viruses in the ectoparasitic mites *Varroa* spp. in *Apis cerana* colonies [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 166: 107225.
- Wen ZS. Comparison of the Infection of Five Bee Viruses Between *Apis cerana* and *Apis mellifera* [D]. Hangzhou: Zhejiang University Master Thesis, 2019. [温政胜. 东方蜜蜂和西方蜜蜂 5 种蜜蜂病毒流行情况的比较 [D]. 杭州: 浙江大学硕士论文, 2019]
- Xu YY, Wang S, Zhang YY, et al. The two microsporidian species infecting honeybees: *Nosema apis* and *Nosema ceranae* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2018, 55 (4): 549–556. [许瑛瑛, 王帅, 张迎迎, 卢媛媛, 胡福良, 郑火青. 感染蜜蜂的两种微孢子虫——*Nosema apis* 和 *Nosema ceranae* [J]. 应用昆虫学报, 2018, 55 (4): 549–556]
- Zheng HQ, Su XL, Ji T, et al. Healthy breeding of honeybee from the death of honeybee in overwintering period [J]. *Journal of Bee*, 2016, 36 (4): 12–15. [郑火青, 苏晓玲, 吉挺, 等. 从越冬期蜜蜂死亡谈蜜蜂健康养殖 [J]. 蜜蜂杂志, 2016, 36 (4): 12–15]