

蜜蜂羽化温度与卷翅病毒动态复制相关性研究*

张 炫^{1,2**} 陈彦平² 周丹银¹ 和绍禹^{1***}

(1. 云南农业大学东方蜜蜂研究所 昆明 650201; 2. 美国农业部东部蜜蜂研究室 马里兰州 20705)

摘 要 病毒复制动态变化对于病毒病的研究有着重要意义。选用蜜蜂卷翅病毒(deformed wing virus,以下简称 DWV)作为研究模型,检测 DWV 隐性感染蜂群在不同温度条件下羽化工蜂体内的病毒浓度,以了解不适温度压力这一非生物因子对蜜蜂羽化率及蜜蜂体内 DWV 病毒复制动态的影响。实验结果显示不适羽化温度不仅会明显降低蜜蜂羽化成功率,而且新羽化的带毒蜜蜂体内 DWV 病毒拷贝量增加极显著。部分解释了冬季和早春低温环境下因病毒病暴发造成人工饲养蜂群非正常损失的原因。

关键词 西方蜜蜂, 卷翅病毒, 羽化温度, 病毒浓度

The correlation between bee (*Apis mellifera*) emergence temperature and replication dynamics of the deformed wing virus

ZHANG Xuan^{1,2**} CHEN Yan-Ping² ZHOU Dan-Yin¹ HE Shao-Yu^{1***}

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

Abstract Understanding the replication dynamics of viruses is vital to the study of disease pathogenesis. The dynamics of the deformed wing virus (DWV) in honeybee hosts was investigated. Pupae from a colony with no apparent DWV infection were bred at different temperatures. Newly emerged worker bees were collected and virus titers calculated. We found that unsuitable emergence temperatures cause a sharp decline in adult emergence from pupae. Simultaneously, DWV titers significantly increased in the adults that did emerge. These results partly explain abnormal colony losses during periods of low temperature in winter and early spring. Our laboratory studies support the correlation between abiotic stress factors and the dynamics of virus replication in honey bees.

Key words *Apis mellifera*, deformed wing virus, emergence temperature, virus titer

蜜蜂病敌害联合危害蜂群,特别是瓦螨 *Varroa destructor* 和蜜蜂病毒共同侵袭蜂群已被确认为是导致目前世界蜂群持续损失的主要原因(Ongus *et al.*, 2004; Tentcheva *et al.*, 2004; Ribiere *et al.*, 2008)。另一方面,外界不适环境条件(低温、高湿)也会增加蜜蜂病害的发生机率,如因蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)引发的白垩病(Chalkbrood)在冬季低温条件下流行。秋季蜂群进入越冬准备期时,需要培育足量长寿健康越冬蜂。期间如受低温影响,新羽化蜜蜂健康水平下降,易被病原体侵染,导致羽化蜜蜂越冬期寿命

缩短,无法顺利越冬,最终全群消亡。

在已报到的 20 种蜜蜂病毒中(Allen and Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005),蜜蜂卷翅病病毒(deformed wing virus,以下简称 DWV)是一种最为常见的高传染性病毒(Neumann and Carreck, 2010; van Engelsdorp *et al.*, 2010),在世界范围内有着广泛的分布,在欧洲、南北美洲、非洲、亚洲和中东地区均有报道(Allen and Ball, 1996; Ellis and Munn, 2005; Antúñez *et al.*, 2006)。DWV 可感染蜂群中不同级型的蜜蜂,如蜂王、雄蜂和工蜂,也能感染不同发育时期的蜜蜂个体,包括卵、幼虫、

* 资助项目:现代农业(蜜蜂)产业技术体系建设专项基金(CARS-45-kxj14);美国农业部 CAP 基金(2010-85118-05718)。

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

***通讯作者, E-mail: kmhsy@ 163. com

收稿日期:2012-12-01, 接受日期:2013-02-05

蛹和成虫 (Chen *et al.*, 2004)。一般情况下, DWV 以隐性感染方式通过蜜蜂间的互饲行为进行传播, 或以垂直传播方式在蜂群内由被感染蜂王经卵传播到子代 (Chen *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2007; de Miranda and Fries, 2008; Möckel *et al.*, 2011), 但不表现病症。特定条件下 DWV 可被激活, 致使带毒蜜蜂个体表现发病症状。典型的 DWV 发病特征为羽化成虫翅卷曲残缺, 体色加深, 身体萎缩, 失去飞行能力, 1 ~ 2 d 内死亡 (Bailey and Ball, 1991, 1997; Kovac and Crailsheim, 1988), DWV 在全球范围的流行已成为蜜蜂蜂群非正常丢失的一个重要原因。尽管 DWV 的基因组学和传播途径的研究已取得长足的进展, 但是对于 DWV 病毒如何在蜂群内由隐性感染状态转变为急性致死性疾病的机制仍知之甚少。鉴于蜜蜂疾病防治的迫切需要, 加之 DWV 病毒分布的长期普遍性, 蜜蜂体内病毒动态复制规律和疾病发生机制的研究显得尤为重要。

病毒有着长期共生和应急性侵染两种生存策略, 可通过调节病毒颗粒数量达到长期潜伏和急性致死的目的。同样, 病毒的复制动态也与外界非生物因素相关联。为了获得更详细的关于带毒蜜蜂发病机制的知识, 我们以 DWV 为病原体模型, 观测不同温度条件羽化蜜蜂样本的 DWV 浓度, 从非生物 (羽化温度) 因素角度对蜜蜂体内病毒动态复制进行研究, 通过比较在最适温度和不适应温度下羽化蜜蜂个体内 DWV 浓度的差异, 以了解温度这一非生物因素对寄主蜜蜂体内 DWV 动态复制的影响。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂样本的处理与收集

(1) 将一清洁空蜡空巢脾置于一框式囚王笼内, 诱入一个 DWV 隐性感染蜂群的产卵蜂王, 限制产卵 24 h 后释放蜂王, 并将卵脾在框式囚王笼内孵育至第 9 天封盖 (图 1);

(2) 将封盖子脾取出, 在实验室用刀片均匀分割封盖巢脾为约 100 个封盖子的小块, 放入小型羽化箱内 (图 2);

(3) 使用 6 个人工气候箱 (Forma Scientific Inc. $\pm 0.2^\circ\text{C}$), 分别设定 6 个羽化梯度温度 (29、30、31、33、35 和 37°C)。分别放入 1 个装有封盖子巢脾小片的小型羽化箱, 在不同温度条件下进

行羽化 (图 3);

(4) 根据弱群势蜂群因保温能力差导致在不适应天气条件下巢温不稳定的现象, 设计一温度变动组 (X 组)。在 33°C 恒温箱抚育 3 d 后, 移入 30°C 恒温箱抚育 3 d, 之后再返回到 33°C 恒温箱抚育 3 d。按这样 3 d 变换一次抚育温度的处理方法直至蜜蜂幼虫羽化出房;

(5) 收集不同羽化温度组出房工蜂于样品管中, -80°C 保存; 重复试验 3 次, 并记录羽化时间和统计羽化率。

1.2 蜜蜂样本总 RNA 的提取和浓度测定

单个蜜蜂样本放入 1.5 mL 离心管中, 用塑料研磨棒快速捣碎, 按试剂盒操作说明加入 500 μL TRIzol 细胞裂解剂 (RNA extraction kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 经氯仿和乙丙醇萃取并离心获得 RNA 沉淀, 加入 100 μL 去 RNA 酶水 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 溶解。用分光光度计 (Ultrospec 3300 *pro*, Amersham Biosciences) 于 260 nm 波长测定样本总 RNA 的浓度, 用 260 nm 与 280 nm 吸光值比值检测样本总 RNA 的纯度。总 RNA 样本于 -80°C 冰箱保存备用。

1.3 PCR 引物和特异性探针的设计

根据 GeneBank 数据库公布的 DWV 核酸序列 (序列号: NC_004830) 和西方蜜蜂的 β -actin 核酸序列 (序列号: AB_023025), 使用 Primer Express version 1.0 软件设计反转录 PCR (Reverse Transcription-PCR, 以下简称 RT-PCR) 和 TaqMan 即时定量 RT-PCR (TaqMan real-time quantitative RT-PCR, 以下简称 qRT-PCR) 的引物和特异性探针。DWV 的特异性引物的核酸序列如下: 上游引物 (5'-ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA-3'), 下游引物 (5'-TGCACAATTTTCGGACATCA-3'); DWV 探针为: (6-carboxyfluorescein [FAM]-5'-CGCATGAACAAGTTCGGCGTT-3'-6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA])。以获得一个长度为 702 bp 的 PCR 扩增产物。

β -actin 反应的特异性探针 (Apis- β -actin-probe) 为 (FAM-5'-ATGCCAACA-CTGTCCTTTCTG-GAGGTA-3'-TAMRA); β -actin 反应的引物为正向引物 (Apis- β -actin-sense) (5'-AGGAATGGAAG-CTTGCGGTA-3'), 反向引物 (Apis- β -actin-antisense) (5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3')。



图 1 获得实验用同日龄封盖幼虫

Fig.1 Same instar larvae of worker bee prepared

将蜂王诱入框式囚王笼内 24 h,使其在空巢上产下同日龄蜂卵。移出蜂王后,在框式囚王笼内卵脾在蜂群内抚育 9 d,封盖后取出,用于后续试验。
Queen of colony was limited 24 h to lay eggs in a clean comb. Then we moved queen back to hive. The egg comb in frame was kept in hive to breed till these larva cells have been sealed in 9 days.

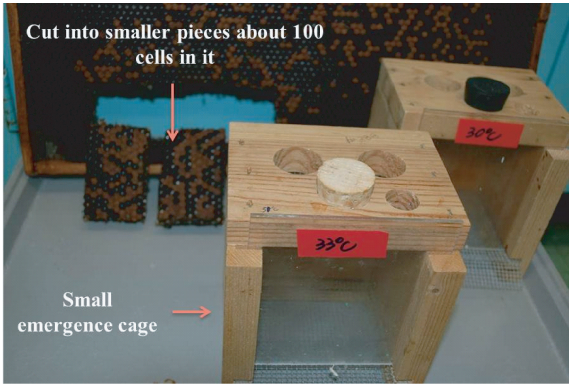


图 2 分割封盖巢脾

Fig.2 Cut wax comb in same size

将同日龄的封盖蜡脾切割为大小相近,约含 100 个封盖子的小块,并分别移入标记好的小羽化箱内备用。
Cut capped comb into small pieces and put one piece of comb into a small cage. Every piece has 100 sealed cells.

可获得一个长度为 181 bp 的 PCR 扩增产物。
其中引物由 Invitrogen 公司合成,TaqMan 探针由 Biosystems 公司提供。

1.4 相对定量法计算样本 DWV 病毒浓度和 TaqMan 正时定量 RT-PCR 反应标准曲线验证

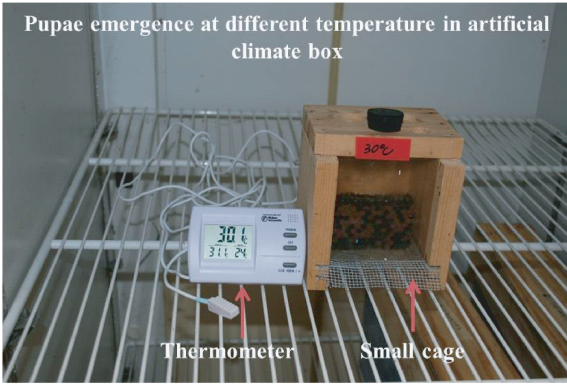


图 3 羽化封盖蜜蜂幼虫

Fig.3 Incubation of bee larvae

将 6 个装有封盖子脾小块的小羽化箱置于人工气候箱内,在设定温度条件下羽化。
Small capped combs in cages were incubated with different temperature in incubator.

蜜蜂样本的 DWV 浓度计算基于 PCR 反应的扩增浓度值(C_t),是一个放大的初始样本浓度。不同样本在相同反应条件下进行 PCR 扩增,获得一个目的产物浓度,与看家基因 β -actin 的 PCR 反应浓度相减($\Delta C_t = C_{t_{DWV}} - C_{t_{\beta-actin}}$)以消除样本间的取样误差。以最小的 ΔC_t 值作为校正值,代入公式: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{检测样本值}) - \Delta C_t(\text{校正样本值})$ 计算,计算结果代入公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 得到检测样本最终的 DWV 相对浓度(Chen *et al.*, 2005)。

这种基于 C_t 值的相对浓度定量 DWV 病毒的方法,要求样本和 β -actin 的 Real Time qRT-PCR 扩增效率尽量相近。为检验这一方法在本次实验中的精确性,在进行样本检测前将一样本总 RNA 稀释成 1、0.864、0.728、0.592、0.456 和 0.32 ng/ μL 5 个等分的浓度梯度,以此为模板,用正时 qRT-PCR 同时检测梯度浓度样本中 DWV 和 β -actin 的扩增浓度。每个样本等分浓度重复 3 次,取平均值绘制标准曲线,用以计算 qRT-PCR 在本实验中的样本和看家基因间的扩增误差。结果显示不同梯度加样量的 C_t 值呈正相关,DWV 和 β -actin 的相关系数分别为 0.9822 和 0.9572。

为消除样本间总 RNA 加样量的误差,看家基因 β -actin(ΔC_t)值被引入,DWV 和 β -actin 的相对扩增效率用 $\Delta C_t = (C_t(\text{DWV}) - C_t(\beta\text{-actin}))$ 与样本总 RNA(ng)的对数比值表示,并得到这一浓度梯度的正时 qRT-PCR 定量标准曲线(图 4),其中

$P < 0.1 (0.056)$, 显示 DWV 和 β -actin 的扩增效率相同, 证明本实验的相对定量法测定蜜蜂总 RNA

样本 DWV 浓度准确有效。

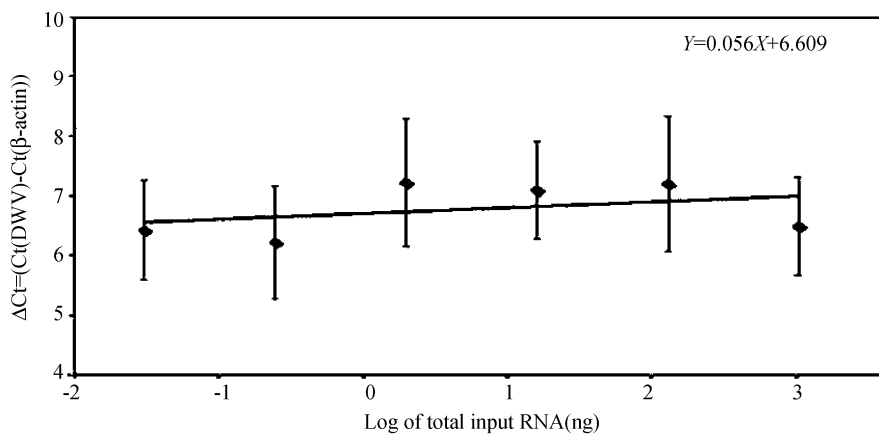


图4 蜜蜂总 RNA 样本的 DWV 与 β -actin 的 qRT-PCR 扩增反应相对定量浓度的标准曲线

Fig. 4 Validation of amplification efficiency for DWV and β -actin by TagMan qRT-PCR

蜜蜂总 RNA 样本经 1 ~ 5 倍稀释后获得 6 个范围从 1 μ g 至 0.32 ng 的梯度浓度样本, 每个浓度样本 PCR 扩增 3 次, 取平均值并对应加样量绘制反应曲线。基于加样量的对数值和 DWV 和 β -actin 扩增浓度绘制曲线图, 计算斜率分析差异性显著性。

The amplification of six five-fold dilutions of total RNA ranging from 1 μ g to 0.32 ng per reaction was pertableed in triplicate and the standard curves for DWV and β -actin were generated by plotting the Ct value against the corresponding input RNA. The difference between the Ct value of DWV and that of β -actin (ΔCt) was plotted against the log of the corresponding amounts of input RNA.

1.5 样本检测

1.5.1 蜜蜂样本的 DWV 感染状况的 RT-PCR 检测

使用 RT-PCR 技术 (一步法 RT-PCR 试剂盒, Promega Co.) 检测实验蜂群蜜蜂样本的 DWV 感染状况, 特异性扩增引物为: 正向引物 5'-ATCAGCGCTTAGTGAGGAA-3', 反向引物 5'-TCGACAATTTTCGGACATCA-3', 用以获取一段长度为 700 个碱基对 (base-pairs) 的 DNA 片段用于定性检测。收获产物用加入溴化乙锭显色液的 1% 的低熔点琼脂胶进行凝胶电泳显像, 并进行阴性对照, 以确定无样品污染及收获预期的 PCR 反应物。回收阳性样本的 PCR 扩增产物 (Wizard PCR Prep DNA purification system, Promega Co.) 并测序, 获得的核酸序列通过与 GenBank 中的 DWV 核酸序列比对以定性 PCR 扩增产物, 并筛选出各实验组的 DWV 阳性样本用于后续的定量实验。

1.5.2 TaqMan 正时定量 RT-PCR 检测样本 DWV 浓度 使用定量 PCR 仪 (Stratagene Mx3005 PTM Multiplex Quantitative PCR System) 和一步法

RT-PCR 试剂盒 (Promega, Madison, WI) 及 0.2 μ mol/L 的 TaqMan 探针 (Biosystems Co.) 对 DWV 阳性的蜜蜂总 RNA 样本进行定量 ($n = 10$ /次, 共 3 次)。RT-PCR 反应程序为: 48 $^{\circ}$ C 45 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C, 30 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, 1 min $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C, 2 min, 40 个循环。同时一一对应蜜蜂个体总 RNA 样本使用 β -actin 引物同步进行扩增反应, 用以消除不同样本间加样量的差异。收获产物用加入溴化乙锭显色液的 1.5% 的琼脂胶进行凝胶电泳显像实验, 并进行阴性对照, 以确定无样品污染及收获预期的 PCR 反应物。

2 结果与分析

2.1 不同羽化温度条件蜜蜂羽化率和 DWV 检出率

6 个温度梯度羽化组同时进行处理, 记录羽化时间和羽化率, 重复 3 次, 取平均值。并用 RT-PCR 检测各组蜜蜂样本 DWV 感染状况 ($n = 10$), 取平均值。获得各实验组出房时间、羽化率和各

组蜜蜂样本 DWV 感染率数据(表 1)。

表 1 不同温度条件下蜜蜂工蜂羽化率
Table 1 The emergence rate of worker bee under different culture temperature

温度 Temperature (℃)	羽化时间 Emergence time(d)	羽化率 Emergence rate(%)	样本 DWV 检出率 The detection rate of sample DWV(%)
37	10	18.96	20.15
35	11	79.80	33.06
33	12	91.00	43.00
31	14-15	55.76	51.44
30	16-18	31.00	15.50
29	>20	0	—

表 2 蜜蜂样本 DWV 的反转录定量 PCR 值的相对浓度换算
Table 2 qRT-PCR data was coverted in DWV titer of bee samples in comparative Ct method

处理组 Group(℃)	Avg DWV Ct	Avg β-actine Ct	$\Delta Ct [Ct_{(DWV)} +$ $Ct_{(\beta-actine)}] ^a$	$\Delta \Delta Ct [\Delta Ct -$ $\Delta Ct_{(Calibrator)}] ^b$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$
30	17.99 ± 0.66	16.71 ± 0.93	1.28 ± 1.12	-15.54 ± 1.12	47 643.77(103 552.29 - 21 920.60)
33	31.07 ± 0.56	14.25 ± 0.30	16.82 ± 0.93	0	1.00
35	29.72 ± 1.01	14.90 ± 0.24	14.82 ± 1.08	-2.00 ± 1.08	4.00(8.45 - 1.89)
37	24.08 ± 0.41	14.96 ± 0.64	9.83 ± 0.93	-6.99 ± 0.93	127.11(242.19 - 66.71)
对照 CK	15.29 ± 0.53	19.52 ± 3.07	4.23 ± 2.97	-12.59 ± 2.97	6 165.49(48 308.85 - 786.88)

3 讨论

蜜蜂巢内温度通常维持在 33 ~ 35℃ (Heinrich,1980; Winston,1987),但温度低于 29℃ 或高于 37℃ 时,幼虫无法羽化出房 (Groh *et al.* , 2004)。实验数据显示随着偏离最适羽化温度 33 ~ 35℃ 区间,蜜蜂封盖幼虫羽化率逐渐下降,当羽化温度低于临界低温 29℃ 或高于临界高温 37℃,羽化失败。虽然不同羽化温度间的 DWV 阳性样本检出率差异不显著,表明同一蜂群的 DWV 病毒感染率与羽化温度无关联。但不同温度羽化蜜蜂的 DWV 阳性样本的 qRT-PCR 相对定量数据显示不同温度处理组的羽化工蜂样本 DWV 病毒浓度差异极显著。30℃ 处理组 DWV 浓度最大,高出

2.2 蜜蜂 DWV 阳性样本的 qRT-PCR 扩增曲线图

qRT-PCR 的扩增曲线图(图 5)可观察到极限温度条件羽化蜜蜂样本的 DWV 拷贝数在扩增至 16 ~ 20 个循环时就出现峰值,而最适温度条件羽化蜜蜂样本的 DWV 拷贝数在扩增至 30 个循环时才现峰值。

2.3 各温度处理组蜜蜂 DWV 阳性样本的病毒浓度

将 qRT-PCR 的检测值代入病毒相对浓度定量计算公式,求得不同温度条件羽化蜜蜂个体的 DWV 的相对浓度(表 2)。结果显示 30℃ 羽化组病毒感染率和阳性样本病毒浓度为最大,高出 33℃ 羽化对照组 47 643 倍,31 ~ 33℃ 温度波动处理组的病毒浓度高出 33℃ 羽化对照组 6 165 倍(表 2)。

33℃ 对照组 47 643.77 倍,温度波动处理组(X 组)的病毒浓度高出 33℃ 对照组 6 165.49 倍,37℃ 与最适温度组(33℃)相比高出 127.11 倍,而 33℃ 和 35℃ 最适羽化温度组间差异不显著。

实验证明在自然条件下,因不同群势蜂群对于脾保温能力的差异,导致弱群势蜜蜂在幼虫发育阶段更易受外界气温变化(低温或高温)的影响,羽化率下降。加之广泛存在于蜜蜂个体的蜜蜂病毒(DWV)随不适温度羽化蜜蜂免疫水平的下降,DWV 在寄主体内的复制动态平衡被打破,发生单向不可逆复制,蜜蜂体内 DWV 拷贝量在短时间内剧增,病毒病暴发。

实验结果验证了不适发育温度不仅会缩短(高温应激)或延迟(低温应激)蜜蜂的羽化时间

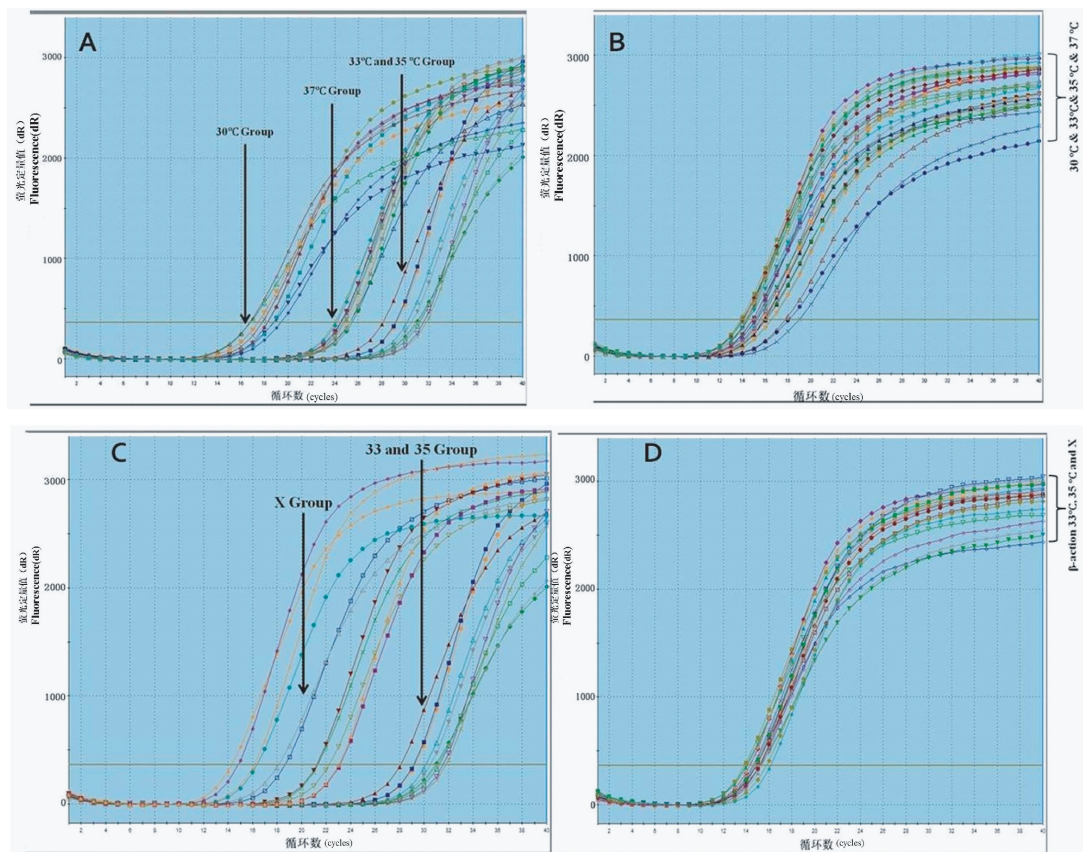


图5 不同梯度温度羽化工蜂样本的 DWV qRT-PCR 扩增曲线图

Fig.5 The representative qRT-PCR amplification plots of DWV

A 和 C 为极限羽化温度与最适羽化温度样本 DWV 扩增曲线；

B 和 D 为使用 β -actin 引物的病毒浓度扩增曲线。

A and C are qRT-PCR amplification plots of worker bee samples; B and D are qRT-PCR amplification plots of β -actin.

(Groh *et al.*, 2004),而且会衰弱蜜蜂,增加蜜蜂个体的病毒易感率。自然条件下弱群势蜜蜂没有足够数量的工蜂来维持最适蜂巢温度,导致不适温度条件下羽化蜜蜂体内病毒浓度激增,病毒病发病率上升,特别在晚秋或早春温度波动较大的季节,蜂群快速衰弱直至消亡。而强群势蜜蜂有着较强的蜂巢温度调节能力和充足的食料储备,可以为幼虫提供良好发育条件,获得足量的健康越冬蜂或春繁蜂,保证蜂群顺利渡过不适期。我们的研究结果在一定程度上揭示了近年来越冬蜂群大量丢失和早春蜂群损失的原因,并进一步验证了 DWV 在不适温度条件下发生应激反应,衰弱蜜蜂,造成蜂群非正常损失(Highfield *et al.*, 2009)。

我们的研究证明外界非生物压力(温度)可影响蜜蜂病毒动态复制。这一研究结果的意义在于

进一步认识到“寄主-病原体”间如何相互作用,揭示了自然条件下不同病毒感染水平的蜂群发病规律,同时为养蜂生产实践中采取减小外界压力(非生物),提高蜂群健康以有效预防疾病的管理手段提供科学依据。

参考文献 (References)

- Allen M, Ball B, 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77(3):141 – 162.
- Antúnez KD, Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P, 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.*, 93(1):67 – 70.
- Bailey L, Ball BV, 1991. *Honey Bee Pathology* (2nd Ed.). Academic Press Inc. San Diego, CA, USA. 331 – 335.
- Ball BV, Bailey L, 1997. Viruses//Morse RA, Flottum K (eds.). *Honey Bee Pest, Predators, and Diseases*. The

- A. I. Root Company; Medina, OH, USA. 11 – 31.
- Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF, 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1):436 – 441.
- 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(4):441 – 448.
- de Miranda JR, Fries I, 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Invert. Pathol.*, 98:184 – 189.
- Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4):88 – 101.
- Groh C, Tautz J, Rössler W, 2004. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. *PNAS*, 101(12):4268 – 4273.
- Heinrich B, 1980. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.*, 85:61 – 87.
- Highfield AC, Nagar AE, Mackinder LCM, Noël LM-LJ, Hall MJ, Martin SJ, Schroeder DC, 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(22):7212 – 7220.
- 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. Apicult. Res.*, 27(4):230 – 238.
- Möckel N, Gisder S, Genersch E, 2011. Horizontal transmission of deformed wing virus: Pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J. Gen. Virol.*, 92(Pt2):370 – 377.
- Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.*, 49(1):1 – 6.
- Ongus JR, Peters D, Bonmati JM, Bengsch E, Vlaskovits JM, Van Oers MM, 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Ifavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.*, 85:3747 – 3755.
- Ribiere M, Ball BV, Aubert M, 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses//Aubert M, Ball BV, Fries I, Moritz RFA, Milani N, Bernardinelli I (eds.). *Virology and the Honey Bee*. European Communities, Luxembourg. 15 – 84.
- Tentcheva D, Gauthier L, Bagy 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.
- van Engelsdorp D, Speybroeck N, Evans J, Nguyen BK, Mullin C, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen YP, Tarpy DR, 2010. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.*, 103(5):1517 – 1523.
- Winston M, 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard Univ. Press; Cambridge, MA, USA. 281.
- Yue C, Schroeder M, Gisder S, Genersch E, 2007. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.*, 88(Pt8):2329 – 2336.