

狄斯瓦螨寄生对西方蜜蜂发育的影响*

李文峰** 韩日畴***

(广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用开放实验室, 广东省生物资源应用研究所, 广州 510260)

摘要 【目的】研究被狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 寄生的西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 工蜂蛹期发育过程的若干生理变化, 以揭示狄斯瓦螨寄生对西方蜜蜂个体发育的影响。【方法】采用以空心胶囊为载体的狄斯瓦螨体外培养系统观测狄斯瓦螨对蜜蜂蛹期侵染的全过程。在实验室条件下, 对 5 日龄早期工蜂幼虫分别接种 0 (对照组)、1 只、2 只成年雌螨, 持续观察蜂螨寄生后第 3 天 (D3)、第 6 天 (D6)、第 9 天 (D9) 和出房时 (Emergence) 的寄主蜜蜂的发育表观变化、体重变化、死亡率及寄主和蜂螨体内蜜蜂残翅病毒 (Deformed wing virus, DWV) 丰度变化。【结果】感染狄斯瓦螨的西方蜜蜂不仅发现翅残缺/变形、腹部萎缩等已知畸形发育特征, 还发现复眼着色延迟等新特征, 并且蜜蜂个体发育畸形率与接种蜂螨数目呈显著正相关 ($P < 0.0001$)。与对照组相比, 感染狄斯瓦螨的蜜蜂体重在 D6、D9 和出房时间点均显著降低 ($P < 0.001$), 且与接种蜂螨数目呈显著负相关 ($P < 0.0001$)。狄斯瓦螨寄生使寄主寿命显著缩短 ($P < 0.001$), 且该效应也与最初感染的蜂螨数目有关。在 D9 时, 狄斯瓦螨寄生显著提高了蜜蜂 DWV 丰度 ($P < 0.05$), 且蜜蜂 DWV 表达水平与接种蜂螨数目显著正相关 ($P < 0.01$)。此外, 狄斯瓦螨体内的 DWV 表达水平与寄主体内的 DWV 表达水平呈显著正相关 ($P < 0.001$)。【结论】狄斯瓦螨寄生对西方蜜蜂工蜂蛹期发育造成了破坏性影响, 对其个体健康构成了重要威胁。

关键词 狄斯瓦螨; 西方蜜蜂; 蛹期; 发育; 残翅病毒

Effects of the parasite *Varroa destructor* on honey bee, *Apis mellifera* L. development

LI Wen-Feng** HAN Ri-Chou***

(Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the physiological responses of *Apis mellifera* worker pupae to *Varroa destructor*, and illustrate the effects of this parasite on the development of honey bees. 【Methods】A gelatin capsule-based *Varroa in vitro* rearing system was used to monitor the development of honey bee pupae infested by *Varroa* mites. Capsules containing early fifth instar worker larvae were inoculated with 0 (Control), 1 and 2 mites, respectively, and kept at an appropriate temperature in an incubator until the bees emerged. The appearance, body weight and mortality of larvae, and the DWV level of both hosts and parasites, were recorded and analyzed three (D3), six (D6) and nine days (D9) after *Varroa* inoculation and at the time of emergence. 【Results】A range of deformities such as crippled or deformed wings, a shortened abdomen, developmental retardation indicated by delayed compound eye pigmentation, were observed and the deformity rate was significantly correlated with the number of mites ($P < 0.0001$). The body weight of *Varroa*-infested bees was significantly less than that of the control group on D6, D9, and at emergence ($P < 0.001$), and was negatively correlated with the number of mites ($P < 0.0001$). Bee's life spans were inversely correlated with the number of mites ($P < 0.001$). Relative DWV levels were significantly up-regulated by *Varroa* parasitism on D9, and were positively correlated with the number of mites ($P < 0.001$). In addition, expressed DWV RNAs were positively correlated between hosts and the parasites ($P < 0.001$). 【Conclusion】

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31741117); 广州市科技计划项目 (201904010115)

**第一作者 First author, E-mail: wfli.bees@giabr.gd.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hanrc@giabr.gd.cn

收稿日期 Received: 2020-07-01; 接受日期 Accepted: 2020-08-15

Varroa parasitism both retards the development and increases the mortality of honey bee worker pupae, thereby posing a significant threat to colony health.

Key words *Varroa destructor*; *Apis mellifera*; pupal stage; development; deformed wing virus

近年来,蜂群损失现象(Honey bee colony losses)在世界多地大规模、频繁发生,引起了人们的普遍关注和担忧。例如,自2007年秋季至2008年春季,16个欧洲国家的越冬蜂群遭受了约10%-35%的损失(van Engelsdorp and Meixner, 2010);自2006年起,连续10年,美国的越冬蜂群每年损失22.3%-35.8%(van Engelsdorp *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Kulhanek *et al.*, 2017)。大规模蜂群损失表明全球蜜蜂生存正受到前所未有的威胁。

据估计,世界上85%的主要农作物都依赖于蜜蜂等传粉昆虫授粉,其中油料作物、牧草作物、蔬菜瓜果类、水果类和坚果类作物尤其依赖蜜蜂授粉(Klein *et al.*, 2007)。蜜蜂授粉能显著增加农作物的产量和质量,具有重要的经济价值。然而,蜂群损失导致可提供农作物授粉服务的蜜蜂数量不足,进而引发授粉危机,最终将影响全球粮食安全(Aizen and Harder, 2009)。

造成大规模蜂群损失的因素可能是多方面的,包括农药滥用、病虫害暴发、农作物单一化种植、气候变化,以及城市化等,其中,蜜蜂病虫害被认为是主要因素之一(Ratnieks and Carreck, 2010; van Engelsdorp and Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Steinhauer *et al.*, 2018)。和地球上其它物种一样,蜜蜂也受到多种病虫害的侵袭,包括病毒、细菌、真菌、寄生虫等,其中,狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 对蜂群生存构成的威胁尤其严重(Le Conte *et al.*, 2010)。

狄斯瓦螨是一种蜜蜂体外寄生螨,原始寄主为东方蜜蜂 *Apis cerana*;自20世纪50年代成功转移至西方蜜蜂 *Apis mellifera* 之后,狄斯瓦螨迅速扩张至全球绝大多数西方蜜蜂蜂群,成为西方蜜蜂的主要病虫害之一(De Jong *et al.*,

1982b; Rosenkranz *et al.*, 2010)。在经历了漫长的进化过程之后,东方蜜蜂种群对狄斯瓦螨的寄生产生了很强的耐受性和抵抗性,使得狄斯瓦螨对东方蜜蜂基本不构成危害(Rath, 1999)。与之相反,受限于较短的互作历史等原因,绝大多数西方蜜蜂种群对狄斯瓦螨尚未产生明显的耐受性和抵抗性,使得狄斯瓦螨在西方蜜蜂蜂群中可以快速增长和传播(Kurze *et al.*, 2016)。

狄斯瓦螨的生活周期可划分为生殖期(Reproductive phase)和游离期(Phoretic phase),在生殖期,螨停留在封盖子里;在游离期,则寄生于成年蜂体表(Rosenkranz *et al.*, 2010)。最新研究表明,狄斯瓦螨主要取食寄主的脂肪体,而不是原先认为的血淋巴(Ramsey *et al.*, 2018, 2019)。狄斯瓦螨寄生对蜜蜂个体和群体的正常生命活动均造成了不利影响(Boecking and Genersch, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010; 张祎和韩日畴, 2012)。在个体水平,首先,狄斯瓦螨寄生导致蜜蜂营养不足,初生重降低(De Jong *et al.*, 1982a; Bowen-Walker and Gunn, 2001; Pedro *et al.*, 2003; de Guzman *et al.*, 2013)。经检测,新出房工蜂个体头部和腹部的总蛋白质和碳水化合物含量均显著降低(Bowen-Walker and Gunn, 2001);工蜂蛹(褐眼期)血淋巴蛋白质浓度与血淋巴总体积也显著降低(Weinberg and Madel, 1985)。另有研究表明,每只成年狄斯瓦螨每天需要从寄主身上获得1 μ L 营养液;同时,由于螨取食造成了开放性伤口,使蜜蜂不断遭受水分流失(Posada-Florez *et al.*, 2018)。这些因素势必导致新出房蜂营养不良、体重降低。其次,导致蜜蜂成年个体寿命缩短。研究显示,未感染蜜蜂平均寿命为27.6 d,而感染蜜蜂仅为13.6 d,且寿命长短与感染狄斯瓦螨数目显著负相关,而与初生重不相关(De Jong and De Jong, 1983)。再次,造成免疫抑制和代谢失调。与未感染对照相比,感染

狄斯瓦螨蜜蜂的免疫能力受到抑制,若干抗菌肽基因和免疫相关酶基因的表达水平显著下调 (Gregory *et al.*, 2005; Yang and Cox-Foster, 2005)。同时,狄斯瓦螨侵染使得中华蜜蜂脑部 64 种代谢物发生上调/下调,包括若干脂肪酸、氨基酸、羧酸和磷脂等 (Wu *et al.*, 2017)。最后,狄斯瓦螨寄生引起基因表达变化。差异表达基因主要与胚胎发育、细胞代谢、免疫以及神经信号传导等有关 (Navajas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010)。此外,狄斯瓦螨还是多种蜜蜂病毒,尤其是蜜蜂残翅病毒 (Deformed wing virus, DWV) 的天然载体 (Chen and Siede, 2007; de Miranda and Genersch, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010)。狄斯瓦螨寄生能提高蜜蜂体内的 DWV 水平和出房个体畸形率 (Yang and Cox-Foster, 2005), 同时,促进 DWV 在全世界蜂群中的传播 (Martin *et al.*, 2012; Wilfert *et al.*, 2016)。

目前,尽管人们对狄斯瓦螨在个体水平对蜜蜂的危害已比较清晰,但是仍然存在若干具体问题有待解决,尤其是对于蜜蜂成年前的发育阶段。比如,蜜蜂蛹期的体重变化、死亡率和除了翅畸形以外的发育不正常表型等,有必要开展进一步试验研究加以解答。因此,本研究观察狄斯瓦螨开始寄生至寄主出房的整个过程,并分析这个阶段寄主蜜蜂的发育表型变化、体重变化和死亡情况,以及 DWV 病毒水平变化等,取得的研究结果将有助于系统加深对这一阶段狄斯瓦螨对蜜蜂发育的影响。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂和狄斯瓦螨

本研究所用蜜蜂为意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica*。从蜂群中选取 5 日龄蜜蜂幼虫,作为室内蜂螨寄生的寄主。适龄幼虫的获取方法参考 (Nazzi and Milani, 1994)。首先,选择并标记 1 个健康强群 (蜂群经过定期的病虫害检查和治螨处理); 然后,从蜂群中提出一张子脾,使用透明纸板覆盖脾面,用标记笔标记出划定区域内的全部已封盖巢房; 将该子脾放回原群,等待工

蜂封盖余下巢房; 12 h 后,提出该子脾,对照透明纸板,打开 12 h 内新封盖的工蜂房蜡盖,放入培养箱中 (34.5 °C, 75%RH) 1-2 h; 收集从开盖巢房中自行爬出的工蜂幼虫,待用。

本研究所用狄斯瓦螨也来自意蜂群。参考 (Dietemann *et al.*, 2013) 描述的方法,从封盖子中获取蜂螨。首先,挑选并标记 1 个螨害严重的蜂群 (长期未进行治螨处理); 然后,从该群提出 1-2 张封盖子脾,逐一打开巢房盖和巢房壁,使幼虫/蛹充分暴露; 使用软毛刷从虫体和巢房壁/底部获得蜂螨; 将蜂螨暂时存放在底部垫着湿润滤纸的培养皿内,备用 (为保持蜂螨活力,在 1 h 内完成全部接种操作)。

1.2 接种、培养和取样

本次室内蜂螨寄生试验采用空心胶囊体外培养系统 (Nazzi and Milani, 1994; Piou *et al.*, 2016; Egekwu *et al.*, 2018), 使用 00 号透明明胶胶囊 (Capsuline 公司), 并在胶囊盖底部用昆虫针打孔。将采集的单头蜜蜂幼虫装入胶囊内 (1 只幼虫/胶囊); 然后,使用软毛刷将蜂螨接种至幼虫体表。试验分 3 组, 0 mite、1 mite 和 2 mites 组。0 mite 组为对照组,不接种蜂螨, 1 mite 组接种 1 只蜂螨, 2 mites 组接种 2 只蜂螨。将接种完成的胶囊逐一装入 96 孔 1.5 mL 离心管架的孔内 (胶囊盖端朝外); 然后放入温度 34.5 °C, 75% RH 的人工气候箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 型号: MGC-300H) 内培养,直到蜜蜂出房。一共进行 4 次试验重复。

自接种完成起,每间隔 24 h 对各组蜜蜂个体发育状态和死亡情况进行观察和拍照记录,并在第 3 天 (D3)、第 6 天 (D6)、第 9 天 (D9) 和出房 (Emergence) 4 个时间点分别逐个收集蜜蜂及相应的蜂螨样品。逐一称量、记录蜜蜂个体体重的,同时,根据蜜蜂个体发育状态不同 (包括正常与畸形), 将各时间点样品进一步细分为正常组和畸形组。将蜜蜂样品置于 -80 °C 的冰箱中存放,备用。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

根据产品说明书,使用 TRIzol 试剂

(Invitrogen 公司)分别从单只蜜蜂和单只/两只蜂螨中提取总 RNA。然后,利用 DNase I(Ambion 公司)去除每份总 RNA 样品中的基因组 DNA 污染,并运用 NanoDrop 8000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific 公司)分析总 RNA 样品的纯度和 RNA 含量。总 RNA 样品存放于 -80 °C 备用。

使用 20 μL 逆转录反应体系合成 cDNA。反应体系包含: 2 μL 总 RNA (约 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL 随机引物 (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL dNTP (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 二硫苏糖醇 (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 4 μL 5X first strand buffer, 1 μL SuperScript III 逆转录酶 (200 U/ μL , Invitrogen 公司), 和 10 μL nuclease-free water。反应程序如下: 25 °C 保持 5 min; 然后, 50 °C 保持 45 min; 最后, 70 °C 保持 15 min。所得 cDNA 存放于 -20 °C 备用。

1.4 荧光定量 PCR

借助荧光定量 PCR (qPCR) 技术进行蜜蜂和狄斯瓦螨体内 DWV 病毒表达量分析。试验在 CFX384 Touch real-time PCR system 平台进行 (Bio-Rad 公司), 检测信号为 SYBR green。扩增所用引物见表 1。内参基因为 $\beta\text{-actin}$ 。每 10 μL PCR 反应体系包括: 5 μL 2X Brilliant III ultrafast SYBR green qPCR mix (Stratagene 公司), 0.25 μL 上游引物 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.25 μL 下游引物 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.5 μL cDNA 模板和 4 μL nuclease free water。PCR 反应程序为: 95 °C 持续 3 min; 紧跟 40 个循环, 每个循环为: 95 °C 持续 10 s, 接着 60 °C 持续 45 s。由 CFX Manager 3.1 软件 (Bio-Rad 公司) 自动输出 C_T 值, 然后, 利用比较 C_T 值法 ($\Delta\Delta C_T$, (Schmittgen and Livak, 2008) 计算 DWV 相对表达量。

表 1 本研究使用的引物
Table 1 Primer sequences used in this study

基因 (登录号) Gene (GenBank accession number)	序列 (5'→3') Sequence	扩增长度 (bp) Amplicon length	参考文献 Reference
$\beta\text{-actin}$ (蜜蜂) (NM_001185145)	TGCCAACACTGTCCTTTCTG (F) AGAATTGACCCACCAATCCA (R)	156	Mutti <i>et al.</i> , 2011
$\beta\text{-actin}$ (狄斯瓦螨) (AB242568)	GTCTCTGTTCCAGCCCTCGTTC (F) TGAAGGTAGTCTCATGGATAC (R)	62	Moore <i>et al.</i> , 2011
DWV (NC_004830)	CGAAACCAACTTCTGAGGAA (F) GTGTTGATCCCTGAGGCTTA (R)	174	DeGrandi-Hoffman <i>et al.</i> , 2010

1.5 数据分析

借助 2×2 列联表和卡方检验, 分析蜂螨接种数目与蜜蜂外部形态发育畸形发生频率之间的关联性。利用单因素方差分析 (ANOVA) 结合 Tukey HSD 多重比较方法, 分析狄斯瓦螨寄生对寄主体重与体内 DWV 病毒丰度是否存在显著影响, 以及各处理组之间的差异显著性。利用线性相关分析寄主体重与蜂螨接种数目、寄主 DWV 丰度与蜂螨数目, 以及与蜂螨 DWV 丰度的相关性。采用 Kaplan-Meier 法和 log rank 与 Wilcoxon 检验进行生存分析 (Survival analysis), 并进一步使用 Wilcoxon 检验进行各处理组间的两两比较。所有统计分析均使用 SPSS18.0 软件 (IBM SPSS 公司) 完成。检验显

著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 狄斯瓦螨寄生导致寄主发育畸形率上升

通过观察不同时间点蜜蜂外部发育形态发现: 蜜蜂个体外部发育形态存在显著差异, 从整体上可分为畸形和正常 2 类; 与正常个体相比, 畸形个体的具体外部不正常发育特征包括 1) 发育延迟 (复眼着色过程推迟); 2) 翅/足缺失; 3) 腹部萎缩; 4) 出房时翅卷曲、不全、或缺失 (图 1: A)。具体比较各处理组的畸形和正常个体发生频次得知: 蜜蜂个体发育畸形率与蜂螨接种数目显著相关 ($P < 0.0001$); 随着蜂螨接种数目

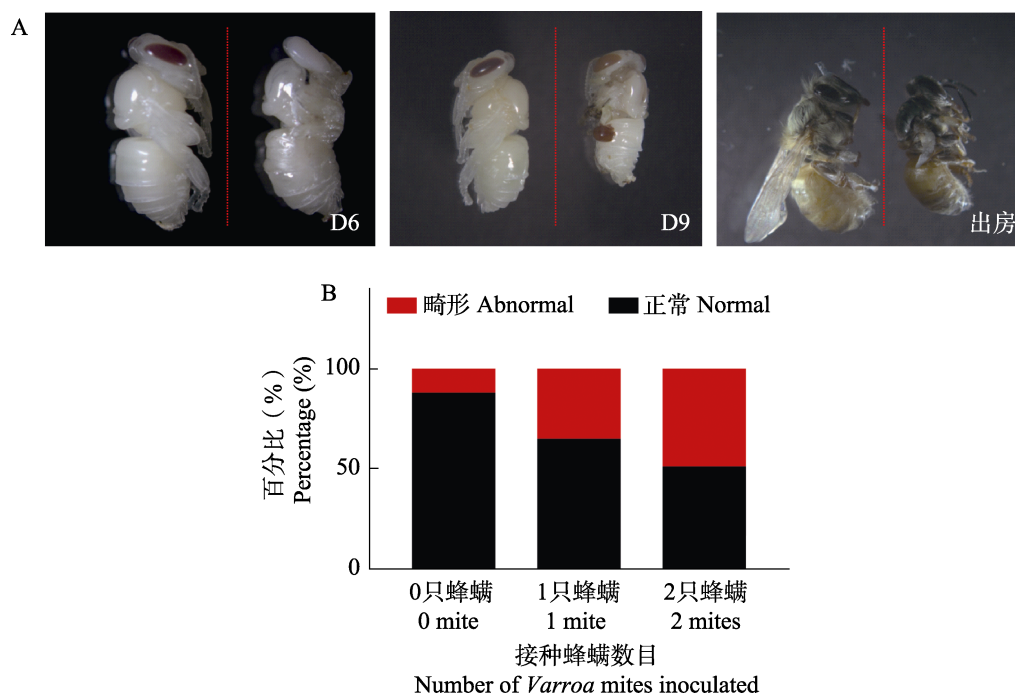


图 1 接种狄斯瓦螨对蜜蜂外部形态的影响

Fig. 1 The effect of *Varroa* inoculation on the appearance of honey bees

A. 不同时间点蜜蜂外部形态观察 (每个时间点的左部显示正常个体, 右部显示畸形个体);

B. 蜜蜂发育形态百分比。

A. The observation of honey bee appearance at different time points (the normal and abnormal individuals are showed in the left and right parts, respectively for each time point);

B. The percentage of different developmental patterns in honey bees.

增加, 不正常发育的蜜蜂个体比例也随之升高 (图 1: B)。

2.2 狄斯瓦螨寄生导致蜜蜂体重降低

通过观察和比较不同数目狄斯瓦螨寄生第 3 天 (D3)、第 6 天 (D6)、第 9 天 (D9) 和出房时寄主的体重变化, 狄斯瓦螨寄生对寄主体重的影响见图 2。结果显示, 自 D6 起, 狄斯瓦螨寄生导致寄主体重显著降低 (D6, $P < 0.001$; D9, $P < 0.001$; 出房, $P < 0.001$), 且该效应与狄斯瓦螨数目存在线性相关性, 而在寄生早期 (D3), 则无此规律 (D3, $P = 0.410$)。

2.3 狄斯瓦螨寄生导致寄主死亡率增高

通过每 24 h 观察和记录寄主死亡数目, 研究狄斯瓦螨寄生对寄主寿命的影响, 生存分析结果如图 3 所示。不同处理的生存分布曲线显著不同 (log-rank test: $\chi^2 = 54.421$, $df = 2$, $P < 0.001$;

Wilcoxon test: $\chi^2 = 46.116$, $df = 2$, $P < 0.001$); 与对照组 (0 mite) 相比, 接种狄斯瓦螨组, 寄主寿命显著缩短, 死亡率增高 (1 mite: $P < 0.001$; 2 mites: $P < 0.001$); 与接种 1 mite 相比, 接种 2 mites 造成更显著的寄主死亡 ($P < 0.01$)。因此, 狄斯瓦螨寄生能导致寄主死亡率增高、寿命缩短, 且该影响与最初感染的蜂螨数目有关。

2.4 狄斯瓦螨寄生对寄主体内 DWV 病毒丰度的影响

通过定量分析狄斯瓦螨寄生后第 3 天、第 6 天、第 9 天和出房时蜜蜂体内 DWV 病毒丰度, 研究狄斯瓦螨接种对寄主体内病毒表达水平的影响 (图 4)。与对照组相比, 除了 D6 外, 其他各观测时间点内, 接种蜂螨组的蜜蜂体内 DWV 相对丰度更高, 且随着蜂螨接种数目增加, 蜜蜂体内 DWV 表达水平也随之升高。在 D9 时, 狄斯瓦螨寄生显著提高了蜜蜂 DWV 丰度 ($P <$

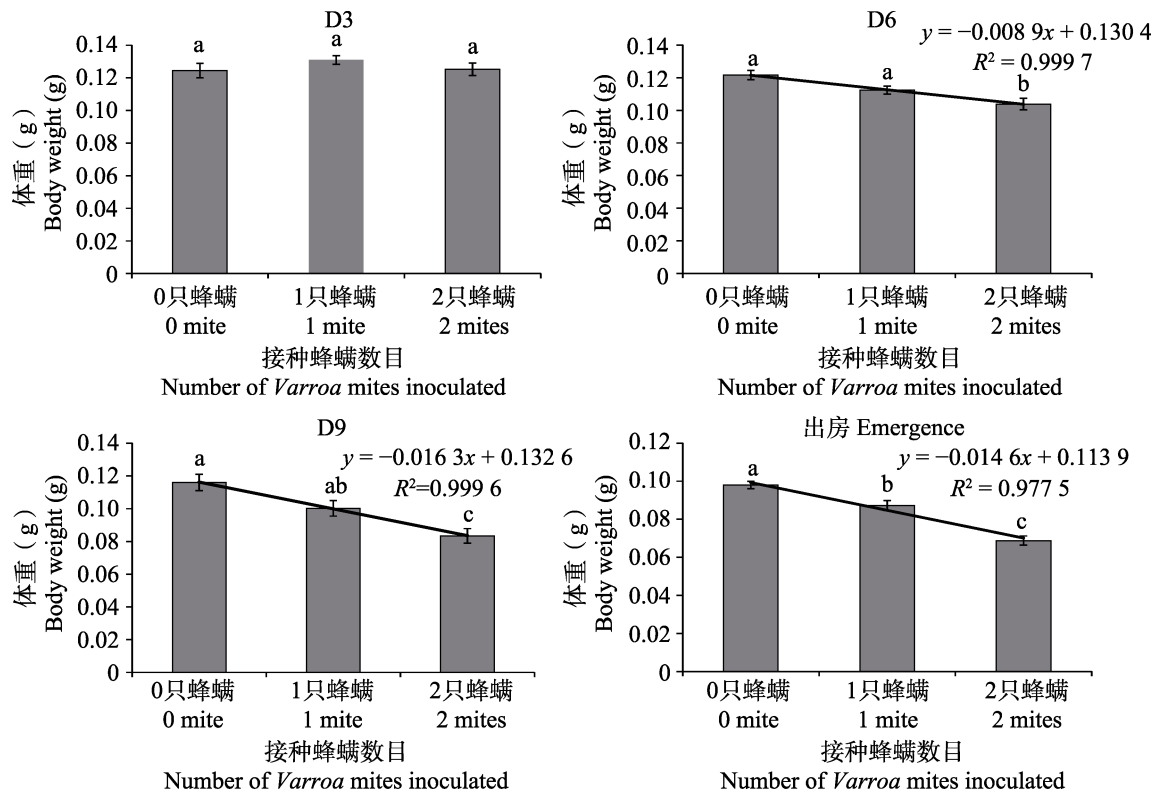


图2 接种狄斯瓦螨后第3天(D3)、第6天(D6)、第9天(D9)和出房时的蜜蜂体重
Fig. 2 Body weight of the honey bees at three days (D3), six days (D6), and nine days (D9) post *Varroa destructor* inoculation and at emergence

柱上标记不同字母表示经 Tukey HSD 多重比较检验各处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。
Histograms with different letters show significant difference by Tukey HSD tests ($P < 0.05$). The same below.

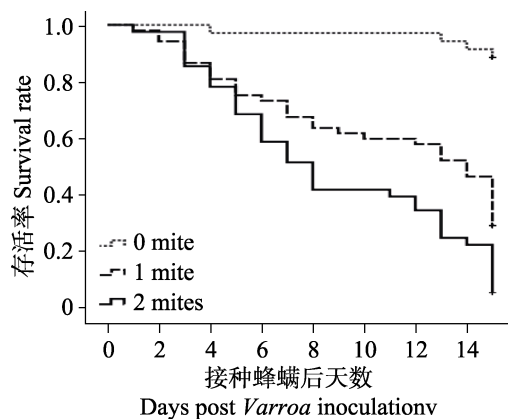


图3 接种狄斯瓦螨对寄主寿命的影响
Fig. 3 Effect of *Varroa* inoculation on the life span of honey bee hosts

0.05), 且蜜蜂 DWV 表达水平与蜂螨数目显著正相关 ($P < 0.01$), 表明狄斯瓦螨能促进 DWV 在蜜蜂体内传播或增殖。另外, 狄斯瓦螨和寄主的 DWV 表达丰度关联分析表明: 狄斯瓦螨体内的 DWV 表达水平与寄主体内的 DWV 表达水平显

著正相关 ($P < 0.001$) (图 5)。

3 讨论

自从西方蜜蜂成为狄斯瓦螨的新寄主之后, 在很短的时间内, 借助世界贸易交流活动, 狄斯瓦螨分布就从起初的东亚地区逐渐扩展到全球几乎所有地区的西方蜜蜂蜂群中, 并对蜂群健康构成了重要威胁 (De Jong *et al.*, 1982b; Rosenkranz *et al.*, 2010)。狄斯瓦螨对蜜蜂造成的危害是多阶段和多层次的; 无论是在幼年期和成年期, 还是在个体水平和群体水平, 都可见显著甚至是致命的影响 (Boecking and Genersch, 2008; Le Conte *et al.*, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010)。蜜蜂个体在幼年期的发育缺陷势必影响成年期的生命活动; 群体中, 产生健康缺陷甚至遭受死亡的个体累积到一定数量时必然威胁到群体的整体健康和生存。本研究集中观察和分析

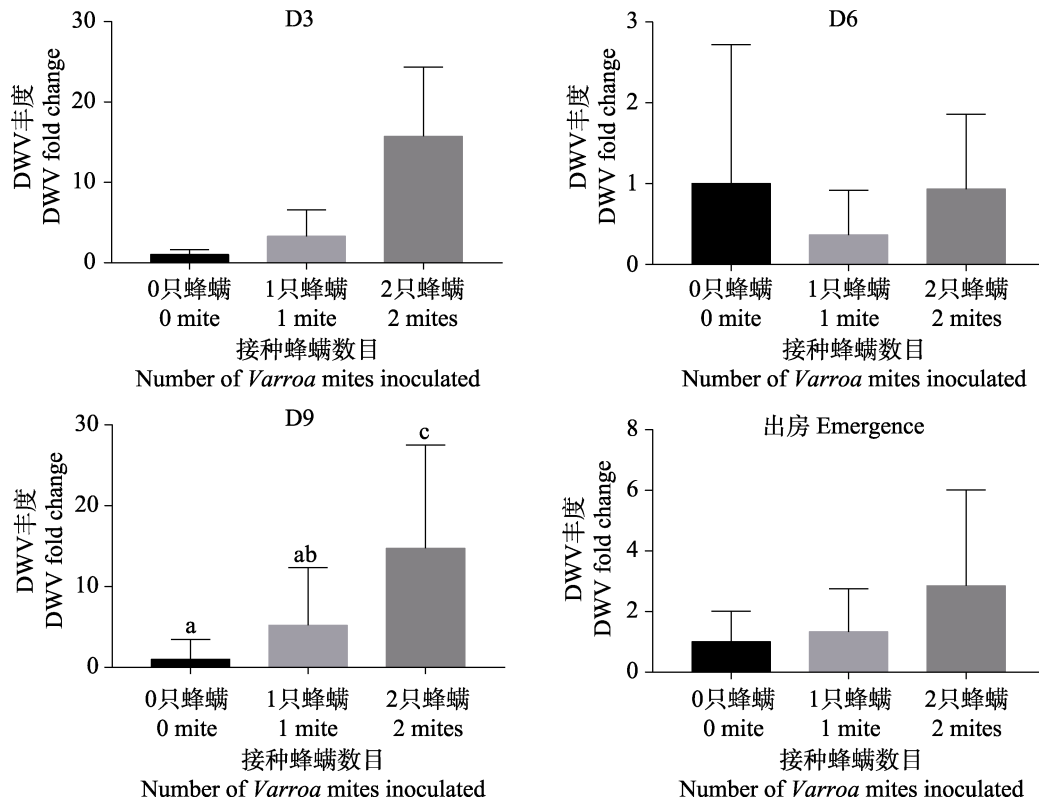


图 4 接种狄斯瓦螨后第 3 天 (D3)、第 6 天 (D6)、第 9 天 (D9) 和出房时的蜜蜂体内 DWV 病毒丰度
Fig. 4 DWV abundance of the honey bees at three days (D3), six days (D6), and nine days (D9) post *Varroa destructor* inoculation and at emergence

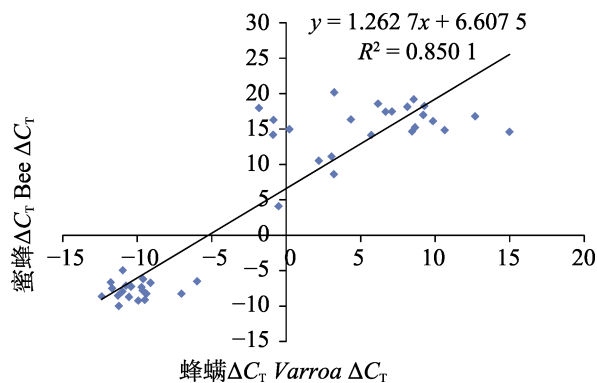


图 5 DWV 在蜂螨和寄主体内表达丰度相关性
Fig. 5 The correlation of DWV abundance between *Varroa* mites and the parasitized hosts

狄斯瓦螨对蜜蜂幼年期发育的影响,在前人研究的基础上,更深入地揭示了狄斯瓦螨作用于蜜蜂幼年发育过程的发生、发展规律。

为了在不干扰蜂螨活动的前提下更清楚地观察寄主发育状态,本研究采用了与早期相似研究不一样的培养方法 (De Jong *et al.*, 1982a; Bowen-Walker and Gunn, 2001; Pedro *et al.*,

2003),即使用狄斯瓦螨空心胶囊体外培养系统 (Nazzi and Milani, 1994; Piou *et al.*, 2016; Egekwu *et al.*, 2018)。借助该系统,可以方便观察到各细分时间点内的蜜蜂发育情况。同时,由于培养全过程都是在人工可控环境下进行,有效避免因自然环境中的额外因素对观测结果的干扰。

本研究发现,发育不正常的蜜蜂个体比例与蜂螨接种数目显著正相关,这与 Bowen-Walker and Gunn (2001) 的研究结果相一致。不同的是,本研究中的发育畸形个体比例 (总体 29.1%) 明显高于 De Jong 等 (1982a) 及 Bowen-Walker and Gunn (2001) 的报道结果 (<10%); 特别地,本研究中无螨对照组的发育畸形个体比例达到 12.0%,而前人结果显示未被蜂螨侵染的蜜蜂没有或极低可能 (<2%) 产生发育畸形 (Bowen-Walker and Gunn, 2001; Yang and Cox-Foster, 2005; de Guzman *et al.*, 2013)。已知蜜蜂发育畸形的典型症状是翅缺失 (或萎缩),系 DWV

感染导致的结果,且在无狄斯瓦螨寄生时,DWV在寄主体内一般处于隐性感染状态(Covert infection)而不会出现明显症状(de Miranda and Genersch, 2010)。可以推测不同时间和地域的蜜蜂个体与狄斯瓦螨自身所携带的DWV病毒平均滴度不同,或者病毒株不同(Ryabov *et al.*, 2014, 2017),导致在狄斯瓦螨作用下显示出来的畸形比例不同。实际原因还有待进一步证实。

与以往的研究结果一样,本研究中的蜜蜂个体在新出房时呈现典型的畸形表征,即翅卷曲、不全或缺失、腹部萎缩等(De Jong *et al.*, 1982a; Bowen-Walker and Gunn, 2001)。然而,与上述研究结果不同的是,本研究除了观察出房时的表征之外,还对具体发育过程的若干节点进行了仔细观察,发现了更多不正常表征,其中最重要的发现是蜜蜂发育延迟这一典型特征,具体表现为复眼着色延迟(图1:A)。另外,还发现翅/足等附肢完全缺失的畸形个体(图1:A)。其中,个体发育迟缓、翅发育不良等表征从狄斯瓦螨寄生第6天开始显现;腹部萎缩、个体体积小等表征在狄斯瓦螨寄生第9天即清晰可见。因此,出房时的若干发育不正常表征是在发育过程中逐渐形成的。相比翅发育不良由DWV病毒引起,个体发育迟缓(复眼着色延迟)、个体小以及腹部萎缩等特征更可能由寄主营养不良造成,即由狄斯瓦螨自身取食直接引起的。

本研究表明狄斯瓦螨寄生导致蜜蜂初生重降低,且该效应与开始寄生的蜂螨数目显著负相关。进一步分析寄生过程中的若干节点蜜蜂个体体重变化规律,有趣的是在狄斯瓦螨寄生第6天和第9天,寄主体重变化呈现与出房时的一致,而在相对较早的狄斯瓦螨寄生第3天,处理组与对照组之间蜜蜂个体体重没有差异(图2)。蜜蜂体重降低与狄斯瓦螨从寄主摄取营养相关联。研究表明狄斯瓦螨在完成巢房入侵后不久即开始取食(Rosenkranz *et al.*, 2010)。为方便自己和后代取食,母亲螨通常会在寄主(蛹)第5节表皮打孔,制造一个取食区(Feeding zone)(Rosenkranz *et al.*, 2010)。最近,另有研究显

示雌性螨可能不会仅在蜂蛹表皮的固定位置打一个孔,而是在多个位置制造多个取食孔;不过,仍然偏好腹部开孔(Egekwu *et al.*, 2018)。狄斯瓦螨可在16 h内进行23-33次取食,每次取食持续约10 s(Li *et al.*, 2019)。另外,狄斯瓦螨平均每天发生约18次排泄;根据排泄物体积测算蜂蛹每天需要从寄主取食约1 μ L的营养液(Posada-Florez *et al.*, 2018)。因此,自从被狄斯瓦螨寄生之日起,寄主每天都将失去相当量的营养物质,而持续性的营养不足,且无法得到补充势必导致寄主体重不断下降,以及发育迟缓等问题。

由狄斯瓦螨寄生引发的临床症状称之为瓦螨病(Varroosis)(Boecking and Genersch, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010)。狄斯瓦螨本身是瓦螨病的首要致病因素,而依赖狄斯瓦螨为载体进行传播的多种病毒则构成了瓦螨病的次级致病因素(Boecking and Genersch, 2008),而且狄斯瓦螨和DWV病毒之间形成了互惠共生关系,共同对寄主产生危害(Di Prisco *et al.*, 2016)。研究发现,狄斯瓦螨数目与寄主DWV表达水平显著正相关(Shen *et al.*, 2005)。本研究亦得到一致的结论。有趣的是,本研究还发现狄斯瓦螨DWV表达水平与蜜蜂DWV表达水平显著正相关。狄斯瓦螨可导致寄主免疫抑制,从而激活寄主体内DWV病毒复制(Shen *et al.*, 2005; Yang and Cox-Foster, 2005)。另一方面,DWV病毒在狄斯瓦螨体内也能增殖,然后借助狄斯瓦螨的载体功能,传播到蜜蜂体内,使得其病毒滴度提高(Yue and Genersch, 2005; Chen *et al.*, 2006)。

我国是世界性养蜂大国,蜂群饲养量约1 000万群。在几代养蜂工作者不懈努力下,我国养蜂业取得了长足发展。同时,在蜜蜂生物学研究方面也取得了一系列重要学术成果(曾志将, 2020)。然而,我国养蜂生产仍然面临着来自狄斯瓦螨的严重威胁。除了不断深入认识狄斯瓦螨病理学之外,我国科技工作还在蜜蜂抗狄斯瓦螨机制研究、蜜蜂抗螨育种以及利用中草药精

油防治蜂螨等方面做出了积极贡献(潘娇等, 2012; 苏晓玲等, 2012, 2016)。

参考文献 (References)

- Aizen MA, Harder LD, 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19(11): 915–918.
- Boecking O, Genersch E, 2008. Varroosis-the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(2): 221–228.
- Bowen-Walker PL, Gunn A, 2001. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3): 207–217.
- Chen Y, Evans J, Feldlaufer M, 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3): 152–159.
- Chen YP, Siede R, 2007. Honey bee viruses//Karl Maramorosch AJS, Frederick AM (eds.). *Advances in Virus Research*. Volume 70. New York: Academic Press. 33–80.
- de Guzman LI, Khongphinitbunjong K, Rinderer TE, Tarver MR, Frake AM, 2013. A laboratory technique to study the effects of *Varroa destructor* and viruses on developing worker honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 52(5): 262–263.
- De Jong D, De Jong PH, 1983. Longevity of africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, 76(4): 766–768.
- De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS, 1982a. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21(3): 165–167.
- De Jong D, Morse RA, Eickwort GC, 1982b. Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 27(1): 229–252.
- de Miranda JR, Genersch E, 2010. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(Suppl.): S48–S61.
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH, 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1184–1191.
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, Caprio E, Nazzi F, Pennacchio F, 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12): 3203–3208.
- Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD, 2013. Standard methods for *varroa* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1–54.
- Egekwu NI, Posada F, Sonenshine DE, Cook S, 2018. Using an in vitro system for maintaining *Varroa destructor* mites on *Apis mellifera* pupae as hosts: studies of mite longevity and feeding behavior. *Experimental and Applied Acarology*, 74(3): 301–315.
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.
- Gregory PG, Evans JD, Rinderer T, de Guzman L, 2005. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science*, doi: 10.1093/jis/5.1.7.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608): 303.
- Kulhanek K, Steinhauer N, Rennich K, Caron DM, Sagili RR, Pettis JS, Ellis JD, Wilson ME, Wilkes JT, Tarpy DR, Rose R, Lee K, Rangel J, van Engelsdorp D, 2017. A national survey of managed honey bee 2015-2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 56(4): 328–340.
- Kurze C, Routtu J, Moritz RFA, 2016. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, 119(4): 290–297.
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W, 2010. *Varroa* mites and honey bee health: Can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3): 353–363.
- Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpy DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, Skinner JA, Wilkes JT, Sagili R, van Engelsdorp D, for the Bee Informed P, 2015. A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3): 292–305.
- Li AY, Cook SC, Sonenshine DE, Posada-Florez F, Noble NII, Mowery J, Gulbranson CJ, Baughan GR, 2019. Insights into the feeding behaviors and biomechanics of *Varroa destructor* mites on honey bee pupae using electropenetrography and histology. *Journal of Insect Physiology*, 119(2019): 103950.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC, 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086): 1101–1104.

- 1304–1306.
- Moore J, Jironkin A, Chandler D, Burroughs N, Evans DJ, Ryabov EV, 2011. Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *Journal of General Virology*, 92(1): 156–161.
- Mutti NS, Dolezal AG, Wolschin F, Mutti JS, Gill KS, Amdam GV, 2011. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *Journal of Experimental Biology*, 214(23): 3977–3984.
- Navajas M, Migeon A, Alaux C, Martin-Magniette M, Robinson G, Evans J, Cros-Arteil S, Crauser D, Le Conte Y, 2008. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics*, 9(1): 1–11.
- Nazzi F, Milani N, 1994. A technique for reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud under laboratory conditions. *Apidologie*, 25(6): 579–584.
- Pan J, Li ZG, Wu LN, Su SK, 2012. Research progress of anti-mite (*Varroa destructor*) in honeybee. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1360–1365. [潘娇, 李志国, 吴俐楠, 苏松坤, 2012. 蜜蜂抗狄斯瓦螨机制的研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1360–1365.]
- Pedro D, David De J, Wolf E, 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 34(1): 61–65.
- Piou V, Tabart J, Urrutia V, Hemptinne JL, Vétillard A, 2016. Impact of the phoretic phase on reproduction and damage caused by *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) to its host, the European honey bee (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE*, 11(4): e0153482.
- Posada-Florez F, Sonenshine DE, Egekwu NI, Rice C, Lupitsky R, Cook SC, 2018. Insights into the metabolism and behaviour of *Varroa destructor* mites from analysis of their waste excretions. *Parasitology*, 146(4): 527–532.
- Ramsey S, Gulbranson CJ, Mowery J, Ochoa R, van Engelsdorp D, Baughan G, 2018. A multi-microscopy approach to discover the feeding site and host tissue consumed by *Varroa destructor* on host honey bees. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1): 1258–1259.
- Ramsey SD, Ochoa R, Baughan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, van Engelsdorp D, 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5): 1792–1801.
- Rath W, 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2/3): 97–110.
- Ratnieks FLW, Carreck NL, 2010. Clarity on honey bee collapse? *Science*, 327(5962): 152–153.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(Suppl. 1): S96–S119.
- Ryabov EV, Childers AK, Chen Y, Madella S, Nessa A, van Engelsdorp D, Evans JD, 2017. Recent spread of *Varroa destructor* virus-1, a honey bee pathogen, in the United States. *Scientific Reports*, 7(1): 17447.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans DJ, 2014. A Virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission. *PLoS Pathogens*, 10(6): e1004230.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108.
- Seitz N, Traynor KS, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Ellis JD, Rose R, Tarpy DR, Sagili RR, Caron DM, Delaplane KS, Rangel J, Lee K, Baylis K, Wilkes JT, Skinner JA, Pettis JS, van Engelsdorp D, 2016. A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4): 292–304.
- Shen M, Yang X, Cox-Foster D, Cui L, 2005. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342(1): 141–149.
- Spleen AM, Lengerich EJ, Rennich K, Caron D, Rose R, Pettis JS, Henson M, Wilkes JT, Wilson M, Stitzinger J, Lee K, Andree M, Snyder R, van Engelsdorp D, 2013. A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States: Results from the bee informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 52(2): 44–53.
- Steinhauer N, Kulhanek K, Antúnez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat MP, van Engelsdorp D, 2018. Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science*, 26: 142–148.
- Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, Caron DM, Lengerich EJ, Pettis JS, Rose R, Skinner JA, Tarpy DR, Wilkes JT, van Engelsdorp D, 2014. A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: Results from the bee informed partnership. *Journal of Apicultural Research*, 53(1): 1–18.
- Su XL, Hua QY, Zhao DX, Fei ZH, Zheng HQ, 2016. The effect of essential oils of *Truistar Anisetree* against mites in honeybee colonies. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 38(6): 1251–1255. [苏晓玲, 华启云, 赵东绪, 费中华, 郑火青, 2016. 八角茴香精油防治蜂螨的蜂群效果研究, 环境昆虫学报, 38(6): 1251–1255.]

- Su XL, Zheng HQ, Fei ZH, Hu FL, 2012. Effectiveness of herbal essential oils as fumigants to control *Varroa destructor* in laboratory assays. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1189–1195. [苏晓玲, 郑火青, 费中华, 胡福良, 2012. 中草药精油对蜜蜂狄斯瓦螨的熏杀效果. 应用昆虫学报, 49(5): 1189–1195.]
- van Engelsdorp D, Caron D, Hayes J, Underwood R, Henson M, Rennich K, Spleen A, Andree M, Snyder R, Lee K, Roccasecca K, Wilson M, Wilkes J, Lengerich E, Pettis J, 2012. A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: Results from the bee informed partnership. *Journal of Apicultural Research*, 51(1): 115–124.
- van Engelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis J, 2008. A survey of honey bee colony losses in the U. S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE*, 3(12): e4071.
- van Engelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Caron D, Pettis J, 2011. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, 50(1): 1–10.
- van Engelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis JS, 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, 49(1): 7–14.
- van Engelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(Suppl.): S80–S95.
- van Englesdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes JJ, 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, 147: 599–603.
- Weinberg KP, Madel G, 1985. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 16(4): 421–436.
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJM, Boots M, 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 351(6273): 594.
- Wu JL, Zhou CX, Wu PJ, Xu J, Guo YQ, Xue F, Getachew A, Xu SF, 2017. Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 12(4): e0175573.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21): 7470–7475.
- Yue C, Genersch E, 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 86(12): 3419–3424.
- Zeng ZJ, 2020. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]
- Zhang Y, Han R, 2012. Progress in research of honey bee mite *Varroa destructor*. *Journal of Environmental Entomology*, 34(3): 345–353. [张祎, 韩日畴, 2012. 蜜蜂寄生螨——狄斯瓦螨的研究进展. 环境昆虫学报, 34(3): 345–353.]
- Zhang Y, Liu X, Zhang W, Han R, 2010. Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1207–1218.