



感染蜜蜂的两种微孢子虫—— *Nosema apis* 和 *Nosema ceranae**

许瑛瑛** 王 帅 张迎迎 卢媛媛 胡福良 郑火青***

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘 要 孢子虫病是西方蜜蜂的主要病害之一,其病原包括蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*。自 2006 年首次在西方蜜蜂体内发现 *N. ceranae* 以来,关于 *N. ceranae* 的研究成为热点,其中感染蜜蜂的两种微孢子虫的比较是关注的焦点。本文主要综述近十多年来发表的相关文献,从流行性、形态、基因组、毒力等角度对这两种微孢子虫进行比较,并对后续研究进行展望,以期对微孢子虫的研究及蜜蜂孢子虫病的防治提供借鉴。

关键词 蜜蜂微孢子虫, 东方蜜蜂微孢子虫, 西方蜜蜂, 东方蜜蜂

The two microsporidian species infecting honeybees: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*

XU Ying-Ying** WANG Shuai ZHANG Ying-Ying LU Yuan-Yuan
HU Fu-Liang ZHENG Huo-Qing***

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Nosemosis, which is caused by two microsporidian species, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, is a major disease of the honeybee *Apis mellifera*. Numerous studies have been conducted on *N. ceranae* since its first discovery in *A. mellifera* in 2006. One of the most popular research topics in this area is the comparison of *N. apis* and *N. ceranae*. This paper reviews literature published in the last ten years with the aim of providing a comprehensive review of comparative studies of these species, including their prevalence, morphology, genomes and virulence. Future research topics in this area are also discussed. This review provides an important reference for the study of microsporidia and the prevention and treatment of nosemosis.

Key words *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Apis mellifera*, *Apis cerana*

微孢子虫是一种专性胞内寄生的真菌,其寄主分布十分广泛。自 1857 年 Nägeli 在家蚕肠道中发现家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 以来,人们陆续发现了多种能够在其他动物体内寄生的微孢子虫,如感染鱼类的异状格留虫 *Glugea anomala*、感染哺乳动物的兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi* 和能够在艾滋病人体内

繁殖的赫勒姆脑炎微孢子虫 *Enterocytozoon bieneusi* 等。微孢子虫对昆虫的感染较为普遍,而在蜜蜂和家蚕等经济昆虫上的影响尤为严重。蜜蜂孢子虫病是一种慢性的传染性疾病,其病原体为蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*。

微孢子虫通过感染成年蜜蜂中肠的上皮细

*资助项目 Supported projects: 浙江省公益性技术应用研究项目 (2014C32060)

**第一作者 First author, E-mail: tameness@zju.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hqzheng@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-06-07, 接受日期 Accepted: 2017-10-22

胞 (Forsgren and Fries, 2010), 致使肠道的完整性被破坏, 消化系统出现紊乱 (Higes *et al.*, 2007); 由此引发一系列非正常现象: 工蜂提早出巢飞行 (Goblirsch *et al.*, 2013)、加速蜜蜂行为多态性的发展即老年蜂行为的提早出现 (早衰) (Lecocq *et al.*, 2016)、饲喂幼虫能力下降 (Kang *et al.*, 1976)、寿命缩短 (Chen *et al.*, 2013) 和越冬死亡率提高 (Botias *et al.*, 2013) 等, 造成蜂群生产力、繁殖力及存活力降低 (Botias *et al.*, 2013)。感染严重的蜜蜂个体甚至会出现下痢的症状, 在巢门口附近或者巢门内排便, 导致微孢子虫在群内大量传播, 最终造成蜂群死亡。同时, 针对该病的不合理用药导致蜂产品药物残留问题, 对养蜂效益和蜂产品质量安全造成很大影响。

1 *N. apis* 和 *N. ceranae* 的发现与分布

1.1 *N. apis* 和 *N. ceranae* 的发现

1909 年, 德国科学家 Zander 首次在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 体内发现一种微孢子虫, 并命名为 *Nosema apis*, 即蜜蜂微孢子虫 (Zander, 1909)。最初, *N. apis* 在全球范围内都有分布, 但由于在热带和亚热带的研究表明 *N. apis* 对蜂群健康的影响有限, 因而起初并没有引起关注。自从温带地区的研究表明, *N. apis* 能够明显降低蜂群的生产力, 降低蜂王的产卵量和蜂群的越冬成功率, *N. apis* 才开始被作为蜜蜂的重要病原微生物得到关注 (Fries, 1993)。此后的很长一段时间, 人们都以为影响蜜蜂的微孢子虫只有 *N. apis* 一种, 直到 1996 年, Fries 等 (1996) 从北京的东方蜜蜂 *Apis cerana* 肠道中发现了一种新的微孢子虫, 即东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*。2006 年和 2007 年, 国际上两个研究团队分别报道了在西班牙和我国台湾的西方蜜蜂体上发现 *N. ceranae* 的研究结果 (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007), 这些结果使人们对微孢子虫和蜜蜂的寄生关系有了新的认识, 引起了极大反响。

2006 年正值美国蜂群暴发蜂群崩溃综合症

(Colony collapse disorder, CCD) 之际, 由于在发病蜂群中发现了大量 *N. ceranae* 的感染, 使得人们将 *N. ceranae* 列为了重点致病因素进行研究。但很快就有报道表明, 早在 1995 年的美国蜜蜂样本中, 已有 *N. ceranae* 的感染 (Chen *et al.*, 2008)。几乎同时, Paxton 等 (2007) 研究发现, *N. ceranae* 入侵芬兰西方蜜蜂的时间最早可追溯到 1998 年。Botias 等 (2012b) 对 1988 至 2009 年间的西班牙蜂蜜样品进行微孢子虫检测, 发现自 2000 年之后的蜂蜜样品都存在 *N. ceranae* 的污染, 而且污染程度不断上升并已达到稳定阶段, 而在所有样品中 *N. apis* 的污染则几乎不存在。该结果表明早在 2000 年左右, *N. ceranae* 可能已经是感染西班牙蜂群的主要微孢子虫种类。进一步的研究表明, 在 1979 年取样的一只巴西非洲化蜜蜂的雄蜂样本体内同时存在 *N. ceranae* 和 *N. apis*, 说明早在 20 世纪 70 年代, *N. ceranae* 就已经传播至南美州 (Teixeira *et al.*, 2013)。对匈牙利的历史样本进行分析表明, 匈牙利至少在 2004 年就已经有 *N. ceranae* 的感染 (Csaki *et al.*, 2015)。墨西哥的调查表明, 至少 1995 年开始就有 *N. ceranae* 的寄生 (Guerrero-Molina *et al.*, 2016)。因此, 尽管 *N. ceranae* 在 1996 年才在东方蜜蜂身上被发现, 但已有的证据表明 *N. ceranae* 开始感染西方蜜蜂的时间要远早于此。所以, 事实上 *N. ceranae* 的原始宿主的确认及 *N. ceranae* 的传播历史是非常值得探讨的问题。

1.2 *N. apis* 和 *N. ceranae* 的分布特征

关于感染蜜蜂的微孢子虫的研究, 另一个焦点问题是 *N. ceranae* 和 *N. apis* 在区域分布上的特点。刘锋等 (2008) 对我国主要养蜂地区蜜蜂的微孢子虫的种类进行鉴定, 只检测到 *N. ceranae*, 而张建燕等 (2015) 的调查在山东寿光的样品中检测出 *N. apis*, 其他所有样品均只检测出 *N. ceranae*。这一结果和之前在其他温带气候地区的调查结果类似——*N. ceranae* 已经在温带气候地区成为感染蜜蜂的主要甚至是唯一的微孢子虫种 (Chen *et al.*, 2008)。例如, 针对土

耳其 2011-2012 年的 11 个取样点 99 个蜂场的样本研究则只检测到了 *N. ceranae* 而没有 *N. apis*, 说明在土耳其 *N. ceranae* 可能已经取代了 *N. apis* (Tunca *et al.*, 2016)。在匈牙利, 在 *N. ceranae* 和 *N. apis* 共感染的样品中, *N. ceranae* 的感染水平都要显著高于 *N. apis* (Csaki *et al.*, 2015)。而在瑞典连续 5 年的调查都表明 *N. apis* 是感染瑞典蜜蜂主要的微孢子虫种 (Forsgren and Fries, 2013)。因而有观点认为, 在温暖气候条件下 *N. ceranae* 比 *N. apis* 更有竞争力, *N. apis* 则对寒冷气候有更强的适应性。但在加拿大的调查表明, *N. ceranae* 是主要分布的种, 混合感染的蜜蜂体内孢子数最高, 而在单一感染的蜜蜂中, 感染 *N. ceranae* 的蜜蜂体内孢子数是感染 *N. apis* 的蜜蜂体内孢子数的 3-5 倍, 说明在类似于加拿大的寒冷环境中 *N. ceranae* 可能也已经比 *N. apis* 有更高的适应性和毒力 (Emsen *et al.*, 2016)。阿根廷中北部 59 家蜂场 361 群蜂的样本研究表明, *N. ceranae* 的单一感染在各地区都有存在, 而 *N. apis* 的单一感染只在亚热带地区存在, 两种微孢子虫的共感染则更多地出现在温带地区 (Pacini *et al.*, 2016)。这些结果使人们认识到, *N. ceranae* 和 *N. apis* 对气候的适应性并不如之前想象得那么简单。

2 *N. ceranae* 和 *N. apis* 的比较研究

隶属于微孢子虫属的微孢子虫结构相似, 它们都具有真核生物的核糖体 RNA, 但缺乏单独的 5.8S rRNA (Franzen, 2004), 其内含有发达的极膜层结构 (Polaroplast) 和非典型的高尔基体 (Atypical Golgi apparatus), 但没有线粒体。细胞壁共分为三层, 其内极管、锚状盘和后极泡组成了孢子的发芽装置, 使得孢子能将其内容物注射入寄主细胞 (Keohane and Weiss, 1999)。微孢子虫侵染寄主的方式都十分相似, 基本分为三个阶段: 成熟孢子的寄生、裂殖期复制和孢子的形成 (Schottelius *et al.*, 2000)。感染蜜蜂的两种微孢子虫 *N. ceranae* 和 *N. apis* 虽然归于同一属, 但两者之间仍然存在着不少差异。

2.1 形态和基因组

在显微镜下, *N. ceranae* 和 *N. apis* 孢子结构相似, 但略有差异。成熟 *N. ceranae* 的孢子长轴长为 3.6-5.5 μm , 短轴长为 2.3-3.0 μm , 孢壁厚度为 137-183 nm, 其前端较薄, 只有约 36 nm, 有利于极管的弹出。极管在胞内盘绕 20-23 圈, 螺旋倾角为 55°-60°; 而 *N. apis* 较 *N. ceranae* 的长轴约长 1 μm , 极管也更长, 能够在胞内盘绕 30-44 圈 (Fries, 1989; Fries *et al.*, 1996)。

不同的微孢子虫染色体大小不同, 基因组结构也不相同 (刘吉平, 2006)。为了更好地区别两种微孢子虫, 除对比其形态大小以及极丝圈数等超微结构特征外, 还可以借助二者基因组的比较。*N. apis* 基因组大小 8.5 Mb, 而 *N. ceranae* 基因组较小, 只有 7.86 Mb, 但在整个基因组中, *N. apis* 的 GC 含量 (18.78%) 比 *N. ceranae* (25%) 低。比较两种微孢子虫的功能保守和蛋白序列的差异, 可以发现 *N. apis* 在复制、非生物刺激等过程中参与的基因较多, 而 *N. ceranae* 在代谢、应激反应、蛋白运输等过程中有更多的基因参与 (Chen *et al.*, 2009b, 2013)。Chen 等 (2009a) 基于 SSUrRNA 构建进化树, 分析不同微孢子虫的进化关系, 发现 *N. ceranae* 与胡蜂微孢子虫 (*Nosema vespula*) 的亲缘关系最近 (97.5%), 与家蚕微孢子虫 (*Nosema bombi*) 的亲缘关系最远 (19.3%), 而 *N. apis* 与 *N. bombi* 亲缘关系最近。由此可知, *N. apis* 与 *N. ceranae* 在基因组层面存在显著差异。

2.2 感染组织、传播方式及受感染蜂群的症状

Copley 和 Jabaji (2012) 研究发现 *N. ceranae* 和 *N. apis* 都能侵染工蜂的中肠、唾液腺、咽下腺、上颚腺和毒囊; 此外, 其他研究中发现 *N. ceranae* 还存在于马氏管和脂肪体 (Chen *et al.*, 2009b) 以及蜂王的头部、胸部、卵巢和受精囊 (Traver and Fell, 2012) 中, 表明 *N. ceranae* 的感染范围可能比 *N. apis* 更广。

N. apis 和 *N. ceranae* 都可以通过蜂机具、食物、盗蜂、迷巢蜂和蜜蜂交哺行为 (Higes *et al.*, 2010) 等水平传播途径 (汪方玮和鲁兴萌, 2003)

在蜂群内不同个体间传播,但两者存在一定的区别。与 *N. ceranae* 不同,*N. apis* 的严重感染会伴随蜜蜂下痢的症状 (Chen *et al.*, 2013),这些排泄物携带有大量的成熟孢子,对蜂机具和饲料会造成严重污染,极大地促进 *N. apis* 的水平传播。此外,最新研究表明,雄蜂精液也会携带 *N. ceranae* 和 *N. apis* 孢子,而且通过人工授精的方式,精液中的孢子可以传播给蜂王,也就是说这两种微孢子虫可能可以通过蜂王和雄蜂交配的途径完成水平传播 (Roberts *et al.*, 2015)。

严重感染 *N. apis* 的蜂群由于患有下痢,可以在巢门附近观察到大量排泄物的存在,并伴有爬行甚至死蜂的现象;而感染了 *N. ceranae* 的蜂群并无显著外部表现症状,但经过一段时间后会造造成蜂群群势逐渐下降,最终导致蜂群崩溃 (Higes *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013)。

2.3 毒力

关于 *N. ceranae* 和 *N. apis* 对西方蜜蜂的毒力差异,目前结论不一。

Paxton 等 (2007) 通过一系列研究指出,感染西方蜜蜂的 *N. ceranae* 相比 *N. apis* 具有更高的毒力。同样,Williams 等 (2014) 分别使用 *N. apis*、*N. ceranae* 和两种微孢子虫混合物接种西方蜜蜂工蜂并统计死亡率,结果发现 *N. ceranae* 的致死率更高,且死亡的工蜂体内含有数量更多的孢子,接种混合孢子的工蜂死亡率介于单独接种 *N. apis* 或 *N. ceranae* 的工蜂之间。Huang 等 (2015) 参考农药毒性研究的半数致死剂量 LD_{50} 和半数致死浓度 LC_{50} , 使用了鉴定孢子毒力的另一种方法:半数感染量 ID_{50} , 即感染一半数量蜜蜂时的孢子接种量。在不同种孢子的毒力比较实验中,他们得出与 Paxton 等 (2007) 完全相反的结论——*N. ceranae* 的 ID_{50} 值较 *N. apis* 的显著更高,所导致的死亡率更低,即 *N. ceranae* 的感染能力更弱,毒力也更弱。

关于两种微孢子虫毒力的研究结论不一致,其原因可能在于实验方法的差异,也可能是在于不同研究所用的微孢子虫或者蜜蜂本身的差异 (Fontbonne *et al.*, 2013)。研究表明,实验所用

蜜蜂的日龄选择颇为重要,刚出房的蜜蜂接种 *N. ceranae*, 死亡率远高于未接种的蜜蜂 (Higes *et al.*, 2007); 而平均在 15 日龄左右的蜜蜂接种 *N. ceranae* 后,死亡率却很低 (Forsgren and Fries, 2010)。再者,微孢子虫接种液的配制,其来源、纯化方法和储存条件都直接影响微孢子虫的活力和感染力,最终影响实验蜜蜂的死亡率 (Fenoy *et al.*, 2009)。此外,地理差异带来的寄主与病原的相互适应性或是寄主在不同季节的易感性都有可能导致研究结论不一 (Natsopoulou *et al.*, 2015)。在西班牙的研究表明,*N. ceranae* 感染力远高于 *N. apis*, 并且其与蜂群群势下降有直接的关系 (Fernandez *et al.*, 2012); 而在德国,两种孢子共同感染时,表现出相似的感染力 (Gisder *et al.*, 2010; Natsopoulou *et al.*, 2015), 并与蜂群群势的下降无直接的关系。这说明欧洲地区的 *N. ceranae* 株系的毒力可能存在差异。Pelin 等 (2015) 从全球范围内 8 个相距较远的地理位置采集自然感染 *N. ceranae* 的蜂群样本,发现有些地区的 *N. ceranae* 存在非常高的遗传多样性。

鉴于目前因孢子虫病而造成损失的蜂群中鉴定出来的病原主要是 *N. ceranae*, 人们普遍认为 *N. ceranae* 的危害更大。

3 与其他蜜蜂致病因素的相互作用

蜜蜂常可同时感染多种病原,病原间的协同作用是导致蜜蜂发病的重要因素。例如,大量研究表明,CCD 现象就是由蜜蜂多种病原和环境因素等共同作用引起的。作为一种寄生生物,微孢子虫除了对寄主产生直接危害外,还能通过与其他病原微生物协同作用,对蜜蜂造成更严重的危害。

黑蜂王台病毒 (Black queen cell virus, BQCV) 是一种降低蜂王蛹存活率并广泛传播的病毒,最早认为 *N. apis* 与 BQCV 的出现密切相关 (Bailey *et al.*, 1983)。最新的研究表明,*N. ceranae* 和 BQCV 协同作用会提高蜜蜂个体的死亡率,但协同感染的蜜蜂体内的病毒量和孢子数

与单独感染相比并没有显著差异(Doublet *et al.* , 2015a)。经两种病原同时感染的蜜蜂脑部有 67 个基因出现差异表达,如参与行为和对外界刺激做出应答的基因 *yellow-x1* 和 odorant binding proteins (Doublet *et al.* , 2016)。

蜜蜂慢性麻痹病病毒(Chronic bee paralysis virus, CBPV) 会使受感染的蜜蜂双翅及躯体反常地震颤,不能飞翔,腹部肿胀,进而引发痲疾或死亡(Berenyi *et al.* , 2006; 张炫等, 2012)。对已经注射了 CBPV 的工蜂继续接种 *N. ceranae*,死亡个体中 CBPV 的复制数明显增加,而且同时感染两种病原的蜜蜂的死亡率也明显增加,这表明了 *N. ceranae* 能够与 CBPV 一起协同作用于寄主(Toplak *et al.* , 2013)。

蜜蜂残翅病病毒(Deformed wing virus, DWV) 是感染率最高的蜜蜂病毒(Ryabov *et al.* , 2016), 关于 DWV 和微孢子虫的关系, 结论不一。Costa 等(2011) 的研究表明, 中肠 *N. ceranae* 孢子数量与 DWV 的病毒量呈显著负相关, 二者存在拮抗关系; Doublet 等(2015b) 研究表明, DWV 的存在对 *N. ceranae* 并没有显著的影响, 但蜜蜂感染 *N. ceranae* 后, 体内 DWV 的复制会受到抑制。Martin 等(2013) 对夏威夷蜂群感染 DWV 和 *N. ceranae* 情况的调查研究表明, 两种病原之间并没有显著的相关性。但另一研究表明, 在人工接种条件下, 若蜜蜂蛋白营养缺失且孢子接种浓度达到一定水平 *N. ceranae* 和 DWV 具有协同作用(Zheng *et al.* , 2015)。

除了蜜蜂的病原生物之外, 微孢子虫还能够与外界刺激(如新烟碱类农药) 协同作用。吡虫啉和 *N. ceranae* 协同作用显著提高了受感染蜜蜂的死亡率, 并显著降低了蜜蜂体内葡糖氧化酶的活性(Alaux *et al.* , 2010); 吡虫啉和 *N. ceranae* 共同感染西方蜜蜂蜂王, 会提高抵抗外界刺激和抗氧化相关酶的活性, 同时也会改变与代谢和解毒功能相关酶的活性, 降低受感染蜂王的存活率(Dussaubat *et al.* , 2016)。噻虫啉与 *N. ceranae* 共同感染蜜蜂也会提高蜜蜂死亡率(Doublet *et al.* , 2015a), 不过死亡率的高低可能取决于农药的剂量选择(Retschnig *et al.* , 2014)。在实验

室条件下, 噻虫啉对 *N. ceranae* 的增殖没有抑制作用, 但是免疫组数据显示, 被噻虫啉和 *N. ceranae* 共感染的西方蜜蜂, 其中肠细胞的死亡被显著抑制(Gregorc *et al.* , 2016)。

4 结语

蜜蜂孢子虫病是近年来在国际上造成蜂群大量损失的主要病害之一。得益于近十年来的大量研究, 关于蜜蜂孢子虫病的认识日益加深。但也正由于仅在近十年学者们才开始重点关注这一疾病, 目前仍有很多问题亟待阐明。

(1) 1909 年, Zander 在西方蜜蜂体内发现 *N. apis*; 1996 年 Fries 在东方蜜蜂体内发现 *N. ceranae*。但已有研究表明 *N. ceranae* 开始感染西方蜜蜂的时间要远早于 1996 年。因而 *N. ceranae* 的原始宿主是否是东方蜜蜂仍是个值得探讨的问题。而 *N. ceranae* 从何时通过何种方式开始感染西方蜜蜂, 则可能是个难解之谜。

(2) 有观点认为 *N. ceranae* 在温暖气候条件下更有竞争力, *N. apis* 在寒冷气候有更强的适应性, 但在类似于加拿大的寒冷环境中 *N. ceranae* 可能也已经比 *N. apis* 有更高的适应性和毒力。因此, *N. ceranae* 和 *N. apis* 在世界地理环境的分布情况以及对气候的适应性并不够明朗, 需要进行更广泛、更大规模的流行病学的研究。

(3) 虽然 *N. ceranae* 与 *N. apis* 的寄主都是蜜蜂, 但通过分析不同微孢子虫的进化关系, 发现 *N. ceranae* 与 *N. vespula* 的亲缘关系最近, 而 *N. apis* 则与 *N. bombi* 亲缘关系最近, *N. ceranae* 与 *N. apis* 亲缘关系更远, 值得人们进一步探讨。宿主种类和地理环境都会对病原的进化产生影响(Li *et al.* , 2016), 是这些微孢子虫种类的原始宿主内环境差异还是原始地理分布区环境条件差异决定了这些进化关系, 有待进一步研究。

(4) 从两种微孢子虫对西方蜜蜂的毒力差异以及与其他蜜蜂病害的相互作用, 不同研究得出的结论甚至截然相反, 这值得人们仔细探讨。最大的原因可能在于实验方法的差异, 包括微孢子虫提取纯化的条件、蜜蜂的日龄选择、地理差异等等。因此需要该领域构建一套统一的实验方

法, 标准化实验操作, 由此还可以进行不同亚种或不同地区的蜜蜂对微孢子虫的易感性实验, 选择育种对微孢子虫抵抗能力较高的蜂种。

(5) 已有研究发现, *N. ceranae* 还感染除西方蜜蜂和东方蜜蜂之外的其他授粉昆虫, 如沙巴蜂 (*Apis koschevnikovi*) (Botias *et al.*, 2012a)、小蜜蜂 (*Apis florea*) 和大蜜蜂 (*Apis dorsata*) (Chaimanee *et al.*, 2010)、熊蜂 (Plischuk *et al.*, 2009; Graystock *et al.*, 2013) 以及无刺蜂和胡蜂 (Porrini *et al.*, 2017)。*N. ceranae* 的宿主谱到底有多广以及对这些授粉昆虫的危害非常值得关注。

对微孢子虫与蜜蜂的寄生关系的研究, 不仅有助于寻找养蜂生产上解决蜜蜂孢子虫病的方法, 也有助于深入了解体内寄生虫和宿主间的寄生关系及病原间的作用关系, 同时对于维护野生授粉昆虫的健康也有重要意义。

参考文献 (References)

- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y, 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.*, 12(3): 774–782.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN, 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology*, 103 (1): 13–20.
- Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N, 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2414–2420.
- Botias C, Anderson DL, Meana A, Garrido-Bailon E, Martin-Hernandez R, Higes M, 2012a. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110 (1): 108–113.
- Botias C, Martin-Hernandez R, Barrios L, Meana A, Higes M, 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, 44(1): 25.
- Botias C, Martin-Hernandez R, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto A, Martinez-Salvador A, De la Rúa P, Meana A, Higes M, 2012b. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*, 93(1): 150–155.
- Chaimanee V, Warritt N, Chantawannakul P, 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2): 207–210.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS, 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2): 186–188.
- Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski A, Pettis JS, 2009a. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3): 204–209.
- Chen Y, Pettis JS, Zhao Y, Liu X, Tallon LJ, Sadzewicz LD, Li R, Zheng H, Huang S, Zhang X, Hamilton MC, Pernal SF, Melathopoulos AP, Yan X, Evans JD, 2013. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics*, 14(1): 451.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal D, Pettis JS, 2009b. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2): 142–147.
- Copley TR, Jabaji SH, 2012. Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1): 15–24.
- Costa C, Tanner G, Lodesani M, Maistrello L, Neumann P, 2011. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(3): 224–225.
- Csaki T, Heltai M, Markolt F, Kovacs B, Bekesi L, Ladanyi M, Pentek-Zakar E, Meana A, Botias C, Martin-Hernandez R, Higes M, 2015. Permanent prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63 (3): 358–369.
- Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RF, Paxton RJ, 2015a. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.*, 17(4): 969–983.
- Doublet V, Natsopoulou ME, Zschiesche L, Paxton RJ, 2015b. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 31–34.
- Doublet V, Paxton RJ, McDonnell CM, Dubois E, Nidelet S, Moritz RF, Alaux C, Le Conte Y, 2016. Brain transcriptomes of honey bees (*Apis mellifera*) experimentally infected by two pathogens: Black queen cell virus and *Nosema ceranae*. *Genom Data*, 10: 79–82.

- Dussaubert C, Maisonnasse A, Crauser D, Tchamitchian S, Bonnet M, Cousin M, Kretzschmar A, Brunet JL, Le Conte Y, 2016. Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific Reports*, 6: 31430.
- Emsen B, Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Eccles L, Lacey B, Ruiz-Perez RA, Nasr M, 2016. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology Research*, 115(1): 175–181.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martin-Hernandez R, del Aguila C, 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21): 6886–6889.
- Fernandez JM, Puerta F, Cousinou M, Dios-Palomares R, Campano F, Redondo L, 2012. Asymptomatic presence of *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(2): 106–110.
- Fontbonne R, Garnery L, Vidau C, Aufauvre J, Texier C, Tchamitchian S, El Alaoui H, Brunet JL, Delbac F, Biron DG, 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 17: 188–194.
- Forsgren E, Fries I, 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.*, 170(3/4): 212–217.
- Forsgren E, Fries I, 2013. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): 78–82.
- Franzen C, 2004. Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6): 275–279.
- Fries I, 1989. Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 28(2): 107–117.
- Fries I, 1993. *Nosema apis*—a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, 74(1): 5–19.
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3): 356–365.
- Gisder S, Hedtke K, Mockel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E, 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 3032–3038.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M, 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*, 8(3): e58165.
- Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D, Hughes WO, 2013. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2): 114–119.
- Gregorc A, Silva-Zacarin EC, Carvalho SM, Kramberger D, Teixeira EW, Malaspina O, 2016. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere*, 147: 328–336.
- Guerrero-Molina C, Correa-Benitez A, Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E, 2016. *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico, causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141: 38–40.
- Higes M, Garcia-Palencia P, Martin-Hernandez R, Meana A, 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 211–217.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Botias C, Bailon EG, Gonzalez-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jimenez JJ, Palencia PG, Meana A, 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.*, 10(10): 2659–2669.
- Higes M, Martin-Hernandez R, Martinez-Salvador A, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto AV, Meana A, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bernal J, 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2): 243–250.
- Higes M, Martin R, Meana A, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2): 93–95.
- Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH, 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38(1): 30–37.
- Huang WF, Solter L, Aronstein K, Huang Z, 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 107–113.
- Keohane EM, Weiss LM, 1999. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube//Wittner M, Weiss L (eds.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: ASM Press. 196–224.
- Kang YB, Kim DS, Jang DH, 1976. Experimental studies on the pathogenicity and developmental stages of *Nosema apis*. *Korean J. Vet. Res.*, 16: 180–184.
- Lecocq A, Jensen AB, Kryger P, Nieh JC, 2016. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific Reports*, 6: 22042.
- Liu F, Wang Q, Dai PL, Wu YY, Song HL, Zhou T, 2008. Natural stripe of microsporidia of honeybee in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 45(6): 963–966.[刘锋, 王强, 代平礼, 吴艳艳, 宋怀磊, 周婷, 2008. 蜜蜂微孢子虫在中国的自然种系构成初探. *应用昆虫学报*, 45(6): 963–966.]

- Liu JP, Zeng L, 2006. An overview of research on the microsporidian biodiversity. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 43(2): 153–158. [刘吉平, 曾玲, 2006. 微孢子虫生物多样性研究的述评. *应用昆虫学报*, 43(2): 153–158.]
- Li Y, Zeng ZJ, Wang ZL, 2016. Phylogenetic analysis of the honeybee Sacbrood virus. *Journal of Apicultural Science*, 60(1): 31–38.
- Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martin-Hernandez R, Nikaido S, Higes M, 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environmental Microbiology Reports*, 5(4): 506–510.
- Nageli C, 1857. *Nosema bombycis* Nageli. *Bot. Z.*, 15: 760–761.
- Natsopoulos ME, Doublet V, Paxton RJ, 2015. European isolates of the microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. *Apidologie*, 47(1): 57–65.
- Pacini A, Mira A, Molineri A, Giacobino A, Bulacio Cagnolo N, Aignasse A, Zago L, Izaguirre M, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Pietronave H, Russo R, Scannapieco A, Lanzavecchia S, Schnittger L, Signorini M, 2016. Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141: 34–37.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I, 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38(6): 558–565.
- Pelin A, Selman M, Aris-Brosou S, Farinelli L, Corradi N, 2015. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Environ. Microbiol.*, 17(11): 4443–4458.
- Plischuk S, Martin-Hernandez R, Prieto L, Lucia M, Botias C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C, Higes M, 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(2): 131–135.
- Porrini MP, Porrini LP, Garrido PM, de Melo ESNC, Porrini DP, Muller F, Nunez LA, Alvarez L, Iriarte PF, Eguaras MJ, 2017. *Nosema ceranae* in south American native stingless bees and social wasp. *Microb. Ecol.*, 74(4): 1–4.
- Retschnig G, Neumann P, Williams GR, 2014. Thiacloprid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate Pathology*, 118: 18–19.
- Roberts KE, Evison SE, Baer B, Hughes WO, 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*, 5: 10982.
- Ryabov EV, Fannon JM, Moore JD, Wood GR, Evans DJ, 2016. The Iflaviruses sacbrood virus and deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission. *Peer J.*, 4: e1591.
- Schottelius J, Schmetz C, Kock NP, Schuler T, Sobottka I, Fleischer B, 2000. Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(12): 1401–1406.
- Teixeira EW, Santos LG, Sattler A, Message D, Alves ML, Martins MF, Grassi-Sella ML, Franco TM, 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3): 250–254.
- Toplak I, Jamnikar Ciglenecki U, Aronstein K, Gregorc A, 2013. Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses*, 5(9): 2282–2297.
- Traver BE, Fell RD, 2012. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3): 408–410.
- Tunca RI, Oskay D, Gosterit A, Tekin OK, 2016. Does *Nosema ceranae* wipe out *Nosema apis* in Turkey? *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2): 259.
- Wang FW, Lu XM, 2003. Microsporidiosis in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 40(1): 5–8. [汪方伟, 鲁兴萌, 2003. 昆虫的微孢子虫病. *应用昆虫学报*, 40(1): 5–8.]
- Williams GR, Shutler D, Burgher-MacLellan KL, Rogers RE, 2014. Intra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS ONE*, 9(7): e99465.
- Zander E, 1909. Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31: 196–204.
- Zheng HQ, Gong HR, Huang SK, Sohr A, Hu FL, Chen YP, 2015. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, 177(1/2): 1–6.
- Zhang JY, Diao QY, Dai PL, Chu YN, Wu YY, Zhou T, Wang Q, 2015. Germplasm distribution of *Nosema* spp. in *Apis mellifera* in China. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 46(9): 1638–1643. [张建燕, 刁青云, 代平礼, 褚艳娜, 吴艳艳, 周婷, 王强, 2015. 中国部分主要养蜂区感染西方蜜蜂(*Apis mellifera*)群微孢子虫种质分布调查. *畜牧兽医学报*, 49(9): 1638–1643.]
- Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. A review of bee virology progress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1095–1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. *应用昆虫学报*, 49(5): 1095–1116.]