

蜜蜂病毒学研究进展*

张 炫^{1,2**} 陈彦平^{2***} 和绍禹^{3****}

(1. 云南农业大学植物保护学院 昆明 650201; 2. 美国农业部科技服务处 贝尔茨维尔蜜蜂
研究实验室 美国 20705; 3. 云南农业大学东方蜜蜂研究所 昆明 650201)

摘 要 蜜蜂是自然界最重要的授粉昆虫,对维护自然生态系统的生物多样性和保持农业生态系统的增产效应发挥着巨大的作用。作为世界第一养蜂大国,中国养蜂业健康发展的意义不仅在于获取大量高品质的蜂产品,更重要的是发挥蜜蜂授粉的农业增产效应,保证我国的粮食安全。和其他动物一样,蜜蜂健康也受到多种病害的威胁,近年来蜜蜂病毒病在世界范围内的广泛流行与传播,是导致世界蜂群持续下降的一个重要原因。蜜蜂病毒长期广泛的以无明显发病症状的低浓度隐性感染方式存在于蜜蜂蜂群中,但多数蜜蜂病毒在特定环境条件下可被激活,在寄主体细胞内快速复制,表现出强烈的致病性,引发致死性蜜蜂病毒病的流行与爆发。蜜蜂病毒病知识的缺乏,以及复杂的蜜蜂病毒鉴定技术使得蜜蜂病毒病难以及时确诊和防治,因此每年在养蜂生产上造成的巨大损失已严重阻碍了我国养蜂业的健康发展。本文将综述这一领域的研究成果和学科发展趋势,为在我国开展蜜蜂病毒学研究提供参考,并介绍国外的一些蜜蜂病毒病诊断方法与防治经验服务于我国养蜂生产实践。

关键词 蜜蜂病毒, 基因特征, 传播途径, 寄主范围, 诊断, 防治

A review of bee virology progress

ZHANG Xuan^{1, 2**} CHEN Yan-Ping^{2***} HE Shao-Yu^{3****}

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Bee Research Laboratory, USDA - ARS, Beltsville, Maryland 20705, America;
3. Eastern Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract Honey bees play a vital role in global food production and sustainable ecological systems. However, honey bee colony losses of 20%—30% per year in recent years have been devastating to the agricultural industry and the associated ecosystems that rely on honey bees for pollination. Among the biotic and abiotic factors that are suspected to be responsible for honey bee deaths, viruses are frequently implicated in colony losses. This is especially the case when the colonies are infested with the parasitic mite *Varroa destructor*, the most serious pest of honey bees globally. Viruses have also been linked to honey bee Colony Collapse Disorder (CCD), a mysterious malady that wiped out 50% to 90% of managed bee colonies in the U. S. during the winter of 2006—2007. It has therefore become urgent to elucidate the disease mechanisms of bee viruses and to develop strategies to control viral pathogenesis and disease spread in honey bees. This paper summarizes the current efforts and recent advances in honey bee virus research regarding transmission, epidemiology, replication and pathogenesis of viral infection. Future research and development directions leading to the prevention, detection, diagnosis, and treatment of diseases caused by viruses are also discussed in detail. The information included in this chapter can be used by scientists and apiary inspectors to monitor honey bee colonies for viruses to prevent the spread of disease.

Key words bee virus, genome organization and function, transmission routes, host range, diagnose, prevention and treatment

* 资助项目:美国农业部 CAP 基金(2009-85118-05718)、现代农业(蜜蜂)产业技术体系建设专项基金(CARS-45-ksj14)。

**E-mail: zhang.xuan.yn@gmail.com

***E-mail: judy.chen@ars.usda.gov

****通讯作者, E-mail: kmhsy@163.com

收稿日期:2012-04-12,接受日期:2012-08-31

授粉昆虫是自然生态系统和农业生态系统中的一个关键因子,昆虫授粉行为对于维护陆生植物群落生物多样性 (Ashman *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2006) 和发展农业种植生产都是必不可少的一个环节 (Klein *et al.*, 2007; Ricketts *et al.*, 2008)。作为自然界最重要的授粉昆虫,蜜蜂在长期的适应性进化中发展了区别于其他昆虫的授粉特性,如外部形态的特化以适应其采集授粉活动(被覆绒毛,后足胫节特化形成的花粉筐),以花粉和花蜜为食的专一食性。社会性群居的生物学特性(西方蜜蜂平均 40 000 只/群和东方蜜蜂平均 10 000 只/群)利于在极短的植物花期内为有花植物进行高效饱和的授粉服务(4.5 km 的采集半径,6 360 hm² 的授粉范围)。同时驯化了的蜜蜂可以远距离运输以满足现代农业授粉服务的需求。但是蜜蜂和其他动物一样都易受到环境变化的影响,如原始栖息地的破碎和丧失,以及气候环境的改变。由此引起的授粉昆虫减少,授粉活动缺失而带来的一系列后果已引起世界各国研究者的广泛关注,近 50 年来,授粉昆虫的持续减少已对有花植物的生物多样性和人类的食物安全造成威胁 (Ghazoul, 2005)。

授粉昆虫对自然生态系统中有花植物的贡献远超出目前所掌握的数据,对维护地球陆生生态系统有着重要的作用。全球 35% 的食物直接来源于昆虫授粉作物 (Klein *et al.*, 2007),2005 年全球农产品昆虫授粉增产价值估计为 1 530 亿欧元 (Gallai *et al.*, 2009)。西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 是一种可人工饲养的,全球保有量最大的授粉昆虫,与其他种类的授粉昆虫相比,对 96% 的虫媒植物的产量都有增产效果 (Klein *et al.*, 2007)。但是有确切的数据显示,全球范围内蜜蜂种群数量正在不断下降。北美地区 1947 至 2005 年,近 60 年间减少了 59% (NAS, 2006; vanEngelsdorp *et al.*, 2010);欧洲 1985 至 2005 年,20 年间下降了 25% (Potts *et al.*, 2009)。由此带来的对农业生产和自然生态平衡的负面影响令人担忧。近 10 年间欧美养蜂业的负增长,已引发农业授粉危机。同时瓦螨 *Varroa destructor* 危害已导致欧洲野生蜜蜂消亡,仅剩下人工饲养蜂群 (Kraus and Page, 1995; Moritz *et al.*, 2007; Jaffe *et al.*, 2010)。基于目前授粉水平估算,由于授粉蜂群损失造成的授粉不足,将直接导致减少 12% 的水果产量和 6%

的蔬菜产量 (Aizen *et al.*, 2008),同时大部分依赖昆虫授粉的农产品质量会有不同程度的下降 (20% ~ 90%) (Klein *et al.*, 2007)。因蜂群数量减少而导致授粉不足造成的食物损失量,需要发达国家和发展中国家各增加约 15% 和 45% 的种植面积来弥补 (Aizen *et al.*, 2008)。

我国有着丰富的蜜蜂蜂种多样性,除引种进入的西方蜜蜂外,还分布有 5 种本土蜂种,其中 200 万群东方蜜蜂 *Apis cerena* 和 600 万群的西方蜜蜂饲养量均居世界首位 (刁青云等, 2008)。我国的养蜂生产在收获高价值蜂产品的同时,蜜蜂的授粉行为还创造了巨大的农产品增收效益和无法估量的生态效益。但是我国也是蜜蜂疾病流行与爆发最为严重的地区之一,每年因疾病流行损失大量饲养蜂群,疾病的广泛传播也是导致我国蜜蜂生物多样性快速下降的一个主要因素 (Zhang *et al.*, 2012)。另一方面,我国蜜蜂疾病学的研究工作长期以来远滞后于养蜂业的高速发展,特别是一些热点领域,如蜜蜂病毒病学的研究仍处于空白状态,亟待展开相关学科的研究。近期已有我国蜜蜂病毒病调查研究的初步报道 (Ai *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012)。蜜蜂病理学知识的匮乏,蜜蜂疾病防治手段的缺失,加之频繁的蜂群非正常死亡,引起的药物滥用是目前制约我国养蜂业进一步发展的主要原因。这些问题如不得到改善,一旦疾病在全国范围流行,将直接导致我国蜂产业崩溃,进而威胁到我国的粮食安全问题。为此了解国外相关领域研究成果,追踪学科发展趋势将为开展本土蜜蜂病害研究,加快解决养蜂业长期留存问题和蜜蜂资源保护提供科学依据和参考经验。

同其他家养动物一样,蜜蜂也受到细菌、真菌、病毒、寄生虫等多种病害的侵袭,加之全球化的蜜蜂和蜂产品贸易,导致不同地区的蜜蜂病敌害迅速在全球扩散,严重威胁蜜蜂健康。特别是近 10 年来,世界授粉昆虫及蜜蜂种群数量的快速下降,由此引发世界范围内的授粉危机,已对人类的粮食安全造成负面影响 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009)。在蜜蜂的多种病害中,蜜蜂病毒病是最为特殊的一种。在 2006 年北美及欧洲蜜蜂蜂群崩溃症 (Colony Collapse Disorder, 简称 CCD) 爆发前,蜜蜂病毒病一直未引起人们的重视,随着研究的深入,蜜蜂病

毒病的危害才被逐渐了解。

蜜蜂病毒侵袭蜂群不同级型蜜蜂(蜂王、雄蜂和工蜂)和不同发育阶段的蜜蜂个体(卵、幼虫、蛹和成虫),可在蜂巢、蜜蜂食物中(蜂蜜、花粉、蜂王浆)和蜂群寄生虫(瓦螨、小蜂螨和蜂巢小甲虫等)样本中检出(Sammataro *et al.*, 2000; Boecking and Genersch, 2008; Dainat *et al.*, 2009; Eyer *et al.*, 2009)。少数蜜蜂病毒会在蜜蜂个体水平上表现发病症状,如蜜蜂囊状幼虫病和蜜蜂卷翅病。多数时候,蜜蜂病毒以一种隐性感染方式长期存在于蜂群中,不表现特异性病症(Hails *et al.*, 2008)。但在特定的生物和非生物压力(如低温高湿的不良环境、长时间的幽闭、食物短缺、病敌害侵袭等)条件刺激下,蜜蜂病毒可被激活,快速复制,表现极强的致病性,导致寄主快速死亡(Genersch *et al.*, 2010)。

多种常见的蜜蜂病毒,如蜜蜂急性麻痹病毒(acute bee paralysis virus, 简称 ABPV) (Govan *et al.*, 2000)、蜜蜂黑蜂王台病毒(black queen cell virus, 简称 BQCV) (Leat *et al.*, 2000)、蜜蜂慢性麻痹病毒(chronic bee paralysis virus, 简称 CBPV) [GenBank accession number: AF461061]、蜜蜂卷翅病毒(deformed wing virus, 简称 DWV) (Lanzi *et al.*, 2006)、蜜蜂克什米尔病毒(Kashmir bee virus, 简称 KBV) (de Miranda *et al.*, 2004)和蜜蜂囊状幼虫病病毒(SBV) (Ghosh *et al.*, 1999)的全基因组序列已在 GenBank 上公布。与其他昆虫病毒相比,蜜蜂病毒的研究相对滞后,由于缺乏相关数据,蜜蜂病毒病的流行与传播机制仍未得到完全揭示,目前尚无有效预防和治疗手段。但蜜蜂病毒已被确定为引起 CCD 的一种重要病原体(Cox - Foster *et al.*, 2007; Ratnieke *et al.*, 2010),近年来已成为蜜蜂保护学的一个研究热点。同时,蜜蜂病毒还常与一些常见的蜜蜂寄生虫,瓦螨(*Varroa destructor*)和微孢子虫(*Nosema spp.*)共同侵害蜂群,表现复合症状。蜜蜂病毒在所有饲养西方蜜蜂的国家和地区均有分布(Allen and Ball, 1996; Ribiere *et al.*, 2008),加之蜜蜂寄生螨 *Varroa destructor* 在世界范围的快速扩散(Stout and Morales, 2009),二者协同危害蜜蜂引起的寄生蜂螨综合症(bee parasitic mite syndrome)现已成为导致世界蜂群损失的主要病因(Ongus *et al.*, 2004; Tentcheva *et al.*, 2004; Ribiere *et al.*, 2008)。

本文将从蜜蜂病毒的分类学特征、危害及发病症状、传播途径、与其他致病因子的关系、寄主范围、疾病诊断及防治措施等方面进行阐述。

1 蜜蜂病毒的分类和分子生物学特征

自 1913 年首个蜜蜂病毒—囊状幼虫病病毒(sacbrood bee virus, 简称 SBV) 被报道(White, 1913),至今从蜜蜂个体上已分离鉴定出 20 种蜜蜂病毒(Allen and Ball, 1996; Bromenshenk *et al.*, 2010; de Miranda *et al.*, 2010b)。除了蜜蜂丝状病毒(*Apis mellifera* filamentous virus, 简称 AmFV)和蜜蜂虹彩病毒(*Apis iridescent* virus, 简称 AIV)是 DNA 病毒外,其他均为正义单链 RNA 病毒,具一个无被膜的二十面体蛋白外壳,归属仿小核糖核酸病毒目(picorna-like virus) (图 1)。其中 ABPV、BQCV、KBV 和以色列麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus, 简称 IAPV) 归属于双顺反子病毒科(Dicistroviridae) (Chen *et al.*, 2010b); 而 SBV、DWV 和慢性蜜蜂麻痹病毒(slow bee paralysis virus, 简称 SBPV) (de Miranda *et al.*, 2010b) 则归属于传染性软腐病毒科(Flaviviridae) (Chen *et al.*, 2010a)。除 CBPV 具有特殊的形态特征外,其他的蜜蜂病毒颗粒都难以通过电子显微镜(electron microscope)从形态学上进行区分。但是利用不同种病毒在基因和蛋白构成上的差异,可以对其进行较为准确的诊断。现今已分离鉴定的蜜蜂病毒均有以下基因特征:(1) 一个包裹在蛋白质衣壳内的单链 RNA;(2) RNA 的 5'端以共价键连接一个病毒蛋白(VPg),可产生激活病毒 RNA 复制的引物。(3) RNA 的 5'端有一个非翻译区(Untranslated regions, 缩写为 UTRs),内含一个十字交叉的二级结构;(4) RNA 的 3'端连接一串腺苷酸残基,构成一个由多腺苷酸聚合的长尾结构(Poly A),不同蜜蜂病毒的 Poly A 尾长度不相同;(5) RNA 的 3'端的基因序列在复制时可折叠成一个环(Chen and Siede, 2007)。

1.1 双顺反子病毒科(Dicistroviridae)

双顺反子病毒属病毒基因组为一条正义单链 RNA,可以直接作为模板(mRNA)进行病毒蛋白的翻译。典型的双顺反子 RNA 基因组具 2 个不重叠的开放阅读框(open reading frames, 缩写为

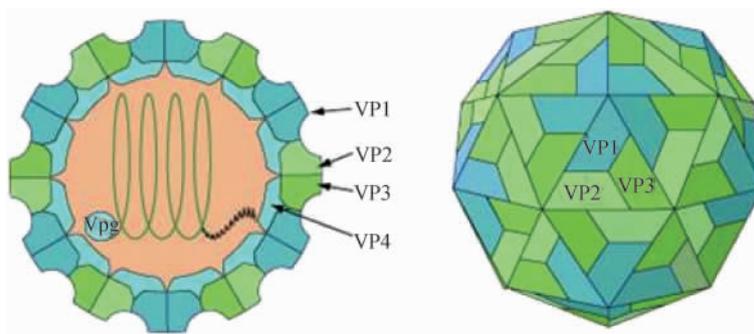


图1 小核糖核酸病毒组成结构图

Fig. 1 Diagram of the picornavirus capsid structure and organization

适用于双顺反子病毒和传染性软腐病毒。

Similar conformations also apply to the Dicistroviridae and Iflaviridae.

© 2011 ViralZone; Swiss Institute of Bioinformatics.

ORFs),且在基因组两侧各有一个 UTRs (图 2: A)。基因组 5'端有一个小基因连接蛋白 (genome-linked virus protein, 缩写为 VPg), 3'端连接一个 Poly A 尾,二者具有维持基因组稳定和防护 RNA 分子降解的功能。2 个 ORFs 之间的非翻译区被称为间隔区 (intergenic region, 缩写为 IGR)。基因组近 5'端和近 3'端的 2 个 ORFs 分别编码合成非结构蛋白 (non-structural protein) 和结构蛋白 (capsid protein) 前体,然后进入位于 5'端 UTRs 区和 IGR 区内的内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry sites, 缩写为 IRES) 进行 RNA 基因组的翻译 (Le Gall *et al.*, 2008)。

1.2 传染性软腐病毒科 (Iflaviridae)

传染性软腐病毒属病毒均为无被膜的二十面体 RNA 病毒,二者除了在基因排列上与双顺反子病毒科 (Dicistroviridae) 不同外,其他生物学特征极为相似。与双顺反子病毒一样,传染性软腐病毒也是由一个大小约 30 nm 无被膜的二十面体蛋白衣壳和衣壳内的一个正义单链 RNA 分子组成。传染性软腐病毒科 (Iflaviridae) 病毒的基因组只有一个包含有复制和翻译代码的开放阅读框,两侧各有一个 UTRs,基因组的 3'端也连有一个 Poly A 尾 (图 2:B)。RNA 分子通过 5'端 UTRs 内的 IRES 先合成一个聚合蛋白单体,随后被水解成为多个具有一定功能的蛋白单元。在编码基因作用下大约一半的功能蛋白单元用以合成病毒的衣壳蛋白,而另一半的水解蛋白单元则参与病毒基因组的复制 (Le Gall *et al.*, 2008)。

1.3 慢性麻痹病毒 (CBPV)

CBPV 的基因序列分析结果显示, CBPV 由两段长度分别为 3 647 个碱基 (RNA1) 和 2 305 碱基 (RNA2) 的 RNA 单链构成,分别编码两段由 3 个 (RNA1) 和 4 个 (RNA2) 相互重叠 ORF (Olivier *et al.*, 2008)。其中 RNA1 上的 ORF3 与病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerases, 以下简称 RdRp) 密切相关,类同于单链 RNA 病毒的 RdRp 基因保守区域,而其他的开放阅读框的功能仍待证实 (Olivier *et al.*, 2008; Ribiere *et al.*, 2010)。但是 RNA1 的 ORF1、ORF3 和 RNA2 上的 ORF1、ORF2、ORF3 可能与病毒蛋白合成有关。此外 CBPV 还是首个被证实有卫星病毒 (chronic bee paralysis satellite virus, 以下简称 CBPSV) 的昆虫病毒,虽然二者在血清学上并无联系,但在缺少 CBPV 时,其卫星病毒无法进行复制 (Ball *et al.*, 1985)。这些由 3 个 1 100 个核苷酸的单链 RNA 片段组成的约 17 nm 的等轴卫星病毒粒子与 CBPV 间的关系目前仍不清楚 (Bailey and Ball, 1991)。由于 CBPV 有着明显区别于颗粒状蜜蜂病毒的形态学和多基因组份特征,目前仍未被归类于其它科属的一个 RNA 病毒。

2 蜜蜂病毒病的危害和发病特征

2.1 蜜蜂囊状幼虫病毒 (SBV)

自 1913 年被分离鉴定以来 (White, 1913), SBV 已成为分布范围最广的蜜蜂病毒,在世界各地的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 蜂群内均可检出 (Allen and Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005;

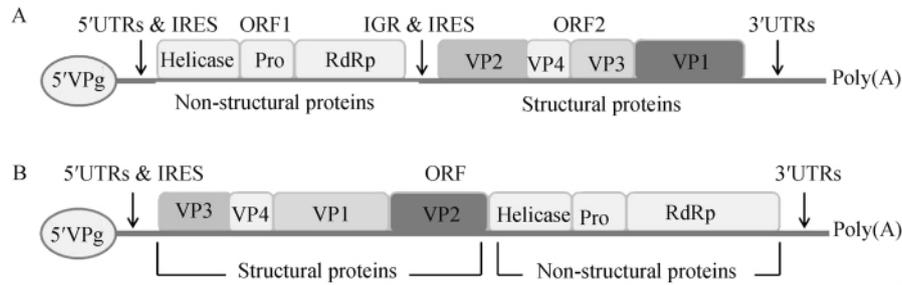


图 2 2 种蜜蜂病毒属的基因组结构与功能示意图

Fig. 2 Gnomonic maps for two virus families known to infect honey bees

A. 双顺反子病毒科基因组示意图。基因组 5'端的 VPg 和 3'端的 Poly(A) 用以维持基因分子稳定,2 个不重叠的 ORF1 和 ORF2 分别编码非结构蛋白和结构蛋白,基因组的翻译在位于 5'UTR 和 IGR 内的 2 个 IRES 内进行;B. 传染性软腐病毒科基因组示意图。基因组唯一的大 ORF 同时包含结构和非结构蛋白的编码信息,基因的翻译受 5'侧 UTRs 内的 IRES 控制。

A. Dicistroviridae genome. The genome is monopartite bicistronic with nonstructural genes at the 5' end and structural genes at the 3' end. The 5'UTR and the untranslated intergenic region (IGR) between the two ORFs can initiate efficient translation as the internal ribosomal entry site (IRES). B. Iflavrividae genome. The genome is monopartite monocistronic genomes with structural genes at the 5' end and nonstructural genes at the 3' end.

Nielsen *et al.*, 2008)。蜜蜂囊状幼虫病毒并不对西方蜜蜂造成可重视的危害,每年仅在少数早春繁殖期的蜂群中发生。但是它的一个寄生于亚洲东方蜜蜂蜂群内的近缘种,则表现为一种致命的传染性疾病,能导致染病的东方蜜蜂蜂群的快速消亡。蜜蜂囊状幼虫病毒可感染蜜蜂幼虫和成蜂,3 日龄前的小幼虫为易感期,因进食带毒哺育蜂分泌的含病毒颗粒的蜂王浆被感染(Ball and Bailey, 1997)。到了封盖期,染病幼虫的最后一次蜕皮被抑制,无法化蛹,蜕皮液存积于老旧表皮内,表皮变硬成一囊袋,颜色变黄。蜕皮液内含有高浓度的病毒颗粒在几天后丧失毒性。干涸的虫体形成一深棕色的船型鳞片,黏附在巢房壁上,难以清除。蜜蜂囊状幼虫病一半多发于早春蜂群繁殖期,可能与这一时期外界食物缺乏有关系。成蜂无明显发病症状,但可能会缩减其寿命(Bailey and Fernando, 1972)。

2.2 慢性麻痹病毒(CBPV)

在 1963 年从麻痹病蜜蜂体内分离鉴定出慢性麻痹病毒(CBPV)之前,蜜蜂麻痹症一直被怀疑是因蜜蜂气管螨 *Acarapis woodi* 的寄生引起的。至今,除了南美洲外,其它各地的西方蜜蜂蜂群可被检出有 CBPV(Allen and Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005)。

CBPV 主要侵袭成年工蜂,被 CBPV 感染的蜂

群可同时出现 2 种典型的麻痹病症,即 I 型麻痹综合症和 II 型麻痹综合症(Bailey and Woods, 1974)。I 型麻痹综合症表现为患病蜜蜂身体和双翅不正常的震颤,失去飞行能力,只能爬行。伴有腹部肿胀、下痢和双翅无法闭合等明显的病症。患病蜜蜂个体出现病症后数日内死亡。严重时使得蜂群崩溃,多发于盛夏高温季节。II 型麻痹综合症又被称为“黑盗蜂”、“黑小蜂”或“脱毛黑蜂症”等。患病蜜蜂个体初期具有飞行能力,身体绒毛逐渐脱落,体色加深变黑。病蜂个体看起来比健康蜜蜂小,并有一个相对突出,有油亮光泽的腹部。可观察到被同群健康蜜蜂攻击的现象,类似盗蜂时的进攻行为。数日后,染病蜜蜂出现失去飞行能力、身体不停颤抖等麻痹症状,之后在短时间内死亡。蜜蜂缓慢性麻痹病毒病全年均可发生,但多在春夏两季流行(Tentcheva *et al.*, 2004)。法国在 2007 至 2009 年期间发生了严重的蜜蜂病害,许多出现麻痹病症的蜂群与染病蜜蜂体内高浓度的 CBPV 有明显的相关性。但在瓦螨样本内未发现 CBPV,证明瓦螨并不会携带和传播 CBPV。

2.3 急性蜜蜂麻痹病毒(ABPV)

ABPV 于 1963 年在一次 CBPV 的传染性试验中被发现(Bailey *et al.*, 1964a)后,世界各地的西方蜜蜂蜂群均有 ABPV 检出的报道(Allen and

Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005)。不同的发育阶段的蜜蜂个体均可检测到 ABPV, 典型症状是染病的成年工蜂表现麻痹症状, 失去飞行能力, 离巢后快速死亡。

蜂群内病毒的传播可能通过被感染成蜂的唾液腺污染幼虫食物。当幼虫摄入过多病毒粒子时, 常在封盖前死亡, 或成功羽化后, 成为隐性感染的带毒蜜蜂 (Bailey and Ball, 1991)。ABPV 已被确认为是一种致使蜂群损失和崩溃的重要病因, 特别是染病蜂群同时被一种病毒传播媒介的蜜蜂寄生螨—瓦螨 (*Varroa destructor*) 侵袭时, 危害更为严重 (Allen *et al.*, 1986; Bakonyi *et al.*, 2002; Tentcheva *et al.*, 2004; Chantawannakul *et al.*, 2006)。

2.4 克什米尔病毒 (KBV)

KBV 于 1977 年在一次传染性试验中从西方蜜蜂体内被分离鉴定, 因病原来源于印度克什米尔地区的患病东方蜜蜂, 所以被用当地地名命名。随后原寄主为亚洲蜂 *Apis cerana* 的 KBV 又在没有亚洲蜂分布的澳洲地区被发现 (Bailey *et al.*, 1979; Ellis and Munn, 2005)。至今 KBV 已被证实广泛分布于世界各地的西方蜜蜂蜂群中。KBV 可以侵染处于不同发育阶段的蜜蜂个体, 以隐性感染方式长期存在于蜜蜂体内。克什米尔病毒无明显发病症状, 一旦少数病毒颗粒进入寄主淋巴液, 可在短时间内大量复制, 导致染病蜜蜂在 3 d 内死亡。由于 KBV 与 ABPV 有着极高的基因同源性 (de Miranda *et al.*, 2004), 导致这 2 种病毒的血清学和病理学特征极为相近, 容易混淆。在所有的蜜蜂病毒中, KBV 是一种在实验室注射条件下致病性最强的蜜蜂病毒。但是用混合 KBV 颗粒的食物饲喂蜜蜂, 并不会导致取食蜜蜂被感染, 证明 KBV 不经消化道途径危害蜜蜂。这也意味着 KBV 的爆发与“体壁—血淋巴”传播途径有关 (Bailey *et al.*, 1979)。研究证实瓦螨 *Varroa destructor* 可以携带和传播 KBV (Chen *et al.*, 2004), 并在瓦螨达到中等程度危害时, 引发致死性病毒病。因此蜂群内的蜂螨密度与 KBV 疾病的流行与爆发直接相关 (Todd *et al.*, 2007)。

2.5 黑蜂王台病毒 (BQCV)

BQCV 于 1977 年首次从染病的蜂王幼虫和封盖预蛹中分离 (Bailey and Woods, 1977)。BQCV

主要危害蜂王的幼虫和蛹, 春季和初夏为发病高峰期, 典型症状为患病幼虫体色变黄, 表皮逐渐硬化呈一皮囊。发病蜂蛹体色变暗, 快速死亡, 甚至将王台内壁染成棕色或黑色。BQCV 在世界范围和不同蜜蜂种间广泛存在 (Allen and Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005; Zhang *et al.*, 2012), 通常以一种无病症的隐性感染方式长期存在于被感染蜂群的成蜂或幼虫体内。BQCV 主要通过蜜蜂口器互饲行为进行传播, 特别是与蜜蜂肠道寄生虫蜜蜂微孢子虫 (*Nosema sp.*) 联合危害时, 表现出极强的致病性 (Ribiere *et al.*, 2008)。虽然在瓦螨体内能检测到黑蜂王台病毒 (BQCV), 但并未发现瓦螨的寄生与黑蜂王台病的流行有直接联系。

2.6 以色列急性麻痹病毒 (IAPV)

IAPV 于 2007 年才在以色列被分离鉴定 (Maori *et al.*, 2007)。可侵染各个发育时期的蜜蜂个体 (卵、幼虫、蛹、成蜂) 和蜂群各级型蜜蜂 (工蜂、雄蜂和蜂王)。典型发病症状为: 患病蜜蜂体色变暗, 绒毛脱落, 伴随翅震颤, 逐渐麻痹死亡。病症与 ABPV 相似, 并且其生物学和系统发育学特性都与 ABPV 和 KBV 非常接近, 同时与 ABPV 和 KBV 核酸序列还有 65% 和 75% 的同源性 (de Miranda *et al.*, 2010a)。

对 IAPV 的广泛关注源于 2007 年 CCD 爆发期间, 当使用宏基因组方法进行 CCD 蜂群和正常蜂群间病原物差异的分析后, 数据显示 IAPV 与美国 CCD 蜂群有强烈的相关性 (Cox-Foster *et al.*, 2007)。随后 IAPV 在欧洲、亚洲和南美洲的多个国家被报道, 证实其广泛的自然分布。虽然 IAPV 与 CCD 相关性优于其它病原物, 但并不是所有 CCD 蜂群都有 IAPV 存在。CCD 与蜜蜂病毒之间的关系还有待揭示, 新的致病原因或是多因子联合危害的推测还需更多的实验数据 (Higes *et al.*, 2008; Bromenshenk *et al.*, 2010)。更重要的是 CCD 事件引发了世界范围对因授粉昆虫持续减少现象带来的全球农业授粉危机和生态危机的关注, 这一现象与因蜜蜂和蜂产品的国际贸易导致多种蜜蜂病毒广泛传播有关。

2.7 蜜蜂卷翅病毒 (DWV)

DWV 于 1991 从日本发病蜜蜂上被分离鉴定, 目前除了大洋洲外的其他地区的蜜蜂蜂群内均有 DWV 的分布 (Allen and Ball, 1996; Ellis and

Munn, 2005)。此外在东方蜜蜂和另外 2 种野生蜜蜂也被证实有 DWV 存在 (Bailey and Ball, 1991; Zhang *et al.*, 2012)。DWV 是少数几种会导致寄主表现典型发病症状的蜜蜂病毒, 发病成蜂的翅卷曲变皱, 身体萎缩, 体色变暗, 失去飞行能力, 只能爬行, 1~2 日后死亡。除了成蜂, DWV 可以侵染蜜蜂其他所有发育阶段的个体, 如卵、幼虫和蛹。在蛹期不表现明显危害, 而在羽化时出现翅残缺, 羽化数日后快速死亡。无发病症状的隐性感染蜜蜂也被认为 DWV 会导致寿命缩短 (Kovac and Crailsheim, 1988; Bailey and Ball, 1991; Ball and Bailey, 1997; de Miranda and Genersch, 2010c)。

在瓦螨从原寄主亚洲蜂群中扩散开之前, 卷翅病毒对西方蜜蜂蜂群并不表现可重视的危害。研究发现卷翅病毒病的流行与爆发与蜂群内瓦螨的寄生密度有关。高密度瓦螨寄生的蜂群内, 工蜂体内卷翅病毒 (DWV) 浓度极高, 尽管有时并不表现病症。进行治螨处理后, 蜂群内瓦螨密度降低的同时, 蜜蜂个体内病毒浓度也大幅度下降 (Martin *et al.*, 2010)。这一现象说明蜜蜂卷翅病的流行与爆发是卷翅病毒与瓦螨联合危害的结果。最新的研究数据显示, 源于隐性感染蜜蜂个体内的 DWV, 经寄生取食途径进入瓦螨体内复制, 浓度增加, 最终被瓦螨注射到寄生蜂蛹体内的高浓度卷翅病毒变异毒株, 是引发蜜蜂卷翅病的先决条件 (Yue and Genersch, 2005; Gisder *et al.*, 2009)。同样的, 另外一种原寄主为亚洲蜂的寄生螨—小蜂螨 *Tropilaelaps mercedesae* 也会引发病毒病的爆发。随着瓦螨的不断扩散, 蜜蜂卷翅病已成为一种全球性的蜜蜂烈性传染病, 而蜂螨—病毒联合危害也被却认为是导致全球授粉蜂群数量持续下降的首要原因。

2.8 蜜蜂缓慢性麻痹病毒 (SBPV)

于 1974 年发现的蜜蜂慢性麻痹病毒 (SBPV) 的 2 个共存毒株的全基因序列已在近期发表 (de Miranda *et al.*, 2010b)。与急性麻痹病毒 (ABPV) 注射试验短时间内出现发病症状不同, 蜜蜂在注射病毒 12 d 后, 才在两对前足表现出麻痹现象 (Bailey and Woods, 1974)。这种病毒可以在蜜蜂个体的多个部位检出, 如头部、下颚、下咽腺、唾液腺、脂肪体和前足, 但很少存积于后足、中肠、直肠

和胸部。慢性麻痹病毒在自然条件下通过工蜂互哺途径长期存在于被隐性感染的蜂群的 (de Miranda *et al.*, 2010b)。SBPV 可以虫媒传播方式通过瓦螨进行传播, 感染各个发育阶段的蜜蜂个体 (幼虫、蛹和成虫), 在群体水平和个体水平上对蜜蜂造成严重的危害 (Carreck *et al.*, 2010, Santillan-Galicia *et al.*, 2010)。

2.9 其他蜜蜂病毒的危害和发病特征

蜜蜂云翅病毒 (cloudy wing virus, 简称 CWV) 是一种直径仅 17 nm 的小颗粒病毒, 病毒粒子含一个被包裹在 19 ku 的蛋白衣壳内的由 1 500 个核苷酸构成的 RNA 链 (Ribiere *et al.*, 2008)。CWV 的典型症状是患病蜜蜂翅膀失去通透性, 变得云雾状模糊。尽管染病蜜蜂组织器官没有明显的病理学上的变化, 但在其胸部肌肉纤维内可观测到大量呈晶体状排列的病毒颗粒。目前还不清楚 CWV 的传播方式, 但是实验证明不能通过虫媒注射的途径感染蜜蜂, 但根据病毒颗粒在蜜蜂头胸部富集的特性, 猜测有可能是通过食物和空气进行传播。

蜜蜂 X 病毒 (bee virus X, 简称 BVX) 和蜜蜂 Y 病毒 (bee virus Y, 简称 BVY) 是一种直径为 35 nm 的外被 50~52 ku 衣壳蛋白的 RNA 颗粒病毒 (Bailey and Ball, 1991; Ribiere *et al.*, 2008)。BVX 和 BVY 是 2 个非常相似的病毒毒株, 它们分别与 2 种蜜蜂的肠道寄生虫—马氏管阿米巴 (*Malpighamoeba mellificae* 与 BVX) 和蜜蜂微孢子虫 (*Nosema apis* 与 BVY) 密切相关, 通过粪便—口器传播途径, 感染成年蜜蜂的消化道 (Bailey and Ball, 1991; Ribiere *et al.*, 2008)。二者最佳侵染温度为 30℃, 低于蜂巢的正常温度 35℃, 所以多发于冬季和早春。

阿肯色病毒 (Arkansas bee virus, 简称 ABV)、伯克立病毒 (Berkeley bee virus 简称 BBPV)、黄斑镶嵌病毒 (macura-like viruses) 外形均是直径为 30 nm 的二十面体颗粒病毒, 其中阿肯色病毒有一个 43 ku 的衣壳蛋白和含 6 000 个核苷酸的 RNA 链; 伯克立病毒的约 9 000 个核苷酸组成的 RNA 链包埋于 3 个大小分别为 37、35 和 32.5 ku 的独立衣壳蛋白 (Lommel *et al.*, 1985); ABV 和 BBPV 是 2 种分布在美国的蜜蜂病毒, 于 1991 年从加里弗利亚的弱小蜂群中被同时检出, 有着和昆虫颗粒病

毒相似的形态特征,目前仍不了解它们的分布和危害。

蜜蜂拟黄斑病毒 (macula-like virus) 则由一个 6 500 个核苷酸组成 RNA 基因组和一个 24 ku 的衣壳蛋白构成 (Katsuma *et al.*, 2005)。蜜蜂拟黄斑病毒分布广泛,可侵染成蜂和蜂蛹,秋季为疾病高发期 (Lanzi *et al.*, 2006)。可在瓦螨样本内检出极高的病毒浓度,加之疾病暴发与瓦螨寄生有着紧密地联系,而被认为可能是一种原寄主为瓦螨的病毒。目前相关的研究结果仅基于病毒的核酸数据,而真正意义上的病毒学研究仍在进行中。

蜜蜂丝状病毒 (*Apis mellifera* filamentous virus, 简称 AmFV) 和蜜蜂虹彩病毒 (*Apis iridescent virus*, 简称 AIV) 是双链 DNA (dsDNA) 病毒。AmFV 的名字源于它具有的一个长丝状核蛋白 (3 150 nm × 40 nm), 通过 3 次 8 字形卷曲, 最终构成一个 450 nm × 170 nm 的短棒形的有包膜的病毒粒子 (Sitaropoulou *et al.*, 1989), 内含一个长度为 120 ~ 150 k 碱基对的 DNA 基因组, 基因特征与囊泡病毒属和杆状病毒属病毒非常相似。AmFV 常富集在染病蜜蜂的脂肪体、卵巢组织中, 特别在发病后期, 由于淋巴液中存在大量的被膜病毒颗粒, 而使得患病个体血淋巴变为乳白色, 成为蜜蜂丝状病毒病的典型发病特征。AmFV 经消化道途径与蜜蜂微孢子虫共同侵害蜜蜂 (Bailey *et al.*, 1983a), 通常不表现症状。发病高峰出现在新老蜜蜂交替的春繁期 (Bailey and Ball, 1991), 在一些死亡蜜蜂和患病蜂群样本中可观察到血淋巴变为乳白色的发病特征和检测出高浓度 AmFV 病毒颗粒。

蜜蜂虹彩病毒 (*Apis iridescent virus*, 简称 AIV)。AIV 属于虹彩病毒科 (Iridoviridae), 具一个 200 kb 的双链 DNA 基因组内核, 外被一层内膜和一个核蛋白外壳包裹, 外形为一直径为 140 nm 的等轴二十面体大颗粒病毒。AIV 与印度东方蜜蜂 *Apis cerana* 的一种聚蜂病有关, 表现为部分不活跃的蜜蜂聚集成团, 并从蜂群分离, 多发于夏季。但随外界蜜源条件的改善而缓解或痊愈 (Bailey and Ball, 1991)。AIV 也可感染西方蜜蜂, 虹彩病毒被报道在西方蜜蜂的寄生螨 *Varroa mite* 样本内发现 (Camazine and Liu, 1998), 并作为一种与蜂群丢失相关的病原体而纳入 CCD 的研究范围。近期的一项 CCD 蜂群和健康蜂群病原体的对比调查报告中, 发现 AIV 与 CCD 高度关

联, 加之高浓度的蜜蜂微孢子虫的检出, 意味着二者的联合危害可能是导致蜂群损失的一个原因 (Bromenshenk *et al.*, 2010)。

3 蜜蜂病毒的传播途径

传播方式是以蜜蜂为永久宿主的蜜蜂病毒生命周期的一个重要环节。蜜蜂是一种典型的社会性昆虫, 具有如共哺幼虫、级型分化、世代重叠、社会分工等社会性特征。蜂巢内庞大的蜜蜂数量 (20 000 ~ 60 000 只工蜂) 的和个体间频繁的身体接触极易导致疾病传播。目前研究证明蜜蜂病毒可以在水平 (horizontal) 和垂直 (vertical) 方向上进行传播 (Chen and Siede, 2007)。水平传播是指病毒在同一世代的不同个体间扩散, 这种传播方式可进一步划分为直接传播 (如互饲、触碰、空气和交配) 和间接传播 (如寄生虫)。垂直传播是指病毒可利用蜂王的繁殖生产, 通过卵在不同世代间进行传递, 具体又可细分为卵表传播和卵核传播。

3.1 水平传播

3.1.1 虫媒传播 导致近年来蜜蜂病毒病频发与流行的主要原因是一种原寄主为亚洲蜂 *Apis cerana* 的寄生螨—瓦螨传播到西方蜜蜂蜂群中, 并在世界范围内扩散, 因此给世界蜜蜂养殖业带来一系列灾难性的打击。瓦螨的生命周期可分为侵害蜜蜂幼虫阶段的繁殖期 (reproductive phase) 和侵袭成蜂阶段的交配期 (phoretic phase) (图 3)。瓦螨的寄生在削弱蜜蜂健康的同时, 还作为一个病毒载体, 通过穿刺蜜蜂体壁吸食体液的方式传播蜜蜂病毒 (De Jong *et al.*, 1982; Kovac and Crailsheim, 1988; Yang and Cox-Foster, 2005)。这种被称为蜜蜂寄生螨综合症 (bee parasitic mite syndrome) 的现象被用来描述蜜蜂病毒和瓦螨共同侵害蜜蜂后表现出的特殊病症 (Shimanuki *et al.*, 1994)。寄生螨从隐性感染的蜜蜂个体内获得微量病毒颗粒, 可在寄生螨体内合成高浓度的病毒, 通过寄生螨的取食行为, 直接将呈几何级数增加的病毒颗粒注射到健康蜜蜂的体内, 从而表现出比其他病毒传染途径更强的致病性, 瓦螨与病毒病的共同危害将导致蜂群的迅速崩溃 (Ball and Allen, 1988; Kulinčević *et al.*, 1990; Allen and Ball, 1996)。研究结果表明瓦螨可传播多种蜜蜂病毒 (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Shen *et al.*,

2005; Yue and Genersch 2005; Gisder *et al.*, 2009; Santillan-Galicia *et al.*, 2010), 瓦螨的寄生是近年来蜜蜂病毒病频发与流行的关键因素。适时有效地控制蜂群内寄生瓦螨的密度可明显抑制蜜蜂病毒浓度, 以保证蜂群健康和减少冬季损失。

此外原寄主为大蜜蜂 *Apis dorsata* 的小蜂螨 *Tropilaelaps* 也被证实至少是一种蜜蜂病毒 (DWV) 的传播媒介, 对侵染蜂群有着与瓦螨类似的危害 (Dainat *et al.*, 2009; Forsgren *et al.*, 2009)。虽然没有证据表明蜜蜂气管螨 *Acarapis woodi* 可携带和传播某种蜜蜂病毒, 但是它取食蜜蜂体液的寄生行为同样会对蜜蜂健康产生负面影响, 与蜜蜂病毒的联合危害, 会导致寄生蜂群表现麻痹病症状 (Bailey and Ball, 1991; Ribiere *et al.*, 2008, 2010)。

3.1.2 食物 - 消化道传播 蜜蜂取食被病毒颗粒污染的食物 (蜂蜜、花粉和蜂王浆) 或内勤蜂清理巢房、发病幼虫和蜂巢内的粪便时都会接触到病毒 (Chen *et al.*, 2006)。同时蜂巢内储存的食物样本被检出含有多种病毒及蜜蜂中肠和粪便内的高浓度病毒颗粒的存在都证实了这一传播途径的广泛存在 (图 3)。虽然蜜蜂具有的社会性互饲行为是一种最普遍蜜蜂病毒水平传播方式, 但“食物 - 消化道”传染方式很少对蜂群造成危害, 大多数蜜蜂病毒病的流行与爆发都需要一些特定的诱因 (Bailey and Ball, 1991)。

3.1.3 体表接触传播 当蜜蜂表皮破损 (如体表绒毛断裂), 蜜蜂病毒在蜜蜂身体接触过程中, 从伤口进入健康蜜蜂体内 (Bailey *et al.*, 1983b; Bailey and Ball, 1991)。如在拥挤的蜂群内和盗蜂发生时, 蜜蜂个体身体接触几率增加, 导致蜜蜂病毒快速传播。特别是进行长途蜂群搬运时, 通常要求人工幽闭活跃的蜂群, 加之途中蜂箱的摇晃和碰撞, 增加了这一传播方式的发生几率。

3.2 蜜蜂病毒的垂直传播

病毒垂直传播的实现取决于 3 个关键环节: 交配感染、生殖配子带毒、受精卵污染。交配感染是一种水平方向的传播途径, 因为雄蜂完成交配后很快死亡, 所以交配感染可以看作是一种单向的传播形式 (图 3)。蜜蜂的交配感染是一种高效的病毒传播方式, 由于蜜蜂特殊的婚飞交配行为和处女蜂王多次受精的需要, 使蜜蜂病毒可以在

一个较大区域内的蜂群间迅速扩散。雄蜂的精囊和精液中常含有多种高浓度的病毒颗粒 (Fievet *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2006), 这些带毒精子通过交配行为, 贮存在蜂王的储精囊内, 供蜂王终生授精所用。同时带毒精子也会感染蜂王的储精囊和卵巢 (Yue *et al.*, 2007; de Miranda and Fries, 2008) 结果导致病毒在亲代与子代间的垂直传递 (图 3)。另一方面, 在蜂王卵巢和经表面消毒的未受精卵内均可检出多种蜜蜂病毒 (Chen *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2011), 证实被感染蜂王卵巢污染虫卵的传播途径也是一种普遍存在的垂直

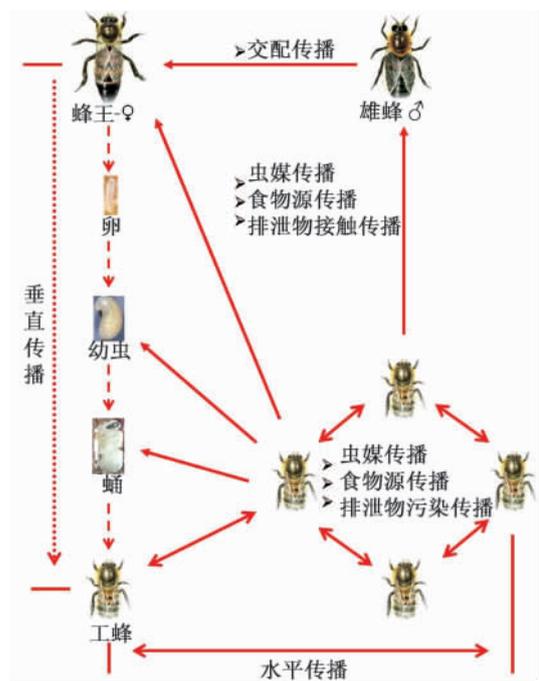


图 3 蜜蜂病毒传播途径示意图
(仿 Chen and Siede, 2007)

Fig. 3 Route of virus transmission in honey bees (modified from Chen and Siede, 2007)

蜜蜂病毒可以在水平和垂直方向上进行传播。蜜蜂病毒的水平传播是通过食物互饲、排泄物污染、寄生虫媒介和交配行为等方式在同一世代的蜜蜂个体间进行传播; 在垂直方向上通过感染蜂王和雄蜂生殖系统而污染生殖配子从亲代传递到子代蜜蜂个体中。

Different bee hosts are infected by viruses among the same generation in horizontal transmission via the following means: food-borne transmission, fecal-oral transmission, venereal (sexual) transmission, and/or vector-borne transmission. Viruses are also vertically transmitted from infected queen to their offspring.

传播方式。之前研究表明 ABPV、BQCV、DWV、KBV、SBV 等多种病毒均可通过这一方式在蜂群内传播 (Fries and Camazine, 2001; Shen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006)。

4 寄主范围

研究显示已知病原体的 60% 均为多重寄主类病原 (Daszak *et al.*, 2000; Woolhouse *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2005), 多寄主病原体寄主范围的研究是流行病学的的一个基本内容。多种蜜蜂病毒已被证实有多寄主现象, 如 DWV 和 BQCV 在多个种类的熊蜂样本中检出 (Genersch *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011), ABPV 和 KBV 也被发现可以侵染多个熊蜂种 (Bailey and Gibbs, 1964b; Anderson, 1991)。最新的研究数据显示蜜蜂病毒 (DWV、BQCV、IAPV、KBV 和 SBV) 广泛分布美国 11 个非蜜蜂科的膜翅目授粉昆虫中 (Singh *et al.*, 2010), 栖息于同一生境中的不同蜜蜂种类 (大蜜蜂和小蜜蜂) 也被证实可被 DWV 和 BQCV 侵染 (Zhang *et al.*, 2012)。

之前研究显示大多数蜜蜂属的蜜蜂种类均可被蜜蜂病毒侵染 (Zhang *et al.*, 2012; Ai *et al.*, 2012)。而熊蜂 (bumble bee) 和胡蜂 (wasp) 等非蜜蜂科的膜翅目授粉昆虫也是多种蜜蜂病毒的自然寄主 (Singh *et al.*, 2010), 可能因与蜜蜂共享同种蜜粉源植物或捕食及偷盗蜜蜂蜂群而被传染。一般情况下, 蜜蜂病毒在其他替代寄主中的传播

是单向不可逆的, 虽然蜜蜂害虫体内, 如蜂巢小甲虫 *Apis tumida*、大蜡螟 *Galleria mellonella*、蚂蚁、甚至蜂巢细菌等 (Celle *et al.*, 2008; Eyer *et al.*, 2009; Ribiere *et al.*, 2010) 都被证实有蜜蜂病毒的存在, 但也被认为是一种单向的传播。但是当蜜蜂采集某些蚜虫分泌的甜物质时, 病毒的传播方向被逆转。这意味着蚜虫体内的某些病毒, 能通过蜜蜂的采集行为扩散到蜂群内。尽管这些蚜虫病毒并不侵害蜜蜂。

对已报道的 9 种蜜蜂蜂种 DNA 序列的系统发育分析数据显示, 露天单脾营巢的大蜜蜂 *Apis dorsata* 和小蜜蜂 *Apis florea* 虽然在进化程度上低于穴居复脾营巢的其他蜂种 *Apis mellifera*, *Apis cerana* (Raffiudin and Crozier, 2006), 但是在长期的进化过程中, 已成为当地热带雨林和农业生态系统不可分割的一部分。由于栖息地的破坏和破碎, 这些野生蜜蜂的种群数量也在不断下降, 本土授粉昆虫的持续减少, 已对当地原始生态系统的恢复和生物多样性的保护造成负面影响。加之外来蜂种 *Apis mellifera* 的大量引入, 在种间竞争压力加剧的同时, 新的蜜蜂病害也随之被广泛传播。

我们在对云南西双版纳野生蜜蜂病毒病的调查研究结果显示, 原分离鉴定于西方蜜蜂个体的 DWV 和 BQCV 均可从当地的大蜜蜂和小蜜蜂样本中检出 (Zhang *et al.*, 2012)。而对源于不同蜂种的病毒基因比较分析的数据显示 2 种野生蜜蜂体内的病毒 RNA 序列和来自西方蜜蜂个体的病

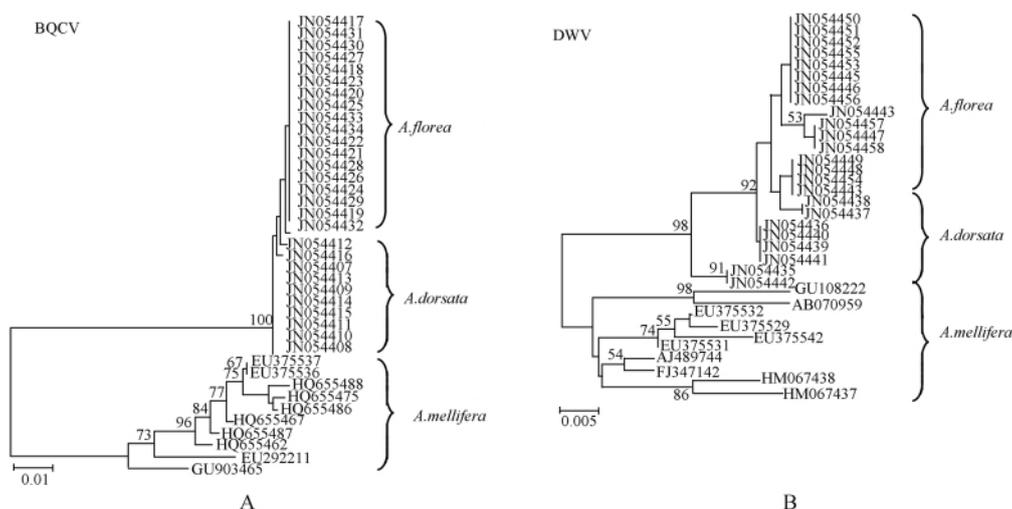


图 4 源于不同蜂种的 BQCV 和 DWV 类群进化关系图

Fig. 4 Evolutionary relationships of BQCV taxa and DWV taxa (Zhang *et al.*, 2012)

毒 RNA 序列在在系统进化树上分别聚合成 2 个有明显进化距离分枝(图 4)。而来自本土野生蜜蜂的病毒毒株较源于外来蜂种 *A. mellifera* 的病毒有更高的基因突变率,意味着蜜蜂病毒从外来蜂种 *A. mellifera* 到土著蜂种 *A. dorsata*, *A. florea* 的传播方向,对当地蜜蜂多样性构成威胁(Zhang *et al.*, 2012)。这一结论进一步证明蜜蜂病毒有着多重进化策略和广泛的寄主范围,而源于大蜜蜂(和小蜜蜂的同种病毒的高度基因同源性,则反映了这 2 种蜜蜂寄主共同的生态环境和相近的遗传进化关系。

因 RNA 病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶校对机制的缺失,使得病毒复制时具有高突变率,这一特性使其拥有对外界复杂环境的强大适应力,这也表现在所有已发现的致病病原体的 37% 属于 RNA 病毒的高百分率(Woolhouse and Gowtage-Sequeria, 2005)。蜜蜂病毒不断扩大的寄主范围,也再次验证了寄主种间分布范围的地理邻接和重叠,以及寄主种间的遗传进化关系决定着病毒利用花粉作为传播媒介选择寄主的范围(Singh *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012)。

5 与其他致病因子的关系

蜜蜂病毒长期存在于蜜蜂蜂群中,并不表现明显症状。但是在外界不良条件或自身健康水平下降等因素的刺激下,蜜蜂体内病毒开始应激性复制,当浓度达到一定临界值时,表现发病症状和疾病暴发。

5.1 蜜蜂体表寄生虫

蜜蜂体外寄生虫主要指蜜蜂体外寄生螨(*Varroa destructor*, *Tropilaelaps*, *Acarapis woodi*),通过直接穿刺蜜蜂体壁,取食蜜蜂体液。这一寄生方式为许多蜜蜂病毒提供了一种颠覆性的,避开蜜蜂所有的防御机制,直接进入血淋巴的传播途径。这种不同于之前的“食物-消化道”的传播方式在于只需微量的带毒颗粒进入蜜蜂淋巴液中,就会引发病毒病(Bailey and Ball, 1991; Shimanuki *et al.*, 1994; Yang and Cox-Foster, 2005; Dainat *et al.*, 2009; Forsgren *et al.*, 2009),导致蜜蜂快速死亡。现已证实多种蜜蜂病毒可以被蜜蜂寄生螨传播,其中 DWV、ABPV、IAPV、KBV 和 SBPV 最为

明显。此外,SBV、BQCV、macula-like virus 和 AmFV 等也均从蜜蜂寄生螨样本中检出(Ball, 1989; Bowen-Walker *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2005; Yue and Genersch 2005; Gisder *et al.*, 2009; Santillan-Galicia *et al.*, 2010)。同时,检测数据显示病毒浓度在寄生螨体内明显增加,表明病毒在虫媒体内会进行适应性改变。例如 DWV 在被蜜蜂寄生螨(瓦螨或小蜂螨)注入蜜蜂体内前,已在蜂螨组织细胞内被大量复制,表现出极高的病毒浓度(Tentcheva *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2007)。目前还不清楚这种复制的过程,有可能当寄生螨取食带毒蜜蜂淋巴液后,病毒复制就在寄生螨体内被激活。通过感染蜂螨肠道上皮组织,侵入淋巴液并通过循环系统感染其他器官,如唾液腺。这样在下次取食过程中,将新复制的病毒直接释放到蜜蜂的血淋巴中,目前仍缺乏这一传播途径的相关证据。另外蜜蜂病毒也仅仅可能是被动地黏附在蜂螨口器或肠道上皮细胞表面,在取食过程中,因反刍作用进入到蜜蜂淋巴液中。这一方式要求病毒颗粒在从蜜蜂到蜜蜂的体外传播途中有极强稳定性和致病性。也可能在自然条件下不表现致病性的蜜蜂病毒,因穿刺体壁进入淋巴的方式被激活。这一结论已通过注射病毒到健康蜜蜂体内的实验得到验证(Anderson and Gibbs, 1988; Bailey and Ball, 1991)。瓦螨侵袭蜂群的强度与蜂群崩溃的关系随时间推移而表现下降趋势。在欧洲,1980 年以前,蜂群内瓦螨密度寄生高达每群数千只时仍很少表现发病症状(Boecking and Genersch, 2008)。而现今,瓦螨寄生密度只要到每群 1 000 只,即群势为 10 000 只蜜蜂蜂群的 10% 水平时,就达到了发生 CCD 的临界值(De Jong, 1997; Boecking and Genersch, 2008)。尽管我们仍无法解释蜜蜂病毒的激活和病毒病的诱发机制,但是被蜂螨侵袭蜂群表现出的病毒浓度显著增加的现象反映了这种发病机制作用蜂群的结果。

瓦螨和病毒共同侵袭蜂群已被确认是导致目前蜂群损失(包括 CCD)的一个主要原因。此时如不进行及时防治,蜂群将不可逆转地崩溃消亡。具体症状表现为蜂群群势快速下降,蜜蜂个体营养不良,大量新羽化蜜蜂翅膀残疾并失去飞翔能力,腹部萎缩,体色变深,寿命缩减。瓦螨可携带多种病毒,而这些病毒大多在蜂螨从亚洲蜂传入

前就存在于蜜蜂中 (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 2005)。

5.2 蜜蜂肠道寄生虫

蜜蜂病毒一般通过“食物-消化道”途径感染蜜蜂个体,并集中在蜜蜂中肠上皮细胞内进行复制。正常情况下,肠道上皮细胞通过不断更新,限制了病原体对蜜蜂肠道组织的破坏,加之消化道具有的防御机制,如中肠的围食膜和肠道上皮细胞附着的基底层可有效过滤和抵御病毒进入血淋巴并扩散到别的组织引发疾病。但是一些肠道寄生虫,如蜜蜂微孢子虫 *Nosema sp.* 或西方蜜蜂马氏管阿米巴虫 *Malpighamoeba mellifica* 在完成其生命周期的寄生过程中,常导致蜜蜂肠道上皮细胞病变,破坏肠道组织的防御体系,使得蜜蜂病毒可直接进入蜜蜂血淋巴中,引发病毒病。这种蜜蜂微孢子虫和蜜蜂病毒(如黑蜂王台病毒、蜜蜂丝状病毒和蜜蜂 Y 病毒)的联合侵害方式已被贝里的实验证实 (Bailey *et al.*, 1983b)。近期的研究报告显示,原寄主为东方蜜蜂的一种微孢子虫 *Nosema cerana* 在世界范围内的西方蜜蜂种群内扩散,正取代原寄主为欧洲的 *Nosema apis*, 严重威胁蜜蜂健康 (Klee *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008)。

5.3 其他致病因子

蜜蜂病毒病的爆发与流行与蜜蜂蜂群健康状况有直接联系。正常情况下,蜜蜂病毒不能离开蜜蜂独立存活,而在蜜蜂体内表现出隐性感染状态。具体表现为被隐性感染的蜜蜂个体内的病毒浓度很低,并且不影响蜜蜂的正常活动,无明显发病症状。但是,当蜜蜂个体受外界因素影响(如营养不良或受体表寄生螨侵袭等),导致蜜蜂机体衰弱,免疫力下降时,被病毒隐性感染的蜜蜂个体内的病毒浓度 (titer) 就会在短时间内急剧增加,这时被病毒隐性感染的蜜蜂就转变为显性感染,出现明显的发病症状,并伴随其他疾病同时爆发,染病个体在短时间内死亡 (Ongus *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005)。

另一方面,气候也是直接影响蜜蜂健康的因素。蜜蜂蜂群常年恒定在 33 ~ 36℃,而在蜂巢中心子脾区,温度在 (35 ± 5)℃ 波动 (Kleinhenz *et al.*, 2003)。这一温度范围对于蜜蜂幼虫的正常发育至关重要,过高或过低的温度和过大幅度的温度变动都会对蜜蜂幼虫或蛹造成直接伤害,

表现为羽化出形态畸形的成蜂,或死亡率升高 (Koeniger, 1978)。在春秋两季,外界气温不稳定,如果蜂群没有得到良好保温,极易对幼虫造成冻伤。同时低温还会引发病害的滋生,如蜜蜂球囊菌 (*Ascospaera apis*) 引发的白垩病 (chalkbrood)。特别是秋季蜂群进入越冬准备期时,需要培育足够长寿越冬蜂,如遇低温冻伤,加之蜂螨和蜜蜂病毒共同作用,导致蜜蜂越冬期寿命缩短,最终出现蜂群崩溃。幼虫发育期遭受低温伤害的蜜蜂,羽化后由于免疫力低下,易被病原体感染 (McMullan and Brown, 2005)。近期的研究报道证实蜜蜂羽化期受低温或高温影响,均可诱发隐性感染蜜蜂体内病毒浓度激增,缩短蜜蜂寿命 (Prisco *et al.*, 2011)。

此外,蜜蜂营养对蜜蜂的健康也至关重要。由于大面积单一作物的种植方式,使得授粉蜂群一段时期内仅能获取单一种类的花蜜和花粉,对蜜蜂健康造成负面影响 (Richard and Lisa, 2009)。同时由于替代饲料的广泛使用(如蔗糖和蛋白饲料),也使蜜蜂长时期处于营养不足状态。这些因素也是导致蜜蜂抵抗力下降,使疾病易于流行与爆发 (Stephen and Robert, 2000)。

6 病毒病的诊断

相对于其他的病原体,蜜蜂病毒的多样性和隐性危害是导致难以诊断的一个重要原因。尽管近来分子检测技术的发展,可以精确地检测出蜜蜂体内的病毒种类。但是这一技术的高敏感性又带来另一个问题,蜜蜂个体或群体内较低的蜜蜂病毒携带量,并不对蜜蜂造成可重视的危害。因此蜜蜂病毒病的检测和诊断技术仍需要在蜜蜂病毒的自然进化史、流行病学和病理学研究的基础上,建立一个可量化的评价标准 (Ribiere *et al.*, 2008)。

由于难以直接对极其微小的病毒颗粒进行观测,所以通常在实验室使用一种间接的技术手段进行检测,如根据病毒颗粒的特性(如病毒衣壳或一段核酸序列)设计一个抗体或一个核酸片断作为探针,并对这一探针进行化学或荧光标记,当这种探针与特定病毒接合后,我们便可通过显色技术检测到病毒。目前基于这一原理的病毒诊断技术已得到广泛的运用,同时根据检测目的衍生出免疫学(利用针对病毒衣壳蛋白的高特异性抗体

作为探针)和分子生物学(利用针对病毒基因组特定核酸序列的互补核酸片段作为探针)的 2 种不同的技术手段。实践中应根据工作目的和试验条件选择相应的技术,例如对试验灵敏度、特异性、精确度、费用和可操作性等方面的要求。

6.1 基于发病症状的诊断方法

一些蜜蜂病毒(如 DWV 和 SBV)会导致寄主表现出明显的发病症状,但寄主蜜蜂对大多蜜蜂病毒的侵染不表现可观测特异性症状。大多蜜蜂病毒都会侵染蜜蜂的神经系统,由此诱发蜜蜂行为失常,在开始阶段出现迷失方向、学习和记忆能力退化和丧失采集能力等现象,最后表现出不受控制的身体震颤,丧失飞行能力在地上爬行等明显的蜜蜂麻痹症。同时受蜜蜂病毒感染的蜜蜂,加速老化,平均生命历期缩减。如果蜂群中仅有少部分被感染,患病蜜蜂可被新孵化的健康蜜蜂补偿,则不会对蜂群的发展产生影响。一旦疾病流行,蜂群中患病蜜蜂数量超过新生正常蜜蜂的

补偿量后,平衡被打破,蜂群群势下降,进入快速衰退期,直至全群消亡。无论在个体或群体水平上蜜蜂病毒病的流行与爆发均同病毒总量增长正相关。

通过蜜蜂病毒病的发病症状进行临床诊断是一种最为简单、快速和廉价的检测方法,但仅适用于有限的几种蜜蜂病毒病,如囊状幼虫病(图 5:A)、黑蜂王台病(BQCV)和卷翅病(图 5:B)有明显发病症状的病毒病。蜜蜂慢性麻痹病的发病症状也是一种容易观察到的现象,但是发病原因比较复杂。多种蜜蜂病毒(如 ABPV、IAPB、SBPV)均会引起蜜蜂麻痹病症。另外,只有当蜜蜂体内病毒浓度超过一个临界值后,才表现出明显的发病症状。而多数情况下被病毒感染的蜜蜂个体并不表现任何可观测的病症,同时多数蜜蜂疾病的发病症状是多因素作用的结果,所以多数情况下仅依靠发病症状进行诊断是无法获得准确可信的结论。



图 5 2 种典型的蜜蜂病毒病发病症状图

Fig. 5 Typical symptoms of two honey bee virus diseases

A. 蜜蜂囊状幼虫病; B. 蜜蜂卷翅病。

A. sacbrood virus (photo by Virginia W); B. deformed wing virus (photo by Chen YP).

6.2 基于病毒形态学的显微镜检测方法

多数已报道的蜜蜂病毒,大多呈直径为 20 ~ 30 nm 的正二十面体颗粒状。这意味着必须使用电子显微镜(electron microscope)才能直接观测到分离纯化后的蜜蜂病毒颗粒样本(图 6:A, B)。虽然这种检测方法可以较为精确地测定蜜蜂病毒的大小、外形和侵染位置,但是多数蜜蜂病毒具有非常相似的外形,电镜下无法进一步区分病毒颗粒的种类。加之电镜检测要求的昂贵设备和复杂技

术,使得这一方法无法应用于常规检测。

6.3 基于免疫学的检测技术

免疫学检测技术的关键在于获得病毒样本衣壳蛋白的特异性抗体,通常用某种纯化的病毒溶液或病毒蛋白做为抗原注射到实验动物体内(如山羊、兔子、大鼠或小鼠)引起的免疫反应,产生特异性抗体,之后从动物血浆中回收用于免疫检测试验。目前多运用酶联免疫技术和侧流检测(免

疫层系)设备来实现。病毒样本首先在酶的作用下与非特异性抗体或其他可显像分子标记结合 (de Miranda and Fries, 2008), 然后引入特异性抗体替换与病毒蛋白结合的非特异性抗体, 通过显色反应 (测定样本吸光值) 获得检测结果。一旦获得特异性抗体, 免疫检测是一种低廉的可同时定性和定量的方法。然而由于多种蜜蜂病毒间具有高度的基因同源性, 如 ABPV 和 IAPV 间达 65%、IAPV 和 KBV 间达 70% 及 KBV 和 ABPV 间达 67% (de Miranda *et al.*, 2010a), 使得这一技术运用于蜜蜂病毒检测时特异性较差。

6.4 基于核酸序列的检测技术

所有已知的生命体均具一组由独一的基因编

码组成的核酸序列。利用核酸序列的差异性可准确地鉴定不同的生物种类。现在已有很多的核酸分子检测技术可供选择, 但是所有的分子检测方法都依赖核酸分子通过杂交和其互补序列 (模板) 是否可以构成稳定双链的能力。利用化学方法人工合成的小片段蜜蜂病毒基因互补序列可以对蜜蜂病毒样本进行快速而精确地定性和定量检测。

在蜜蜂病毒病诊断实践中, 运用最为广泛的是反转录聚合酶链式反应技术 (reverse transcription polymerase chain reaction, 以下简称 RT-PCR), 是一由聚合酶链式反应 (PCR) 技术发展而来的一种针对目的产物为 RNA 的核酸分子检测技术。首先须在依赖 RNA 的 DNA 聚合酶的

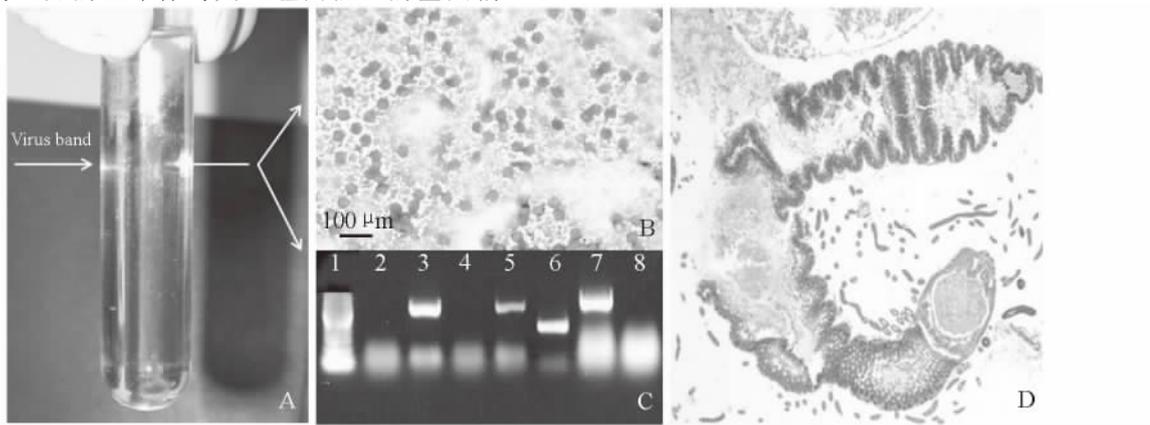


图 6 蜜蜂病毒病实验室诊断技术示意图

Fig. 6 Diagram of diagnose method of honey bee virus' disease

A. 病毒颗粒氯化铯溶液密度梯度分离纯化法; B. 蜜蜂病毒颗粒电子显微镜视野图 (右上角横条表示 100 nm 的相对长度); C. 使用 RT-PCR 分子技术对纯化样本中的 6 种蜜蜂病毒 (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV 和 SBV) 进行检测, 根据特异性引物扩增的长度不同的 PCR 产物, 对比 DNA 标尺定位阳性条带, 可初步判定样本中含有 4 种蜜蜂病毒, 即条带 3 的 BQCV、条带 5 的 DWV、条带 6 的 KBV、条带 7 号的 SBV, 其中条带 1 为分辨率 100 碱基对长度的 DNA 标尺, 条带 8 为空白对照。对照电镜视野图, 样本中的 4 种蜜蜂病毒颗粒无法通过形态特征区分; D. 蜜蜂中肠样本的原位杂交检测技术电镜图显示有 DWV 侵染中肠上皮细胞, 切片电镜图显示深色部分为 DWV 的感染区域。

A. virus band after CsCl density gradient centrifugation; B. electron micrograph of honey bee virus particles. Bee viruses are spherical to slightly oval particles about 29 nm in diameter as determined from EM. Bar marker represents 100 nm (© Chen and Siede, 2007); C. the virus preparation used for this electron micrograph was also examined for the presence of six viruses: ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, and SBV by RT-PCR. The primers used in the study were the same as reported earlier (Chen *et al.*, 2005). Four viruses, BQCV, DWV, KBV, and SBV, were detected in the virus preparation. Primer pair specific for BQCV, DWV, KBV, and SBV amplified a PCR fragment of 700, 702, 415, and 824 bp, respectively. lane 1, 100 bp DNA ladder; lane 2, ABPV; lane 3, BQCV; lane 4, CBPV; lane 5, DWV; lane 6, KBV; lane 7, SBV; and lane 8, negative control (previously identified negative sample). As shown in electron micrograph, no significant difference in the virion size and morphology could be observed among the four different virus particles (modified from Chen *et al.*, 2006); D. *in situ* hybridization image locating DWV RNA in worker bee mid-gut and rectal epithelial cells, visualized by optical microscopy as a brownish-dark coloration contrasting with the pale coloration of tissues (photo by Chen YP).

作用下(逆转录酶)以蜜蜂病毒的 RNA 分子为模板进行逆转录(reverse transcription),合成互补 DNA(cDNA)。随后,DNA 的另一条链通过脱氧核苷酸引物和依赖 DNA 的 DNA 聚合酶完成,随每个循环倍增,即通常的 PCR 循环。原先的 RNA 模板被 RNA 酶降解,留下互补 DNA。RT-PCR 可使目的产物呈指数级扩增,具有极高的灵敏度,可检测出极低拷贝数的 RNA 样本(图 6:C)。近年来,核酸分子检测技术得到快速发展,新的 PCR 技术不断出现,如定量逆转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, or qRT-PCR)可对样本中 RNA 病毒浓度进行准确地定量,多重 PCR(multiplex PCR)可在一个反应中同时检测多种病毒。基于核酸分子的 PCR 检测技术与血清学检测方法相比,具有极高的敏感度(极低的检测极限),更加的简单、快速、廉价和精确,同时也具有更广泛的适应性,易于实验室间的结果验证和交流。可以说现代生物分子检测技术极大地推进了蜜蜂病毒学的研究,是目前进行蜜蜂病毒学研究的主要工具。

另外,使用能和蜜蜂病毒基因序列互补的核酸片段作为探针,也能观测到蜜蜂组织中的病毒。如原位杂交技术,用石蜡或水性树脂包裹蜜蜂器官样本,切成显微镜测用的薄片,然后将组织切片固定在载玻片上。用准备好的核酸探针与样本中的病毒进行互补配对反应,反应复合物可以用化学或荧光染色法着色后,在显微镜下进行观测(图 6:D)。这是一种极为准确的蜜蜂病毒检测技术,但是限于昂贵而耗时的特点,还无法运用于常规检测。

生物技术正处于一个快速发展的阶段,新一代的生物检测技术和分析工具以一种更加全球化的角度不断被开发。这些技术涉及对宏基因组、蛋白质组、转录组和代谢产物分析,以及对由获得的巨量生物数据的分析。例如用于核酸分析的新一代 DNA 芯片和高通量测序技术可以对样本的目的基因同时进行巨量分析与对比。尽管高昂的费用限制新技术的推广,但是对于珍稀的样品和大批量的样本检测却是一种强大而高效的手段。如果检测成本下降,加之在一次检测中可处理多种的病原体和寄主目的基因,更灵敏高效的新型技术将逐步取代现有的诊断方法。

7 蜜蜂病毒病防治措施

蜜蜂病毒病的流行与爆发会给蜜蜂养殖产业和种植业造成巨大损失,但同其他动植物病毒病一样,现今仍无有效的药物防治方法。根据蜜蜂个体及群体的生物学特性,一般通过饲养管理手段,减少饲养蜂群被传染的可能,即从抑制蜂群病毒浓度(低浓度蜜蜂病毒的隐性感染,不表现致病性)和切断病毒传播途径 2 个方面着手。同时这两方面又是相互联系的,蜜蜂病毒病的流行与蜂群内带毒蜜蜂比例及病毒浓度呈正相关。一个有效的蜂场综合管理措施是必需的,通常包含以下 3 个方面的内容:(1)快速准确的疾病诊断技术是及时采取管理措施的前提;(2)科学的饲养管理技术意味着蜂群健康和更强的抗病性;(3)有目的地选择和繁育抗病蜜蜂病种(Chen and Siede,2007)。

7.1 病原体传播途径控制

不可否认地现代蜂业的活框蜂箱和全球化的蜜蜂及蜂产品贸易是蜜蜂疾病最主要的传播途径。由于这样的一些疾病传播方式均是人为因素造成的,所以在养蜂生产中也容易进行管理控制。在实践中最有效的管理方法,是以蜂场为单位,获得健康的生产用蜂(笼蜂、蜂王、蜂群等)。对养蜂场地和所有的养蜂用具进行全面的清洁与消毒,特别是经常附着病原物的巢框和蜜蜂饲料(如花粉或蜂粮)。此外由于养蜂机具(如起刮刀、摇蜜机等)常被不同的蜂场交替使用,所以良好的清洁和消毒习惯可有效预防疾病的发生。

7.1.1 蜂场管理 相对隔离地进行蜂场管理(如治疗、生产、饲喂及储存)是最大限度切断蜂场间疾病传播的有效手段,特别在蜂种来源不同的蜂场间,隔离措施尤为重要。准确详细的蜂种来源纪录,是进行蜜蜂疾病诊断和追溯的重要依据。蜂场间不少于 1 km 的间隔距离,才能有效进行自然防疫,特别是在大流蜜期的生产季节尤为重要。因此蜂场的选择和蜂群密度的控制是进行蜜蜂疾病预防的核心。从防疫学的角度,多个小型分散的蜂场管理模式远优于少量大型而集中的蜂场管理模式。

7.1.2 蜂群管理 科学的进行蜂群常规检查是及时发现蜜蜂疾病和选择防治措施的关键,因此全面的了解各种蜜蜂疾病的发病症状是养蜂员必

需具备的技能。如蜂群春繁期发展缓慢、大流蜜生产期不能获得高产、蜂群出现插花子脾或多卵同房等不正常现象,均有可能是疾病暴发的前兆。此时可以通过发病症状或寄送蜜蜂幼虫或成蜂样本到实验室进行初步诊断。目前已有一些蜜蜂疾病的田间快速诊断试剂盒被运用于养蜂生产中。及时隔离患病蜂群并结合全场消毒可有效防治疾病扩散,同时调整蜂箱巢门方向和涂色标记蜂群巢门可减少蜂群间因迷巢途径的疾病传播,在流蜜后期,及时调小巢门可防止盗蜂发生,避免蜂群互盗引起的疾病传播。

7.1.3 蜂王健康 蜜蜂病毒的垂直传播是因被感染雄蜂与处女蜂王的交配所致,由于蜂王在蜂群中特殊的生殖地位,蜂王因交配感染而导致病毒通过带毒配子扩散是一种最为常见的病毒病传播途径。所以对于人工授精所用精液和精液供体雄蜂蜂群的疾病检测极为重要。

7.1.4 病原物的国际性传播途径控制 蜜蜂和蜂产品在世界范围内的流通和扩散,致使几乎所有的蜜蜂病毒病可以在任何一个国家发现。然而流行规律和危害程度却大不相同,甚至在相邻的2个国家间,这可能与不同的饲养管理方式有关。对蜜蜂种类或品种的区域性偏好及不同蜂种间抗逆性的区别,表现出病毒病流行与危害的地理差异。基于以上原因,地区和国界的蜜蜂病毒病检测和鉴定模式仍是一种重要的控制手段。

7.2 蜜蜂病毒病的危害控制

蜜蜂病毒是一种终极的病原物,以低浓度隐性感染的方式长期广泛地存在于蜂群中。可被多种外界压力激活,快速增殖,表现症状,造成疾病暴发与流行。因此最有效的预防措施就是消除蜂群的(生物或非生物)压力,保持蜂群健康。即在生产实践中保证蜂群有优质足量的食物(如丰富的蜜粉源和适当的放蜂密度),尽量减少对蜂群的干扰(如搬运和长时间的开箱检查),选择向阳背风的环境安置蜂群。在日常管理中应根据蜂群发展情况适时增减巢脾,做到蜂脾相称,利于蜂群内温度调节。以下是几种有效预防蜜蜂病毒病的生产管理措施:

7.2.1 定期清洁和消毒 多种蜜蜂病毒可以利用蜜蜂体表寄生虫(*Varroa mite* 和 *Tropilaelaps mite*)或蜜蜂肠道寄生虫(*Nosema apis* 和 *Nosema*

cerana)共同侵害蜜蜂。通过积极的管理手段降低蜜蜂寄生虫危害程度可有效抑制病毒病的发生。虽然许多蜜蜂害虫或蜂巢寄生虫(蜂巢小甲虫、蜡螟、蚂蚁、黄蜂、熊蜂等)被证实或可能是蜜蜂病毒的替代寄主,但单向的传播方式,使得蜜蜂病毒不会通过这一途径对蜂群造成直接损害。但是由于受到这些害虫侵扰,受害蜂群衰弱,成为易感蜂群,被自身所带或外部来源病毒进一步感染,成为传染源。另外被病毒污染的养蜂机具也是一个重要的交叉传播途径。所以定期进行蜂场和养蜂用具消毒,可抑制害虫滋生,有效切断包括蜜蜂病毒在内的多种病原物的传播途径。X射线和 γ 射线也可有效灭活蜜蜂病毒,但受设备和操作条件的限制,无法广泛运用。实践证明10%的漂白剂水溶液浸泡处理被污染机具和巢脾可有效杀灭和降解包括病毒在内的多种病原物,此外因注意沸水和75%的酒精消毒处理对RNA蜜蜂病毒无效。

7.2.2 适时更换巢脾 蜜蜂病毒被检测出广泛存在于蜂群生活的蜂箱内,如蜂蜡、蜂箱内壁、蜂蜜和蜂粮中,特别是由花粉经蜜蜂加工而成的蜂粮内常常含有大量的病毒颗粒。尽管这些带毒物品的危险性还未得到确认,但是对其他蜜蜂传染性病原体 and 杀虫剂富集的老巢脾实行5年更新一次的管理措施是必要的。进行更新处理时,建议整箱同时更新,而不是单独多次更新,这样才能避免洁净的新巢脾被再次污染。

7.2.3 饲养强群 强群势蜂群意味着健康的蜂王和工蜂,相比弱小蜂群,有着更强的免疫力和抗病性。近期的对DWV浓度年周监测数据显示,弱群蜜蜂DWV浓度的季节性波动明显高于强群蜜蜂,同时还证明强群蜂群对蜂螨病毒综合症有更强的抗性表现为对寄生蜂螨的忍受力和对DWV浓度的抑制程度明显高于弱小蜂群(Prisco *et al.*, 2011),这一结论证明强群蜜蜂对于外界压力有着更广泛的适应性,并进一步验证了生产实践中采取的合并弱群,维持强群以获得丰产的经验性管理措施。

7.2.4 治疗 传统意义上,病毒病不像其他细菌病和寄生虫病一样有真正的治疗方法。但是随着分子生物学在这一领域的发展,正不断发现具有抗病毒特性的物质,特别在医学和兽医学领域,这些抗病毒剂的治疗作用已得到承认。由于蜜蜂病

毒学在这一研究领域的滞后,基于 RNA 干扰 (RNA interference) 理论的抗病毒试剂的研发还处于实验室阶段,这一治疗手段的效果还有待证实。同时根据蜜蜂寄生螨与蜜蜂病毒病间的高度相关,利用蜂群断子期,适时进行蜂螨防治也可抑制病毒病的发生。

7.2.5 育种 蜂种选育技术正日趋成熟,运用高速发展的谱系分析和分子定位技术确定和筛选理想性状,包括蜂种的抗病性和蜜蜂清洁行为基因,特别是抑制瓦螨繁殖和敏感的瓦螨清理行为的基因已被确定并纳入育种计划。自然的抗螨和抗病毒基因的表达正从自然选择和地方蜂种保护性分析 2 个方面进行研究。尽管蜜蜂的抗病毒品种选育并未被包括在这项选育计划中,但是相关的研究项目正在筹划中。

8 研究方向和发展趋势

全球范围的授粉昆虫和饲养蜜蜂种群数量的持续下降,引发广范围的对授粉危机后果的关注和思考。虽然栖息地的丧失和破碎是导致野生授粉昆虫丧失的主要原因,但对于人工饲养蜜蜂蜂群的威胁则来自蜜蜂病敌害大面积流行。近年来,蜂螨综合症现已成为导致西方蜜蜂种群下降的首要因素,蜜蜂病毒通过瓦螨这一媒介以一个新的传播途径在世界范围流行。虽然近 10 年来蜜蜂病毒学的研究得到了飞速发展,但是在病毒传播动力学、发病机制、流行病学和寄主免疫学方面的知识仍然缺乏。

为此,建立国际和地区合作机制,以共同研究蜜蜂及授粉昆虫消亡问题显得尤为重要。如欧盟于 2008 年成立的 COLOSS (Honey Bee Colony Losses) 组织,联合 52 个国家共 212 个成员单位,涵盖从科研机构的科学家、私营蜂场的蜜蜂饲养员到大型蜂业公司的技术员,共同致力于从蜜蜂个体和群体水平解释蜜蜂种群下降的原因。近年来,中国也建成了蜜蜂产业科技服务体系,以求在行业科学家的指导下,联合各地科研机构、养蜂管理部门、蜂业公司和蜂农,从蜜蜂饲养、蜜蜂营养、蜜蜂育种、蜜蜂病敌害及蜂产品生产全方位调整我国蜜蜂产业结构,解决历史遗留问题,健全蜜蜂疾病监测预报体系,完成从养蜂大国到养蜂强国的转变。同时积极参与国际合作,加强基础研究,以求在蜜蜂科学的热点领域做出贡献。

随着新的分子检测技术的发展,蜂群微生物的分析鉴定从单个物种扩大到更加复杂蜂群微生物群落,毫无疑问地将会有更多的蜜蜂病毒被发现。蜜蜂病毒的多样性并不意外,当使用宏基因组分析技术对某一生态系统进行全面研究时,如正在进行的萨拉戈萨海洋计划 (Venter *et al.*, 2004) 和近来刚完成的蜂群崩溃症病因调查 (Cox-Foster *et al.*, 2007) 向我们展示了令人惊讶的病毒多样性。通过大规模的基因序列分析,发现在生物体和生态系统中有远比以前预计要丰富的病毒生物多样性,虽然数据包括了部分的非致病性和潜隐性病毒,但多数病毒均发现对寄主有致病性。这种病毒在生物进化中发挥重要作用的观点已被广泛地接受,它为不同种生物体提供了一种遗传信息水平交流的途径。使得科学家开始重新评估高等级生物体内无致病性病毒的功能和作用。一些病毒可与寄主形成互利共生关系,例如与一些寄生蜂共生的病毒可以帮助其在寄主体内产下的卵和孵化的幼虫避开寄主的免疫机制。多数的蜜蜂病毒会对蜂群造成严重危害,同时也被看作是一类应激性病毒,具有在一定环境压力刺激下才表现致病性的特性。蜜蜂病毒病研究的一个挑战性的工作就是揭示二者间如何相互作用,这一研究已在瓦螨与数种病毒联合侵染蜜蜂的实验中取得进展。另一个重要工作是综合蜂群群势、群内寄生虫状况、食料丰盈程度和蜜蜂病毒浓度等参数,对病毒病的流行与危害进行预测。已发现秋季越冬蜂较高的 DWV 或 ABPV 负载量会引发严重的冬季蜜蜂损失,但染病工蜂的分子和生理学机制,包括病毒病理学规律仍待了解。基于蜜蜂及其病原体基因组的研究进展,RNAi 技术开始运用于蜜蜂病毒病的防治。而对田间病毒病的快速诊断工具的需求,也得到充分重视并已进入商业化开发应用阶段。

致谢: 本文的完成得益于现代农业(蜜蜂)产业技术体系建设专项基金(CARS-45-ksj14)和美国农业部 CAP 基金(2009-85118-05718)的资助。

参考文献(References)

Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA, 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review

- and synthesis through a meta-analysis. *Ecol. Lett.*, 9(8): 968—980.
- Ai HX, Yan X, Han RC, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invert. Pathol.*, 109(1):160—164.
- Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM, 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Curr. Biol.*, 18(20):1572—1575.
- Allen M, Ball B, 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77(3):141—162.
- Allen M, Ball B, White RF, Antoniw JF, 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J. Apic. Res.*, 25(2): 100—105.
- Anderson DL, Gibbs AJ, 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* L.) in Australia. *J. Gen. Virol.*, 69: 1617—1625.
- Anderson DL, 1991. Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am. Bee J.*, 131(12):767—770.
- Ashman TL, Knight TM, Steets JA, Amarasekare P, Burd M, Campbell D, Dudash MR, Johnston MO, Mazer SJ, Mitchell RJ, Morgen MT, Wilson WG, 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85(9):2408—2421.
- Bailey L, Ball BV, 1991. Honey Bee Pathology (2nd ed.). Academic Press, London. 193.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN, 1983a. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.*, 103(1):13—20.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN, 1983b. Honeybee paralysis: Its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. *J. Apic. Res.*, 22(3):191—195.
- Bailey L, Carpenter JM, Woods RD, 1979. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.*, 43(3):641—647.
- Bailey L, Fernando EFW, 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey bees. *Ann. Appl. Biol.*, 72(1):27—35.
- Bailey L, Gibbs AJ, 1964b. Acute infection of bees with paralysis virus. *J. Insect. Pathol.*, 6(4):395—407.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964a. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21: 390—395.
- Bailey L, Woods RD, 1974. Three previously undescribed viruses from the honeybee. *J. Gen. Virol.*, 25(2):175—186.
- Bailey L, Woods RD, 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J. Gen. Virol.*, 37:175—182.
- Bakonyi T, Farkas R, Szendroi A, Dobos-Kovacs M, Rusvai M, 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: Rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, 33(1):63—74.
- Ball BV, Overton HA, Buck KW, Bailey L, Perry JN, 1985. Relationships between the multiplication of chronic bee-paralysis virus and its associate particle. *J. Gen. Virol.*, 66(7):1423—1429.
- Ball BV, 1989. *Varroa jacobsoni* as a virus vector // Cavalloro R (ed.). Present Status of Varroaosis in Europe and Progress in the Varroa Mite Control. E. E. C.; Luxemburg. 241—244.
- Ball BV, Allen MF, 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.*, 113(2):237—244.
- Ball BV, Bailey L, 1997. Viruses // Morse RA, Flottum K (eds.). Honey Bee Pest, Predators, Diseases. The A. I. Root Co., Medina, OH. 11—31.
- Boecking O, Genersch E, 2008. Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. *J. Verbr. Lebensm.*, 3(2):221—228.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1999. The transmission of deformed wing virus between honey bees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invert. Pathol.*, 73(1):101—106.
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW, Cramer JRA, 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS ONE*, 5(10):e13181.
- Camazine SM, Liu TP, 1998. A putative Iridovirus from the honey bee mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invert. Pathol.*, 71(2):177—178.
- Carreck NL, Bell BV, Martin SJ, 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.*, 49(1):93—94.
- Celle O, Blanchard P, Schurr F, Olivier V, Cougoule N, Faucon JP, Ribière M, 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replication RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus*

- Res.*, 133 (2) :280—284.
- Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M, 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invert. Pathol.*, 91 (1) :69—73.
- Chen YP, Nakashima N, Christian P, Bonning BC, Valles SM, Lightner D, 2010a. Iflaviridae // King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds.). *Virus Taxonomy* 9th. Elsevier Academic Press. 846—849.
- Chen YP, Nakashima N, Christian P, Bonning BC, Valles SM, Lightner D, 2010b. Dicistroviridae virus // King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds.). *Virus Taxonomy* 9th. Elsevier Academic Press. 840—845.
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF, 2006. Prevalence and transmission of honey bee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (1) :606—611.
- Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF, 2004. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35 :441—448.
- Chen YP, Siede R, 2007. Honey Bee Viruses. *Adv. Virus Res.*, 70 :33—80.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes E, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318 (5848) :283—287.
- Dainat B, Tan K, Berthoud H, Neumann P, 2009. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of honeybee viruses. *Insect Soc.*, 56 (1) :40—43.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD, 2000. Wildlife ecology-emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science*, 287 (5452) :443—449.
- De Jong D, 1997. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. // Morse RA, Flottum K (eds.). *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*. A. I. Root Company, Medina, USA. 200—218.
- De Jong D, De Jong PH, Goncalves LS, 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.*, 21 (3) :165—167.
- De Miranda JR, Genersch E, 2010c. Deformed wing virus. *J. Invert. Pathol.*, 103 :S48—S61.
- De Miranda JR, Cordon G, Budge G, 2010a. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invert. Pathol.*, 103 (Suppl. 1) :S30—S47.
- De Miranda JR, Dainat B, Locke B, Cordon G, Berthoud H, Gauthier L, Neumann P, Budge GE, Ball BV, Stoltz DB, 2010b. Genetic characterisation of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Gen. Virol.*, 91 (Pt10) :2524—2530.
- De Miranda JR, Drebot M, Tylor S, Shen M, Cameron CE, Stolz DB, Camazine SM, 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.*, 85 (Pt8) :2263—2270.
- De Miranda JR, Fries I, 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Invert. Pathol.*, 98 (2) :184—189.
- Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86 (4) :88—101.
- Eyer M, Chen YP, Schäfer MO, Pettis J, Neumann P, 2009. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie*, 40 :419—428.
- Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, de Miranda JR, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2006. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virol. J.*, 3 (1) :e16.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. Potential Effect of Climate Change on Crop Pollination. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>.
- Forsgren E, de Miranda JR, Isaksson M, Wei S, Fries I, 2009. Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.*, 47 (2) :87—97.
- Fries I, Camazine S, 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32 :199—214.
- Gallai N, Salles JM, Setteled J, Vaissierea BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.*, 68 (3) :810—821.
- Gauthier L, Ravallec M, Tournaire M, Cousserans F, Bergoin M, Dainat B, De Miranda JR, 2011. Viruses associate with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS Pathogens*, 6 (1) :e16217. doi:10.1371/journal.pone.0016217.
- Gauthier L, Tentcheva D, Tournaire M, Dainat B, Cousserans

- F, Colin ME, and Bergoin M, 2007. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, 38:426—436.
- Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P, 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41:332—352.
- Genersch E, Yue C, Ingemar F, De Mirandac JR, 2006. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J. Invert. Pathol.*, 91(1):61—63.
- Ghazoul J, 2005. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends Ecol. Evol.*, 20(7):367—373.
- Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: An insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.*, 80(Pt6):1541—1540.
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E, 2009. Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 90(2):463—467.
- Govan VA, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, 277(2):457—463.
- Hails RS, Ball BV, Genersch E, 2008. Infection strategies of insect viruses // Aubert MFA, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I (eds.). *Virology and the Honey Bee*. European Commission. 255—276.
- Higes M, Martín-Hernandez R, Botias C, Bailon EG, Gonzales-Porto A, Barrios L, Del Nozal MJ, Palencia PG, Meana A, 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.*, 10(10):2659—2669.
- Jaffe R, Dietemann V, Allsopp MH, Costa C, Crewe RM, Dall'olio5 R, Larua PD, El-niweiri MAA, Fries I, Kezic N, Meusel MS, Paxton RJ, Shaibi T, Stolle E, Moritz RFA, 2010. Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses. *Conserv. Biol.*, 24(2):583—593.
- Katsuma, S, Tanaka S, Omuro N, Takabuchi L, Daimon T, Imanishi S, Yamashita S, Iwanaga M, Mita K, Maeda S, Kobayashi M, Shimada T, 2005. Novel macula-like virus identified in *Bombyx mori* cultured cells. *J. Virol.*, 79(9):5577—5584.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ, 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invert. Pathol.*, 96(1):1—10.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.*, 274(1608):303—313.
- Kleinhenz M, Bujok B, Fuchs S, Tautz J, 2003. Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *J. Exp. Biol.*, 206:4217—4231.
- Koeniger N, 1978. The warming of honeybee (*Apis mellifera* L.) brood. *Apidologie*, 9:305—320.
- Kovac H, Crailsheim K, 1988. Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *J. Apic. Res.*, 27(4):230—238.
- Kraus B, Page RE, 1995. Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in California. *Environ. Entomol.*, 24(6):1473—1480.
- Kulincevic J, Ball BV, Mladjan V, 1990. Viruses in honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*: first findings in Yugoslavia. *Acta Vet.*, 40(1):37—42.
- Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camazine SM, Rossi C, 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.*, 80(10):4998—5009.
- Le Gall O, Christia P, Fauquet CM, King AMQ, Knowles J, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya A, 2008. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch. Virol.*, 153(4):715—727.
- Leat N, Ball B, Govan V, Davison S, 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen Virol.*, 81(Pt8):2111—2119.
- Li JL, Peng WJ, Wu J, Strange JP, Boncristiani B, Chen YP, 2011. Cross-species infection of deformed wing virus poses a new threat to pollinator conservation. *J. Econ. Entomol.*, 104(3):732—739.
- Lommel SA, Morris TJ, Pinnock DE, 1985. Characterization

- of nucleic acids associated with Arkansas bee virus. *Intervirology*, 23 (4) :199—207.
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.*, 88 (Pt12) :3428—3438.
- Martin SJ, Ball BV, Carreck NL, 2010. Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bees (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apic. Res.*, 49 (1) :72—79.
- McMullan JB, Brown MJF, 2005. Brood pupation temperature affects the susceptibility of honeybees (*Apis mellifera*) to infestation by tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Apidologie*, 36 :97—105.
- Moritz RFA, Kraus FB, Kryger P, Crewe RM, 2007. The size of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) and its implications for the conservation of honeybees. *J. Insect Conserv.*, 11 (4) :391—397.
- NAS, 2006. Status of Pollinators in North America. Washington DC The National Academies Press. 317.
- Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P, 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39 :310—314.
- Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Olivier C, Dubois E, Tordo N, Thiery R, Houlgatte R, Ribiere M, 2008. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res.*, 132 (1/2) :59—68.
- Ongus JR, Peters D, Bonmati JM, Bengsch E, Vlak JM, Van Oers MM, 2004. Complete sequence of a picoran-like virus of the genus Iflavivirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.*, 85 (Pt12) :3747—3755.
- Pedersen A, Altizer S, Poss M, Cunningham AA, Nunn C, 2005. Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *Int. J. Parasitol.*, 35 (6) :647—657.
- Peng WJ, Li JL, Boncristiani B, Strange JP, Hamilton M, Chen YP, 2011. Host range expansion of honey bee black queen cell virus in the bumble bee, *Bombus huntii*. *Apidologie*, 42 :650—658.
- Potts SG, Roberts SPM, Dean R, Marris G, Brown M, Jones R, Settele J, 2009. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe? *J. Apic. Res.*, 49 (1) :15—22.
- Prisco GD, Zhang X, Pennacchio F, Caprio E, Li J, Evans JD, Grandi-Hoffman GD, Hamilton M, Chen YP, 2011. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses*, 3 (12) :2425—2441.
- Raffiudin R, Crozier RH, 2006. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43 (2) :543—552.
- Ratnieke FLW, Carreck NL, 2010. Clarity on honey bee collapse? *Science*, 327 (5962) :152—153.
- Ribiere M, Ball BV, Aubert M, 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses // Aubert M, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, Bernardinelli I (eds.). *Virology, and the Honey Bee*. European Communities, Luxembourg. 15—84.
- Ribiere M, Olivier V, Blanchard P, 2010. Chronic bee paralysis virus: A disease and a virus like no other? *J. Invert. Pathol.*, 103 (Suppl. 1) :S120—S131.
- Richard JS, Lisa CH, 2009. Honey bee colony collapse disorder is possibly caused by a dietary pyrethrum deficiency. *Bioscience Hypotheses*, 2 (6) :439—440.
- Ricketts TH, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Bogdanski A, Gemmill-Herren S, Greenleaf S, Klein AM, Mayfield MM, Morandin LA, Ochieng A, Viana BF, 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.*, 11 (5) :499—515.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G, 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu. Rev. Entomol.*, 45 :519—548.
- Santillan-Galicia MT, Ball B, Clark SJ, Alderson PG, 2010. Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.*, 49 (2) :141—148.
- Shen MQ, Yang XL, Cox-Foster D, and Cui LW, 2005. The role of *Varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *J. Gen. Virol.*, 342 (1) :141—149.
- Shimanuki H, Calderone NW, Knox DA, 1994. Parasitic mite syndrome: The symptoms. *Am. Bee J.*, 134 :827—828.
- Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, vanEngelsdorp D, Lipkin WI, dePamphilis CW, Toth AL, Cox-Foster DL, 2010. RNA Viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE*, 5 (12) :e14357. doi: 10.1371/journal.pone.0014357.

- Sitaropoulou N, Neophytou EP, Thomopoulos GN, 1989. Structure of the nucleocapsid of a filamentous virus of the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.*, 53 (3) : 354—357.
- Stephen FP, Robert WC, 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31:387—409.
- Stout JC, Morales CL, 2009. Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40:388—409.
- Tentcheva D, Gauthier L, Bagny L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12) :7185—7191.
- Tentcheva D, Gauthier L, Bagny L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37:41—50.
- Todd JH, De Mirandab JR, Ball BV, 2007. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38:354—367.
- van Engelsdorp D, Hayes JJ, Underwood RM, Pettis JS, 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J. Apic. Res.*, 49(1) :7—14.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y, Smith HO, 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304 (5667) :66—74.
- White GF, 1913. Sacbrood, a Disease of Bees. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology. Circular No. 169.
- Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S, 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 11 (12) :1842—1847.
- Woolhouse MJ, Taylor LH, Haydon DT, 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science*, 292 (5519) : 1109—1112.
- Yang X, Cox-Foster DL, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 102(21) :7470—7475.
- Yue C, Genersch E, 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 86 (Pt12) :3419—3424.
- Yue C, Schroder M, Bienefeld K, Genersch E, 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invert. Pathol.*, 92(2) :105—108.
- Yue C, Schroder M, Gisder S, Genersch E, 2007. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.*, 88 (Pt8) :2329—2336.
- Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP, 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *J. Invert. Pathol.*, 109(1) :156—159.
- 刁青云, 吴杰, 姜秋玲, 谢文闻, 2008. 中国蜂业现状及存在问题. 世界农业, (10) :59—61.