



丁兆润, 韩日畴, 张祎. 蜜蜂残翅病研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (4): 863–876.

蜜蜂残翅病研究进展

丁兆润^{1,2}, 韩日畴², 张祎^{2*}

(1, 华南农业大学农学院, 广州 510640; 2, 广东省科学院动物研究所, 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公共实验室, 广州 510260)

摘要: 蜜蜂残翅病病毒 (Deformed Wing Virus, DWV) 是蜜蜂残翅病的病原体, 能够侵染各个发育阶段的蜜蜂, 严重时导致蜂蛹发育缓慢, 成蜂翅膀畸形、体型萎缩、行动乏力, 蜂群早衰; 不严重的隐形感染也会缩短蜜蜂寿命。DWV 借助于狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 在全球广泛传播, 并产生 DWV-B 和 DWV-C 等变体, 它们的共同作用促使蜂群群势急剧衰弱, 是导致“越冬蜂群的消失 (OCL)”和“蜂群崩溃失调症 (CCD)”的主要病因之一, 给养蜂业造成巨大损失, 而目前尚没有特异性的有效治疗药物。DWV 的自身特征、与狄斯瓦螨的关系、以及单独或者和狄斯瓦螨共同作用对蜜蜂的影响等研究都是开发防治技术方法的基础, 本文从生物学、流行病学、病理学和防治技术等方面对残翅病病毒的最新研究成果进行了综述。

关键词: 蜜蜂; 残翅病病毒; 防治

中图分类号: Q968.1; S895.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 04-0863-14

Research progress on deformed wing virus of honey bees

DING Zhao-Run^{1,2}, HAN Ri-Chou², ZHANG Yi^{2*} (1. South China Agricultural University, School of Agriculture, Guangzhou 510640, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Science, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Deformed wing virus (DWV) causes honey bee wings deformity and infects honeybees. The transmission of DWV by *Varroa destructor* to the developing pupae causes clinical symptoms, including pupal death and adult bees emerging with deformed wings, a bloated, shortened abdomen and discolouration. In the absence of *V. destructor* DWV infection does not result in visible symptoms or any apparent negative impact on host fitness. DWV is widespread in the world co-effected with *V. destructor* and becomes one of main factors for the overwintering colony loss (OCL) or colony collapse disorder (CCD) which cost a lot of apiculture and without effective control solutions. Obviously, it's important to study the characters of DWV, the interactions with *V. destructor* or honeybees. In this review, the historical and recent data on DWV and its relatives were summarized, covering the biology, epidemiology, pathology and control methods.

Key words: Honey bee; DWV; control

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金-面上项目 (2019A1515012089); 广东省科学院科技发展专项 (2018GDASCX-0107)

作者简介: 丁兆润, 男, 1997年生, 广东汕头人, 硕士研究生, 研究方向为资源利用与植物保护, E-mail: 895518207@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 张祎, 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为蜜蜂病毒鉴定、分离、传播方式及致病机理研究, 外寄生虫狄斯瓦螨对蜜蜂的致死机理研究以及病虫害防治, E-mail: zy3001@163.com

收稿日期 Received: 2020-04-14; 接受日期 Accepted: 2020-05-14

蜜蜂属于膜翅目 Hymenoptera 蜂科 Apidae, 分布于世界各地, 不仅生产蜂蜜、蜂胶、蜂王浆以及其它蜂产品, 更是重要的授粉昆虫, 对全球农业经济发展起到举足轻重的作用。然而, 越冬蜂群的消失 (Overwintering Colony Loss, OCL) 和蜂群崩溃综合症 (Colony Collapse Disorder, CCD) 现象的出现 (Dennis *et al.*, 2007), 引起了人们对蜜蜂的健康和生存的重视。蜂群的消失与栖息地、农药、害虫和病毒等多方面因素有关, 蜜蜂的减少不仅会影响作物授粉, 对粮食安全产生威胁, 还会对植物多样性及生态平衡带来不利影响 (Potts *et al.*, 2010)。

蜜蜂残翅病病毒 (Deformed Wing Virus, DWV) 是西方蜜蜂 *Apis mellifera* 中最常见的病毒。其危害蜜蜂的典型特征是成年蜜蜂翅膀畸形、腹部缩短肿胀、行动乏力和幼蜂迅速死亡 (de Miranda and Genersch, 2010)。在没有狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 的情况下, 蜂群中 DWV 病毒水平低, 呈无症状感染。在狄斯瓦螨寄生的蜂群中, DWV 滴度明显上升, 呈显性症状感染, 群势削弱, 甚至死亡消失 (Kovac and Crailsheim, 1988; de Miranda and Genersch, 2010)。DWV 和狄斯瓦螨的相互作用导致西方蜜蜂大量消失的现象, 受到世界蜜蜂学家的广泛关注。DWV 是单链 RNA 病毒, 基因组约 10 kb, 感染力强, 易变异, 在狄斯瓦螨的媒介作用下, 不断扩大着寄主范围, 并且演化出新的变异体, DWV-A、DWV-B 和 DWV-C (Ongus *et al.*, 2004; Zioni *et al.*, 2011; Mordecai *et al.*, 2016a)。本文将从 DWV 的生物学、流行病学、病理学和防治技术 4 个方面进行综述。

1 生物学

1.1 病毒结构

根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 分类, DWV 属于小核糖核酸病毒目 *Picornavirales* 传染性

软化病毒科 *Iflaviridae*, 传染性软腐病病毒属 *Iflavirus* (Valles *et al.*, 2017)。如图 1 所示, DWV 是单链正链 RNA 病毒, 其基因组是单顺反子, 总长度为 10 140 bp (不含 PolyA 长度时), 仅有一个连续开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)。基因组的 5'UTR 长 1 144 bp, 3'UTR 长 338 bp, 5'UTR 和 3'UTR 都参与了基因组的复制和翻译。N 端包括核糖体翻译起始位点 (Internal Ribosome Entry Site, IRES) 和先导蛋白 (Leader protein, Lp) 以及 4 个结构蛋白, VP1 (44 kDa)、VP2 (32 kDa)、VP3 (28 kDa) 和 VP4。C 端包括 RNA 解旋酶 (Helicase)、病毒基因组连接蛋白 (Viral Protein genome linked, VPg)、3C-蛋白酶 (Chymotrypsin-like 3C protease, 3C-pro) 以及 RNA 聚合酶 (RdRp), 其末端有多聚 A 尾巴 (PolyA) (Lanzi *et al.*, 2006; Nakashima and Uchiumi, 2009; Dalmon *et al.*, 2017)。

DWV 的 5'端与 *Iflaviridae* 属的其他病毒相比, 具有高度的多样性 (Murakami *et al.*, 2014)。5'UTR 有一个类似四叶草形状的二级结构 IRES, 与翻译的启动有关。IRES 的存在使得许多小核糖核酸病毒目病毒可以通过阻断帽子依赖 (Cap-dependent) 的翻译起始, 从而抑制宿主细胞蛋白的合成, 但不影响病毒蛋白的合成, 这有利于病毒应对宿主防御机制 (Fernández *et al.*, 2013)。Lp 具有多种功能, 包括蛋白酶活性, 在氨基酸水平高度可变。有研究发现 DWV 与其变异体 VDV-1 差异最大位置是 Lp, 同源性最低只有 73.9% (Dalmon *et al.*, 2017)。VPg 不仅有稳定基因组的作用, 还参与了复制和翻译等过程 (Hébrard *et al.*, 2009)。3'UTR 区域高度保守, 末端以共价的方式连接 PolyA, PolyA 的长度由遗传决定。图 1 显示核苷酸标度及各元件相应核苷酸数量; 非结构蛋白在上方, 结构蛋白在下方; 箭头表示一些关键的重组区域, 包括 DWV 基因组 Helicase、5'UTR 和 Lp 编码的区域。

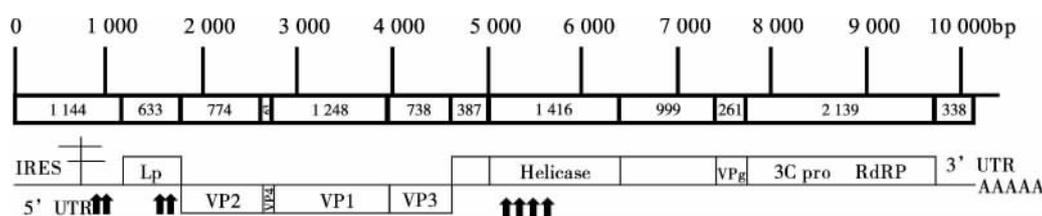


图 1 DWV 基因组的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of DWV genome

注: 根据文献 Lamp *et al.*, 2016 和 Dalmon *et al.*, 2017 修改。

通过冷冻电子显微镜 (Cryo-Electron Microscopy) 和 X 射线晶体学发现 DWV 是轻微的椭球体结构, 其直径约 30 nm, 病毒衣壳为对称的伪 T3 二十面体, 不含脂膜 (Škubník *et al.*, 2017)。结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的亚基排列成原聚体, 在衣壳蛋白上每 5 个原聚体形成一个单位, 五聚体的封闭和开放控制着病毒的释放过程 (Organtini *et al.*, 2017), 衣壳蛋白在保护病毒 RNA 不被 RNA 酶降解和确定病毒宿主的特异性等方面也起着重要作用。当环境 pH 改变或者在高浓度的非生理性离子条件下, DWV 的衣壳三维结构会发生变化, 特别是衣壳蛋白 VP3 的 C 末端延伸在病毒表面形成的 p-结构域, 表现为突出球状延伸; 病毒衣壳构象的变化, 可能会产生新的催化位点, 从而影响病毒进入宿主细胞 (Organtini *et al.*, 2017; Škubník *et al.*, 2017)。Picornavirales 的大多数病毒基因组编码的小蛋白 VP4 已经被证明参与了细胞膜通透性的改变, 例如吸血猎椿病毒 (Triatoma Virus, TrV) 的 VP4 小蛋白插入膜中, 形成新的蛋白通道, 而当 pH 值越高时, 膜的渗透性也越高 (Sánchez-Eugenia *et al.*, 2015), DWV 中的 VP4 小蛋白也可能影响着膜的透性。

1.2 病毒变异及进化关系

RNA 病毒具有很高的突变率, 变异后的毒株共同存在并感染寄主的现象是病毒感染的特征之一, 影响着病毒的复制、传播和疾病诱导等过程。目前发现 DWV 主要有 3 种基因型: DWV-A、DWV-B 和 DWV-C (Lanzi *et al.*, 2006; Zioni *et al.*, 2011; Mordecai *et al.*, 2016a)。

图 2-a 显示了基于 RdRp 的氨基酸序列保守区域的贝叶斯系统进化推理, 节点上显示贝叶斯支持值。根据系统发育学分析, DWV 各基因型的亲缘性不同, DWV-A 与 DWV-B 亲缘性较近, 属于同一分支, DWV-C 虽然与 DWV-A 和 DWV-B 不属于同一分支, 但相比于囊状幼虫病毒 (Sacbrood Bee Virus, SBV), 与 DWV-A 和 DWV-B 的亲缘性更近。

DWV 最初基因, 现在称为 DWV-A 基因型, 包括先前大部分 DWV 序列和 Kakugo 病毒 (KV) (Lanzi *et al.*, 2006)。通常, 在无狄斯瓦螨的蜂群中, DWV 表现为低水平, 无症状感染, 然而狄斯瓦螨存在时, 会导致 DWV 的载量显著增加, 流行率上升, 呈现明显症状 (Ryabov *et al.*, 2014)。早先研究发现, 诱导显性感染的狄斯瓦螨体内的

DWV 水平, 远高于诱导隐形感染的狄斯瓦螨的 DWV 水平, 暗示着 DWV 在狄斯瓦螨体内复制到一定阈值, 才能表现出致病症状 (Gisder *et al.*, 2009)。而其他的研究则发现狄斯瓦螨体内的 DWV 水平呈高度动态, 主要由狄斯瓦螨取食过程决定, 而不是依赖狄斯瓦螨体内的复制。取食低 DWV-A 水平蜂蛹的狄斯瓦螨传代后, 子代螨传播 DWV-A 的能力下降, 说明 DWV-A 进化更倾向于寄生蜜蜂, 而不是寄生狄斯瓦螨 (Posada-Florez *et al.*, 2019)。

DWV-B 包括狄斯瓦螨病毒 (VDV-1) 以及 VDV-1-DWV 重组体。VDV-1 是从狄斯瓦螨组织中分离到的类病毒, 与 DWV 具有 84% 的核苷酸同源性, 差异主要集中在 5'UTR 区域。VDV-1 能和 DWV 共同感染蜜蜂, 并与 DWV-A 发生基因重组, 产生重组体 VDV-1-DWV, VDV-1-DWV 是强毒株型, 导致蜜蜂残翅 (Ongus *et al.*, 2004; Zioni *et al.*, 2011)。

蜂群中一种基因型的流行导致了另一种基因型不占优势, 这种现象叫“重复感染排除”, 新产生的变异体一定程度上保护了蜂群 (Mordecai *et al.*, 2016b)。例如, DWV-B 的出现与狄斯瓦螨的流行关系密切, 并且因为狄斯瓦螨的存在导致了病毒遗传多样性的快速下降 (Martin *et al.*, 2012)。然而关于 DWV 多样性变化以及变异体之间相互排斥、相互竞争的观点还存在争议。病毒与宿主之间始终是在相互适应, 不断进化的过程中。有研究发现, 即使在有狄斯瓦螨的蜂群中, 依然存在 DWV 的高度多样性。通过反向遗传学实验发现, 不同变异体的复制频率相似, 而且广泛存在重组现象, 但缺乏协同效应和排斥竞争效应, 这种病毒高度共存的现象, 是 DWV 不断适应宿主的结果, 有利于病毒形成抗 RNA 干扰能力, 来应对宿主的防御机制 (Ryabov *et al.*, 2019)。

DWV-C 与前面描述的 DWV-A 和 DWV-B 不同, 是一个新的、独立的分支。从英格兰南部德文郡地区的蜂群中, 采集经历越冬群落损失后存活的无症状蜜蜂样本, 进行双末端测序, 发现新的 DWV 变异体, 命名为 DWV-C (Mordecai *et al.*, 2016a)。

图 2-b 显示了 DWV 变异体的同源百分比单位矩图: 氨基酸 (下划横线); 核苷酸 (无下划横线)。DWV-C 与 DWV-A 和 DWV-B 在核苷酸序列和氨基酸序列都存在差异, 并且存在 A 型与 C 型

重组或者 B 型与 C 型重组现象。在蜜蜂蜂群中, 狄斯瓦螨传播的 DWV 变异体主要是 B 型, 而与 C 型无关。而对欧洲越冬消失的蜂群样本进行 DWV 三种变异体检测发现, DWV-C 是越冬蜂群消失最后一个月优势基因型, 暗示着 DWV-C 影响着越冬蜂群消失 (Kevill *et al.*, 2017)。更多地区的样本调查显示, DWV-C 在流行性和病毒载量方

面, 与 DWV-A 和 DWV-B 相比, 呈较低水平 (Kevill *et al.*, 2019)。然而, 在调查巴西的无刺蜂 *Melipona subnitida* 蜂群时发现, 蜂群广泛存在 DWV-C, 且表现为显性变异, 这表明不同的寄主生物对不同 DWV 变异体的敏感性可能不同, 这也影响着 DWV 变异体在不同寄主间的流行情况 (de Souza *et al.*, 2019)。

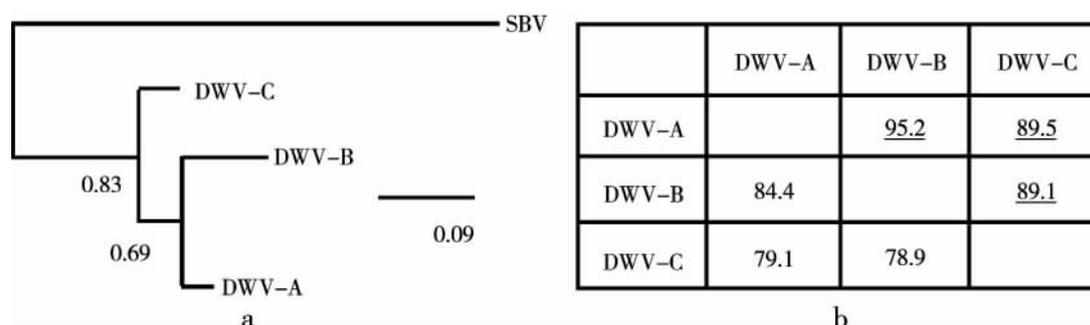


图2 三种基因型的进化关系及同源性

Fig. 2 Phylogeny and homology analysis of three genotypes

注: 根据文献 Mordecai *et al.*, 2016a 和 Martin and Brettell, 2019 修改。

1.3 DWV 的研究方法

1.3.1 DWV 病毒粒子形态观察

DWV 是 RNA 病毒, 有变异、重组以及隐形感染现象, 诊断存在困难。与其他病原体相比, DWV 的颗粒极其微小, 普通的光学显微镜无法观察, 通过透射电镜, 才能观察到纯化后病毒颗粒的形态特征, 然而这只能较为精确地测定 DWV 的大小、形状及相对位置, 结合 X 射线晶体学才能够进一步分析 DWV 的三维结构 (Škubník *et al.*, 2017), 但还无法精确区分病毒的种类。

病毒粒子的形态观察建立在病毒粒子的分离纯化基础上, 氯化铯浓度梯度超速离心法是分离纯化蜜蜂病毒的常用技术, 具体步骤如下 (Fannon and Ryabov, 2016):

1) 收集 5 g 蜜蜂 (一般采集症状明显、发育不良的残翅成年蜜蜂比较容易分离到病毒粒子), 在研钵中加入 35 mL PBS 缓冲液 (100 mM PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4), 研磨均匀。

2) 4℃, 10 000 rpm 离心 12 min。去除上层脂质层和底部未完全研磨组织颗粒层, 保留中间层。

3) 准备一个 30 mL 离心管, 里面加入 2.5 mL 20% 蔗糖溶液 (蔗糖用 PBS 缓冲液配制), 随后加入上述中间层溶液, 不要混匀, 置于上层, 这样超速离心过程中上层中的病毒粒子可以穿过 0.5 cm 的蔗糖层到达底部。

4) 18℃, 28 000 rpm 离心 3 h 30 min (SW28 Beckman 角转头)。弃上层, 收集底部沉淀, 重悬于 2 mL PBS 缓冲液, 4℃ 过夜, 以便充分重悬病毒粒子。

5) 制备氯化铯梯度溶液。35 mL 超速离心机专用离心管, 从底部往上依次加入 5 mL 密度为 1.6 g/cm³、1.5 g/cm³、1.4 g/cm³、1.3 g/cm³ 和 1.2 g/cm³。不同密度的氯化铯溶液都是加 PBS 缓冲液稀释饱和氯化铯溶液而得。最后将上一步所得的病毒粒子溶液加在最上层。

6) 4℃, 28 000 rpm 离心 18 h (SW28 Beckman 水平转头)。

7) 收集每个间隔层的 1.5 mL 溶液, 主要可能存在于 1.3 ~ 1.4 g/cm³ 的间隔层, 混合所有收集到的溶液, 用 PBS 缓冲液稀释 5 ~ 10 倍。

8) 4℃, 28 000 rpm 离心 3 h (SW28 Beckman 角转头), 收集底部沉淀, 重悬于 200 μL 0.1 M, pH 7.4 的 PBS 缓冲液。-80℃ 保存备用。

1.3.2 DWV 的分子鉴定

通过电镜观察到病毒颗粒的形态特征后, 还需要分子生物学技术来明确病毒的种类。免疫学检测是利用针对病毒衣壳蛋白高度特异性抗体作为探针, 来定性和定量检测病毒。目前, 多采用酶联免疫技术来检测 DWV, 然而这种方法只适用于检测高浓度的 DWV, 当不同病毒的基因同源性

较高时, 免疫学检测的特异性较差。利用分子技术检测不同病毒核苷酸序列的差异, 可以准确地鉴定出病毒的种类。

在蜜蜂残翅病的诊断中, 反转录聚合酶链式反应技术 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 应用最广泛。RT-PCR 将 RNA 的反转录和 cDNA 的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合, 是一种针对目的产物 RNA 的核酸分子检测技术。其原理是 RNA 单链在逆转录酶的作用下合成互补 DNA (cDNA), 随后以 cDNA 为模板, 在引物和 DNA 聚合酶的作用下, 不断进行目的基因的循环扩增, 因此可以检测较低水平的 DWV 样本, 具有很高的灵敏性 (Lanzi *et al.*, 2006)。

随着分子技术的发展, 新的 PCR 技术也不断应用于蜜蜂病毒病的诊断, 如定量 PCR (Quantitative PCR) 能对 DWV 等 RNA 病毒浓度进行定量检测, 来研究病毒载量与危害症状的关系 (Highfield *et al.*, 2009); 多重 PCR (Multiplex PCR) 可以同时检测多重病毒 (Sguazza *et al.*, 2013), 提高检测的效率; 巢氏 PCR (Nested PCR) 通过两轮 PCR 来提高反应的特异性 (Fannon and Ryabov, 2016)。目前, 基于 PCR 的核酸分子检测技术相比于传统免疫学检测技术, 具有高效、精确和低成本等优势, 已广泛应用到蜜蜂病毒学的研究工作中。高通量测序是目前用于发现新病毒的主要技术, DWV 的几种变异体都是通过高通量测序而发现的 (Moore *et al.*, 2011)。

1.3.3 DWV 的体内复制示踪

为研究 DWV 的致病机制, 需要研究病毒在体内的分布复、制繁殖以及对组织细胞的危害。链特异性逆转录 (Strand specific RT-qPCR) 是用于特异性检测病毒的反义链, 结合 TaqMan 定量 PCR 技术则可以方便的检测到 DWV 是否在宿主体内复制及其繁殖量 (Boncristiani *et al.*, 2009), 但是无法直观观察病毒在宿主的具体组织和具体位置的复制繁殖。利用原位杂交技术 (In-situ hybridization) 可检测 DWV 在蜜蜂大脑内的复制, 分别使用正链和反义链探针, 检测 DWV 的反义链基因组和正链基因组, 结果显示在视觉神经网络、蘑菇体和触角神经叶都检测到 DWV 正链信号, 同时也都有稍弱的反义链信号, 说明 DWV 在蜜蜂大脑内成功复制繁殖 (Shah *et al.*, 2009)。而免疫组化技术也应用到检测 DWV 是否在狄斯瓦螨体内繁殖, 结果没有在狄斯瓦螨的组织内检测到 DWV 特

异性反应指示信号, 只在中肠腔内的粪便上检测到 (Teresa *et al.*, 2008)。以上技术都非常确定可以检测 DWV 反义链, 说明 DWV 确实发生了复制和繁殖, 但是都杀死了目标昆虫, 是在非活体组织上研究。如何能够在活体观察 DWV 的繁殖呢? 2019 年, 通过构建重组 DWV 基因组并在起始位置加上 eGFP 标记蛋白, 可以非常直观的在荧光显微镜下观察 DWV 的去向以及复制增殖 (Ryabov *et al.*, 2020)。这项技术是美国农业部蜜蜂研究所 (USDA-ARS, Bee Research Lab) 的最新研究成果。

1.3.4 DWV 基因组体外重组

由于缺乏细胞培养体系、血清学试剂、特定病毒株或克隆株, 尽管经过了几十年的深入研究, 到目前为止, 所有的研究都使用了直接从蜂箱采集的受感染的蜜蜂模型和病毒分离物。

多个病毒株、主变异体甚至种可能同时出现在这些分离物中, 因此可能会得到一些错误的结论。构建体外重组病毒 (反向遗传学) 则可以绕过病毒分离和纯化, 在细胞克隆培养系统中生产克隆病毒。有实验选择 DWV-A 1414 株作为目标病毒株, 根据 Genbank 中 4 个 DWV-A 的基因组序列 (AJ489744、AY292384、JQ413340、AB070959) 设计了 28 条引物。首先使用巢式 RT-PCR 分段获得基因产物并测序验证序列, 然后分别获得 5' 端和 3' 端两个有重叠区域的大片段, 最后设计一对可扩增全基因组的引物, 使用 One-Step RT-PCR 扩增获得全长。随后将纯化的 10 164 bp DWV-A 的全长序列插入到 pBR322 载体, 转化大肠杆菌 HB101 菌株。在构建过程中, 还在适当的位置插入了酶切位点, 从而提取质粒后可以通过酶切获得线性化病毒用于后续研究 (Lamp *et al.*, 2016)。应用该方法还能构建了多个 DWV 克隆株系, 研究这些混合株系在同一个蜜蜂中的复制动态 (Ryabov *et al.*, 2020)。该技术的应用与发展为病毒的感染与致病机理研究奠定基础。

2 流行病学

2.1 DWV 的发现历史及寄主范围

1977 年, 人们在无症状的埃及蜜蜂身上首次分离出 DWV, 但误认为 DWV 是埃及蜜蜂病毒 (Egypt Bee Virus, EBV) (Bailey *et al.*, 1979)。1982 年在日本畸形成年蜜蜂身上也分离出 DWV,

通过在血清学分析发现 DWV 与 EBV 虽存在亲缘性, 但亲缘关系较远。由于这种分离出的病毒使成年蜜蜂表现出翅膀残缺症状, 因此被命名为残翅病病毒 (DWV) (Bailey and Ball, 1991)。DWV 最初被发现危害英国、拉丁美洲和南非等国家和地区的蜜蜂种群 (Allen and Ball, 1996), 但随着狄斯瓦螨的传播, DWV 的流行范围不断扩大 (Ryabov *et al.*, 2014), 成为目前最流行的蜜蜂病毒, 对 32 个国家的调查显示, 蜂群中 DWV 的平均感染率至少为 55% (Martin and Brettell, 2019)。尽管 DWV 的毒力相对较低, 但在狄斯瓦螨感染过的蜜蜂中, DWV 是持续增殖的, 一旦感染就可能爆发, 导致成蜂残翅以及蜂群损失 (Schroeder and Martin, 2012; Mondet *et al.*, 2014)。

目前, DWV 的宿主涵盖了 10 个目的 68 种节肢动物, 其中 64 种节肢动物属于昆虫纲 Insecta, 包括膜翅目 Hymenoptera、半翅目 Hemiptera、鞘翅目 Coleoptera、双翅目 Diptera、鳞翅目 Lepidoptera、革翅目 Dermaptera 和蜚蠊目 Blattodea 7 个目。4 种节肢动物属于蛛形纲 Arachnida, 包括蜱螨目 Arachnoidea、蜘蛛目 Araneae 和盲蛛目 Opiliones 3 个目 (Martin and Brettell, 2019)。

2.2 DWV 的传播特征

DWV 作为一种专性寄生性生物, 其生存依赖于活体宿主细胞的生命机制。为了不断繁殖, DWV 需要从一个寄主传播到另一个寄主。DWV 的传播包括了水平传播与垂直传播。传播方式决定着 DWV 的存在水平以及增殖速度, 进而影响着 DWV 的毒力大小以及流行情况, 最终表现在对寄主危害程度和宿主范围大小的变化。

2.2.1 水平传播

2.2.1.1 食物源 - 消化道传播

食物源 - 消化道传播是指 DWV 寄主在食用受污染的食物或者通过消化道排出有病毒的粪便后, 发生病毒传播和感染的现象。不管是蜜蜂的食物来源如蜂蜜、蜂王浆、花粉等, 还是蜜蜂体内的胸腺、下咽腺、中肠等部位, 以及蜜蜂排出的粪便, 均检测到 DWV 阳性, 暗示着在蜜蜂取食、喂食、护理幼虫或者清理巢房时, 会发生 DWV 的水平传播 (Yue and Genersch, 2005; Singh *et al.*, 2010)。

花粉是蜜蜂生长发育的主要蛋白质来源, 对蜜蜂的营养代谢有着重要影响。通常情况下, 未被蜜蜂采集的花粉不存在 DWV, 而蜜蜂采集后的花粉检测到 DWV 存在, 说明 DWV 的水平传播可

以通过传粉昆虫的访花过程发生 (Mazzei *et al.*, 2014)。花粉中蛋白质与脂类的比例不同, 也影响着传粉昆虫的觅食偏好性 (Vaudo *et al.*, 2016), 从而影响了 DWV 的水平传播速率。

蚂蚁是 DWV 的寄主之一, 与 DWV 的食物源传播也有着密切关系。野外的蚂蚁 *Myrmica rubra* 经常取食死亡的蜜蜂, 而死亡的蜜蜂体内很有可能携带 DWV (Schlappi *et al.*, 2019), 暗示着食物源传播是 DWV 跨物种水平传播的机制之一。

2.2.1.2 媒介传播

DWV 的最初寄主是西方蜜蜂, 在蜂群中致病力较弱, 存在水平较低, 呈隐性感染存在。而狄斯瓦螨最初寄主是东方蜜蜂 *Apis cerana*, 因其传播到西方蜜蜂蜂群, 才改变了 DWV 流行程度及其多样性, 成为 DWV 最主要的传播媒介 (Möckel *et al.*, 2011; Wilfert *et al.*, 2016)。一方面, 狄斯瓦螨本身的寄生行为, 影响着蜜蜂的健康及生理状态 (张祎和韩日畴, 2012); 另外一方面, 狄斯瓦螨的取食行为, 使 DWV 跨越体壁或围食膜等生理障碍, 直接传播到蜜蜂的血淋巴, 导致蜜蜂的 DWV 水平上升。虽然 DWV 能否在狄斯瓦螨体内复制尚存在争议, 但因狄斯瓦螨寄生和取食的特性, 直接导致了蜂群中 DWV 的快速流行以及多样性的下降, 并且通过蛋白组学, 也证明狄斯瓦螨体内并没有进行 DWV 的复制, 所以 DWV 的多样性主要取决于传播途径而不是是否在狄斯瓦螨体内增殖 (Ryabov *et al.*, 2014; Erban *et al.*, 2015)。DWV 还以狄斯瓦螨为媒介, 实现跨物种水平传播, 如 *Bombus pascuorum* 和 *Bombus terrestris* 等大黄蜂的蜂群已存在 DWV 的流行, 并且发生着 DWV 的不同变异体的流行性以及毒力的改变 (Manley *et al.*, 2019)。

此外, 梅氏热厉螨 *Tropilaelaps mercedesae* 是蜜蜂的另外一种寄生螨, 也是携带和传播 DWV 的媒介, 梅氏热厉螨可能成为 DWV 流行的新载体 (Khongphinitbunjong *et al.*, 2016)。

2.2.1.3 体表传播

蜜蜂是一种会飞行的群居性昆虫, 蜂巢内庞大的蜜蜂数量和个体间频繁的身体接触极易导致蜜蜂病毒的传播。冬季是蜜蜂休憩的季节, 然而由于冬季环境温度较低, 蜜蜂不得不聚集在一起以保存和提高热量, 保持代谢率。蜜蜂身体接触的过程中, 很容易出现表皮破损, 如体表绒毛掉落, 这有利于病毒从伤口进入蜜蜂体内, 进而导

致病毒在蜂群中的流行,这也是冬季蜂群消失的原因之一。而蜂群密度过大时或者在外界蜜源缺乏出现盗蜂时,同样会增加蜜蜂个体的身体接触,导致 DWV 的快速流行,因此,适当的分蜂处理,有利于抑制蜜蜂病毒在蜂群中传播 (Bailey and Ball, 1991)。

2.2.2 垂直传播

垂直传播是由亲代传播到子代的一种传播方式。研究发现,尽管蜂王与雄蜂都表现为健康状态,但在蜂王卵巢和雄蜂精囊却检测到了 DWV,暗示 DWV 垂直传播的可能。实验室利用人工授精的方式,用 DWV 阳性精子与蜂王 DWV 阴性的卵子结合,或者 DWV 阴性精子与蜂王 DWV 阳性的卵子结合,均产生了 DWV 阳性的受精卵,发育为感染 DWV 的工蜂。DWV 阳性未受精的卵也可直接发育为感染 DWV 的雄蜂,即 DWV 可以通过父系或母系,垂直传播给后代 (Yue *et al.*, 2007; de Miranda and Fries, 2008)。

通过自然交配的方式,受感染的雄蜂能与正常的雄蜂竞争,并与蜂王交配,使蜂王携带 DWV。蜂王交配后的 DWV 载量明显高于未交配的对照组,并且 DWV 主要存在于腹部和胸腔,而头部、卵巢、精囊和精子的病毒载量较低,暗示 DWV 存在垂直传播的途径,但主要依赖水平传播 (Amiri *et al.*, 2016)。

DWV 的垂直传播可进一步分为病毒在卵表面传播的经卵传播和病毒在卵内传播的经卵传播。研究发现,发现卵感染 DWV 的水平与蜂王巢房感染 DWV 的水平存在正相关关系,而当蜂王感染 DWV 水平较低时,则通常无法检测到卵含有 DWV。对卵表面进行漂白剂处理以及无菌水清洗后,发现 DWV 的浓度相对于未处理的空白对照显著下降,表明 DWV 的垂直传播更多依赖于卵表面传播,而不是卵内传播 (Amiri *et al.*, 2018)。

寄主在感染 DWV 后,体内转录反应会发生变化,如免疫系统基因的表达或抑制,进而适应 DWV 不同的传播方式。通过对相关基因的定量检测,或许更有利于理解 DWV 的水平传播与垂直传播以及这些途径对宿主带来的影响 (Ryabov *et al.*, 2016)。

3 病理学

3.1 DWV 对蜜蜂的危害

DWV 是引起蜜蜂感染后具有明确疾病症状的

几种蜜蜂病毒之一。DWV 感染的典型症状包括成年蜜蜂翅膀皱缩、体型缩小和变色,蛹发育缓慢和幼蜂迅速死亡等 (Kovac and Crailsheim, 1988; de Miranda and Genersch, 2010)。DWV 感染蜜蜂后,在蜜蜂大脑负责视觉和嗅觉等关键区域复制,最终导致蜜蜂行为异常 (Shah *et al.*, 2009)。DWV 不仅感染蜜蜂的大脑,还感染分泌腺和脂肪体 (Fujiyuki *et al.*, 2009),而脂肪体对昆虫的新陈代谢、免疫和信息素的产生起着重要的作用。

比较分析 DWV 感染的症状蜜蜂与无症状蜜蜂,发现有症状的蜜蜂触角中含有大量的 DWV,病毒衣壳在蜜蜂触角上皮区域聚集,呈晶体状排布,而且感染的区域完整性也受到破坏,暗示着触角的功能受损,进而影响蜜蜂的交流 (Kim *et al.*, 2019)。DWV 还损伤蜜蜂神经元,促使工蜂过早成熟,过早地从内勤蜂转变为采集蜂 (Traniello *et al.*, 2020)。DWV 的复制水平影响着蜜蜂的寿命,与蜜蜂越冬群体的损失有着很强相关性,有实验表明,冬季蜜蜂 DWV 载量增加,与参与细胞免疫的基因表达减少有关,导致了蜜蜂对 DWV 的易感性,最终危及越冬蜜蜂群体 (Steinmann *et al.*, 2015)。DWV 对蜂蛹表现出低毒性,感染了高水平 DWV 的蜂蛹,仍然能正常发育,死亡率较低 (Remnant *et al.*, 2019; Tehel *et al.*, 2019)。

3.2 DWV 的致病机理

3.2.1 DWV 与媒介的协同作用

生物因素和非生物因素的胁迫增加着蜜蜂感染病毒的风险,除了温度变化和蜜蜂自身群体的强弱影响着蜜蜂对病毒的抵抗力外,狄斯瓦螨的媒介作用直接改变了蜂群中 DWV 的传播情况 (Prisco *et al.*, 2011)。有研究从动态学的角度,建立模型来阐述蜜蜂 - DWV - 狄斯瓦螨三者的相互关系 (Kang *et al.*, 2016),而狄斯瓦螨与 DWV 的协同关系包括影响着病毒症状的显隐性、DWV 的复制水平和流行率以及蜜蜂的免疫反应等方面。

病原寄生于寄主,有两种表现方式:隐性感染和有症状的显性感染。表现为哪种感染,与病原的载量、毒力、传播途径以及寄主的免疫反应等多方面因素有关 (Sorrell *et al.*, 2009; Rigaud *et al.*, 2010)。在没有狄斯瓦螨的情况下, DWV 在蜂群中通常呈低水平,表现为隐性感染 (Shutler *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2017)。相反,在存在狄斯瓦螨的蜂群中, DWV 在蜂群中通常呈高水

平, 感染 DWV 的成蜂出现翅膀残缺、寿命缩短等症状, 以及冬季蜜蜂种群损失现象, 表现为显性感染 (Dainat *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017)。

DWV 可以感染西方蜜蜂的雄蜂及各个龄期的工蜂, DWV 的滴度从低到高依次是正常成年雄蜂、正常成年工蜂、幼虫、残翅成年蜂、蛹 (Chen *et al.*, 2005)。而狄斯瓦螨的存在不仅导致蜜蜂体内 DWV 滴度的不断增加、蜜蜂种群中 DWV 的流行率陡增, 还导致 DWV 多样性的大量减少, 最终形成 DWV 单一优势和高致病性 (Martin *et al.*, 2012)。狄斯瓦螨的唾液中存在毒性蛋白 (*Varroa toxic protein*, VTP), 在缺乏 DWV 的情况下能直接杀死东方蜜蜂的幼虫和蛹, 其重组表达的 VTP 能引起 DWV 滴度的升高和成蜂翅膀的不正常发育 (Zhang and Han, 2018)。

关于 DWV 与狄斯瓦螨的协同作用对免疫系统的影响, 目前还存在争议。有研究认为感染 DWV 后的蜂蛹, 因狄斯瓦螨的诱导而产生免疫抑制, 有利于 DWV 进一步复制 (Yang and Cox-Foster, 2005)。其他实验也发现狄斯瓦螨通过干扰 NF- κ B 信号途径, 抑制了体液免疫和细胞免疫, 从而促进了螨的繁殖, 这也暗示着狄斯瓦螨与 DWV 之间存在互利共生的关系 (Di Prisco *et al.*, 2016)。然而, 相反的观点则认为随着狄斯瓦螨数量的增加, 免疫反应可能会被激活 (Zhang *et al.*, 2010)。对蜜蜂进行实验性创伤后, 检测到蜜蜂 DWV 滴度上升和相关的免疫基因表达上调, 这表明狄斯瓦螨吸食血淋巴并不会抑制蜜蜂的免疫系统; 相反, 蜜蜂免疫基因表达增加, 一定程度上抑制了狄斯瓦螨的繁殖 (Kuster *et al.*, 2014)。蜜蜂对 DWV 与狄斯瓦螨的免疫反应可能不呈持续稳定状态, 初始 DWV 的水平较低, 这是由于 Toll 途径转录因子和其他免疫效应分子的高水平表达, 但这种表达是暂时性的, 伴随着这些途径的下调, DWV 开始不断地复制 (Zhao *et al.*, 2019)。

3.2.2 DWV 与杀虫剂的协同作用

农药, 特别是以神经系统为靶标杀虫剂, 如新烟碱类农药, 在防治螨类的同时, 对蜜蜂这类传粉昆虫, 不仅有着直接致命影响 (Samuelson *et al.*, 2016), 还能与 DWV 产生协同作用, 间接加重对蜜蜂的危害。研究发现死亡的蜜蜂中杀虫剂的含量与 DWV 等病毒的流行率呈正相关, 这意味着杀虫剂可以协同并加重 DWV 对蜜蜂健康的危害, 威胁蜂群的生存 (Martinello *et al.*, 2017)。病

毒与杀虫剂在蜜蜂上的协同作用关系比较复杂: 杀虫剂可能成为病毒复制的加速因子, 导致病毒大量扩增, 进而危害蜜蜂 (Diao *et al.*, 2018), 但更高的杀虫剂剂量不意味着一定会引起更高的病毒滴度, 而是通过对昆虫免疫信号的负调节作用, 来降低蜜蜂对病毒感染的耐受度 (Di Prisco *et al.*, 2013; Coulon *et al.*, 2018)。

3.2.3 DWV 与其他病原体的共同感染

蜂群同时感染多种病原体是非常普遍的现象 (Granberg *et al.*, 2013)。当两种病原体同时感染宿主时, 可能是互利关系 (Positively) 也有可能是竞争关系 (Negatively) 或者互不影响 (Independently)。

微孢子虫 *Nosema ceranae* 是一种干扰蜜蜂蛋白质代谢的专性寄生虫。最初的研究发现微孢子虫与 DWV 共同感染存在拮抗作用, 这两种病原体在蜜蜂的中肠呈显著的负相关, 但在蜜蜂头部或胸部, 两者没有表现出相关性 (Costa *et al.*, 2011)。之后在蜜蜂中肠的实验, 进一步证明微孢子虫与 DWV 呈不对称的竞争关系, 且不利于 DWV 的繁殖。如果蜜蜂先感染 DWV, 微孢子虫能够正常繁殖, 但如果蜜蜂先感染微孢子虫则抑制 DWV 的增殖 (Doublet *et al.*, 2015)。微孢子虫与 DWV 的共同感染影响, 还与营养物质有关。在没有花粉的条件下, 微孢子虫的感染提高了蜜蜂体内的 DWV 水平, 但有花粉的条件下, 感染微孢子虫的蜜蜂与没感染微孢子虫的蜜蜂相比, DWV 水平没有显著差异, 暗示着营养物质能减少病原体寄生的影响, 或者提高蜜蜂的免疫力 (Zheng *et al.*, 2015)。

花卉是蜂类采蜜和传粉的主要植物, 也是各种病原体的寄主。蜂类在访花过程中, 受到多种病原体的共同感染, 使蜂群的数量和丰富度迅速下降 (Sachman-Ruiz *et al.*, 2015)。DWV 在不同的植物物种间分布不均匀, DWV 如何通过花传播和扩散, 取决于植物的性状、病毒株的传染性、寄主免疫能力以及昆虫觅食行为等 (Alger *et al.*, 2019)。

3.2.4 DWV 与营养物质的关系

DWV 复制水平, 与蜜蜂吸收的营养物质有着密切关系。花粉含有蛋白质、糖类、脂类、维生素和矿物质等, 是蜜蜂重要的营养物质来源。最初有研究发现, 花粉与糖水相比, 前者能激活健康蜜蜂相关的营养代谢途径, 如卵黄蛋白原 (Vg) 基因的表达, 进而能对蜜蜂寿命产生积极影响,

但是狄斯瓦螨的寄生行为抑制了蜜蜂的相关代谢途径, 即使摄入花粉也不能逆转这种影响, 并且花粉的摄入有利于 DWV 在蜜蜂体内的繁殖 (Alaux *et al.*, 2011)。

然而, 另外的实验证明, 对于正常的蜜蜂, 花粉和糖水喂食, 两者对蜜蜂寿命影响差异不大, 但当蜜蜂被狄斯瓦螨寄生时, 花粉能明显提高蜂群存活率, 并且喂食花粉的蜜蜂比喂食糖水的蜜蜂, 具有更低的 DWV 水平, 并且对微孢子虫的耐受性上升, 这可能与花粉中的非极性物质, 如脂类有关, 反映了花粉可能有助于减少蜂群损失 (Annoscia *et al.*, 2017; Tritschler *et al.*, 2017)。

值得注意的是, 蜜蜂消化花粉的能力有限, 过量取食花粉反而对蜜蜂造成危害。只有摄入的蛋白质被蜜蜂有效地吸收, 才能维持蜜蜂血淋巴中的蛋白质正常水平, 进而促进蜜蜂的健康以及提高蜜蜂对病原的耐受性 (Basualdo *et al.*, 2014; Paoli *et al.*, 2014)。蜜蜂的营养代谢与肠道细菌群有着密切关系, 在有肠道细菌的存在下, 即使不提供花粉, 蜜蜂的营养代谢和免疫系统不会受到很大影响, 但如果使用抗生素, 破坏蜜蜂肠道中的细菌群, 蜜蜂的寿命会显著缩短 (Li *et al.*, 2019)。营养物质与病原和寄主的相互作用机制, 仍需要进一步研究。

4 防治

DWV 的流行与爆发会给蜜蜂养殖产业以及背后的农业经济造成巨大损失, 但目前还没有针对 DWV 的特效药物。为了减少 DWV 的传播与危害, 可以从以下两个方面着手: 一是切断 DWV 的传播途径; 二是应用 RNAi 技术来抑制蜂群中 DWV 的繁殖。

4.1 DWV 传播途径的切断

DWV 寄生于蜜蜂, 水平较低时以隐形感染的方式, 长期广泛地存在于蜂群中, 当遇到外界压力的激活或者环境因子的协同作用, 往往会快速繁殖, 表现显性症状, 造成蜜蜂残翅病的爆发和流行。其中, 狄斯瓦螨作为 DWV 的传播媒介, 极大地影响了 DWV 的流行情况。

为了减少 DWV 的传播机会, 一方面, 从源头出发, 保证洁净的养蜂环境, 定期对蜂具用品全面清洁消毒。对来源复杂和规模较大的蜂群采取分散隔离方式放置, 减少交叉感染机会 (张炫等,

2012)。另一方面, 要积极采取防治狄斯瓦螨措施, 减少 DWV 的媒介传播途径。由于雄蜂房的巢房大小、封盖时间以及繁殖环境的优势, 雄蜂房的狄斯瓦螨感染率是工蜂房的 8 ~ 10 倍 (张祎和韩日畴, 2012), 因此割除雄蜂房可以大大减少狄斯瓦螨的数量 (Wantuch and Tarpy, 2009), 但在实际操作中, 比较费时费力; 杀螨剂可有效防治狄斯瓦螨, 针对狄斯瓦螨的不同分子靶点, 主要有神经靶点和肌肉靶点 (Sparks and Nauen, 2015), 可使用蝇毒磷、联苯菊酯、拟除虫菊酯、双甲脒、精油、硫丹等杀螨剂, 然而大量反复使用杀螨剂, 不仅导致了狄斯瓦螨的抗药性不断上升, 还会危害蜜蜂健康以及产生蜂产品农药残留问题 (Hillier *et al.*, 2013; Sabová *et al.*, 2019); 生防菌包括真菌与细菌对狄斯瓦螨均有一定毒力 (Hamiduzzaman *et al.*, 2012; Alquisira-Ramírez *et al.*, 2017), 但还没有广泛应用, 表现出明显经济效益; 从寄主的角度出发, 培育抗螨的蜜蜂品种, 这种途径虽然不容易实现但潜力无限。直接通过人工授精的方式, 蜜蜂可能无法表现出抑制螨繁殖的性状 (Beaurepaire *et al.*, 2019)。通过分子遗传学手段, 增强蜜蜂梳毛行为、螨敏感卫生行为等数量性位点基因的表达, 可以培育出抗狄斯瓦螨的蜜蜂品种 (Zakar *et al.*, 2014)。目前已有抗螨的蜜蜂品种, 如俄罗斯蜜蜂品种 (Russia Honey Bee, RHB), 成功面向市场 (Kirrane *et al.*, 2018)。

4.2 RNAi 技术的应用

目前生物技术 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 在防治 DWV 方面取得新的进展。RNAi 指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象, 主要有 3 种途径: microRNA (miRNA) 途径、piwiRNA (piRNA) 途径和 small interfering RNA (siRNA) 途径。在害虫防治中应用是 siRNA 途径 (Joga *et al.*, 2016), 其原理是将外源的 dsRNA 导入到害虫体内, 从而激活“siRNA 途径”, Dicer 酶将 dsRNA 切割为 24 ~ 31 nt 左右的小分子 RNA, 引起同源 mRNA 特异性降解, 沉默重要的基因, 最终达到防治害虫的目的。

早期研究用注射法传递 dsRNA 到狄斯瓦螨身上, 表现出高达 97% 的 RNAi 效率 (Campbell *et al.*, 2010), 然而注射法却不适用于大规模的防

治。用含有 dsRNA 的蔗糖溶液喂养蜜蜂，在蜜蜂血淋巴中检测到 dsRNA 的存在，狄斯瓦螨取食蜜蜂的血淋巴后，dsRNA 从蜜蜂水平转移到狄斯瓦螨，实现狄斯瓦螨的致死率在 60% 以上，且 dsRNA 不会对蜜蜂自身造成影响 (Garbian *et al.*, 2012)。dsRNA 不仅可以转移到蜜蜂不同的组织、不同发育阶段，也可以通过蜂王转移到后代且具有生物学活性 (Maori *et al.*, 2019)。

细菌也可作为 dsRNA 的表达载体，dsRNA 经细菌表达，再纯化后喂食蜜蜂，蜜蜂体内病毒的表达水平下降，幼虫存活率上升，用细菌来大规模生产 dsRNA，是一种新的抗病毒策略 (Zhang *et al.*, 2016)。

RNAi 也被广泛应用在揭示细胞色素 P450 单加氧酶 (CYPs)、羧酸酯酶 (CarEs) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 等基因在杀虫剂解毒和抗性中的作用。螨类经杀螨剂处理后，相关解毒基因的 mRNA 转录水平升高，死亡率下降，通过 RNAi 处理，解毒基因表达显著下降，导致螨的敏感性和死亡率显著上升 (Liao *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016)，RNAi 将有利于减低螨的抗药性以及减少用药成本。

RNAi 的效率不仅与 dsRNA 的长度和浓度有关，还与 dsRNA 的完整性有关 (Miller *et al.*, 2012)。通过纳米颗粒或者脂质体将 dsRNA 包裹起来，再传递到昆虫体内，能明显提高 RNAi 效率，而这些物质在保护 dsRNA 完整性的同时，自身容易降解 (He *et al.*, 2013; Taning *et al.*, 2016)。RNAi 的效率还取决于多方面因素，包括靶标基因的设计、靶标昆虫的种类、龄期、取食行为以及免疫系统等。随着对 RNAi 的深入研究，相信未来基于 dsRNA 的生物农药也将得到应用与推广，但 RNAi 对于非靶标生物也存在潜在风险，只有做好风险评估与预防，RNAi 应用安全性才能得到保证，从而更好地实现目标生物防治。

5 展望

从近些年的研究来看，DWV 的寄主范围在不断扩大，DWV 变异体和重组热点的出现也威胁着蜜蜂以及新奇主物种的健康与生存。DWV 及其变异体的致病机理研究依然是关键，它们是如何影响蜜蜂的健康、繁殖力以及与狄斯瓦螨-蜜蜂的相互作用，有待新技术的开发和应用来深入研究。

目前尚无治疗 DWV 的药剂，而狄斯瓦螨对 DWV 的传播起到至关重要的作用，所以防治狄斯瓦螨是防控 DWV 的关键。单一的防治手段，往往难以两全生态效益以及经济效益，RNAi 技术的应用是防控蜜蜂病毒的很好补充，对资源昆虫的保护和生态环境安全有着十分重要的意义。相信未来病虫害的防治将是多种方式的结合，从而达到更加高效、安全的目的，未来的农业也将向环境友好型不断迈进。

参考文献 (References)

- Alaux C, Dantec C, Parrinello H, *et al.* Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *Varroa*-parasitized bees [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 496.
- Alger SA, Burnham PA, Brody AK. Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species [J]. *PLoS ONE*, 2019, 14 (9): e0221800.
- Allen M, Ball BV. The incidence and world distribution of honey bee viruses [J]. *Bee World*, 1996, 77 (1): 41-62.
- Alquisira-Ramirez EV, Pena-Chora G, Hernández-Velázquez VM, *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* strains virulent to *Varroa destructor* on larvae and adults of *Apis mellifera* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 142: 69-78.
- Amiri E, Kryger P, Meixner MD, *et al.* Quantitative patterns of vertical transmission of deformed wing virus in honey bees [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (3): e0195283.
- Amiri E, Meixner MD, Kryger P. Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33065.
- Annoscia D, Zanni V, Galbraith D, *et al.* Elucidating the mechanisms underlying the beneficial health effects of dietary pollen on honey bees (*Apis mellifera*) infested by *Varroa* mite ectoparasites [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6258.
- Bailey L, Carpenter JM, Woods RD. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus [J]. *Journal of General Virology*, 1979, 43: 641-647.
- Bailey L, Ball BV. *Honey Bee Pathology* [M]. London: Academic Press. 1991, 2nd ed: 193.
- Basualdo M, Barragan S, Antunez K. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6 (4): 396-400.
- Beaurepaire A, Sann C, Arredondo D, *et al.* Behavioral genetics of the interactions between *Apis mellifera* and *Varroa destructor* [J]. *Insects*, 2019, 10 (9): 299.
- Boncrisiani HJ, Di Prisco G, Pettis J S, *et al.* Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Virology Journal*, 2009, 6: 221.

- Campbell EM, Budge GE, Bowman AS. Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: Studies on a glutathione S-transferase [J]. *Parasites & Vectors*, 2010, 3 (1): 73.
- Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (1): 436–441.
- Costa C, Tanner G, Lodesani M, et al. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 108 (3): 224–225.
- Coulon M, Schurr F, Martel AC, et al. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the chronic bee paralysis virus in honeybees [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 144: 10–18.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, et al. Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (4): 981–987.
- Dalmon A, Desbiez C, Coulon M, et al. Evidence for positive selection and recombination hotspots in deformed wing virus (DWV) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41045.
- de Miranda JR, Fries I. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 98 (2): 184–189.
- de Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103: S48–S61.
- de Souza RS, Kevill JL, Correia-Aveira ME, et al. Occurrence of deformed wing virus variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil [J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100 (2): 289–294.
- Dennis V, Robyn U, Dewey C, et al. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apirary inspectors of America [J]. *American Bee Journal*, 2007, 147 (7): 599–603.
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, et al. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113 (12): 3203–3208.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (46): 18466–18471.
- Diao QY, Li BB, Zhao HX, et al. Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: A Chinese case study [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 630: 487–494.
- Doublet V, Natsopoulou ME, Zschiesche L, et al. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 31–34.
- Erban T, Harant K, Hubalek M, et al. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13907.
- Fannon J, Ryabov EV. *Iflavirus* (Deformed Wing Virus). In: Liu DY, eds. *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens* [C]. Florida: Chemical Rubber Company Press, 2016: 37–46.
- Fernández N, Buddrus L, Piñeiro D, et al. Evolutionary conserved motifs constrain the RNA structure organization of picornavirus IRES [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587 (9): 1353–1358.
- Fujiyuki T, Matsuzaka E, Nakaoka T, et al. Distribution of kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83 (22): 11560–11568.
- Garbian Y, Maori E, Kalev H, et al. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8 (12): e1003035.
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E. Deformed wing virus: Replication and viral load in mites (*Varroa destructor*) [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90 (2): 463–467.
- Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, et al. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: Co-infection by aphid lethal paralysis, Israel acute paralysis and lake Sinai viruses [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (2): e57459.
- Hamiduzzaman MM, Sinia A, Guzman-Novoa E, et al. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 111 (3): 237–243.
- He BC, Chu Y, Yin MZ, et al. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25 (33): 4580–4584.
- Hébrard E, Bessin Y, Michon T, et al. Intrinsic disorder in viral proteins genome-linked: Experimental and predictive analyses [J]. *Virology Journal*, 2009, 6: 23.
- Highfield AC, Nagar AE, Mackinder LC, et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (22): 7212–7220.
- Hillier NK, Frost EH, Shutler D. Fate of dermally applied miticides fluvalinate and amitraz within honey bee (Hymenoptera: Apidae) bodies [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2013, 106 (2): 558–565.
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far [J]. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7: 553.
- Kang Y, Blanco K, Davis T, et al. Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector [J]. *Mathematical Biosciences*, 2016, 275: 71–92.
- Kevill JL, de Souza FS, Sharples C, et al. DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): A colony level survey of DWV variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 states across the US [J].

- Viruses*, 2019, 11 (5): 426.
- Kevill JL, Highfield A, Mordecai GJ, *et al.* ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees [J]. *Viruses*, 2017, 9 (11): 314.
- Khongphinitbunjong K, Neumann P, Chantawannakul P, *et al.* The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* reduces western honey bee, *Apis mellifera*, longevity and emergence weight, and promotes deformed wing virus infections [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 137: 38–42.
- Kim SH, Mercer A, Mitchell A, *et al.* Viral infections alter antennal epithelium ultrastructure in honey bees [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 168: 107252.
- Kirrane MJ, de Guzman LI, Whelan PM, *et al.* Evaluations of the removal of *Varroa destructor* in Russian honey bee colonies that display different levels of *Varroa* sensitive hygienic activities [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2018, 31 (3): 283–297.
- Kovac H, Crailsheim K. Life span of *Apis mellifera carnica* pollm. infested by *Varroa jacobsoni* in relation to season and extent of infestation [J]. *Journal of Apicultural Research*, 1988, 27 (4): 230–238.
- Kuster RD, Boncristiani HF, Rueppell O. Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217 (10): 1710–1718.
- Lamp B, Url A, Seitz K, *et al.* Construction and rescue of a molecular clone of deformed wing virus (DWV) [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (11): e0164639.
- Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, *et al.* Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80 (10): 4998–5009.
- Li JH, Heerman MC, Evans JD, *et al.* Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2019, 222 (7): b202077.
- Liao CY, Xia WK, Feng YC, *et al.* Characterization and functional analysis of a novel glutathione S-transferase gene potentially associated with the abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 132: 72–80.
- Martinello M, Baratto C, Manzinello C. Spring mortality in honey bees in northeastern Italy: Detection of pesticides and viruses in dead honey bees and other matrices [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2017, 56 (3): 239–254.
- Manley R, Temperton B, Doyle T, *et al.* Knock-on community impacts of a novel vector: Spillover of emerging DWV-B from *Varroa*-infested honeybees to wild bumblebees [J]. *Ecology Letters*, 2019, 22 (8): 1306–1315.
- Maori E, Garbian Y, Kunik V, *et al.* A transmissible RNA pathway in honey bees [J]. *Cell Reports*, 2019, 27 (7): 1949–1959.
- Martin SJ, Brettell LE. Deformed wing virus in honeybees and other insects [J]. *Annual Review of Virology*, 2019, 6 (1): 49–69.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, *et al.* Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite [J]. *Science*, 2012, 336 (6086): 1304–1306.
- Mazzei M, Carrozza ML, Luisi E, *et al.* Infectivity of DWV associated to flower pollen: Experimental evidence of a horizontal transmission route [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (11): e113448.
- Miller SC, Miyata K, Brown SJ, *et al.* Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: Parameters affecting the efficiency of RNAi [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (10): e47431.
- Möckel N, Gisder S, Genersch E. Horizontal transmission of deformed wing virus: Pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92 (2): 370–377.
- Mondet F, de Miranda JR, Kretzschmar A, *et al.* On the front line: Quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor* [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10 (8): e1004323.
- Moore J, Jironkin A, Chandler D, *et al.* Recombinants between deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92 (1): 156–161.
- Mordecai GJ, Brettell LE, Martin SJ, *et al.* Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies [J]. *The ISME Journal*, 2016b, 10 (5): 1182–1191.
- Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, *et al.* Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies [J]. *The ISME Journal*, 2016a, 10 (5): 1264–1273.
- Murakami R, Suetsugu Y, Nakashima N. Complete genome sequences of two Iflaviruses from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159 (3): 585–588.
- Nakashima N, Uchiumi T. Functional analysis of structural motifs indicistroviruses [J]. *Virus Research*, 2009, 139: 137–147.
- Ongus JR, Peters D, Bonmatin JM, *et al.* Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor* [J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85 (12): 3747–3755.
- Organtini LJ, Shingler KL, Ashley RE, *et al.* Honey bee deformed wing virus structures reveal that conformational changes accompany genome release [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91 (2): e1795.
- Paoli PP, Donley D, Stabler D, *et al.* Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age [J]. *Amino Acids*, 2014, 46 (6): 1449–1458.
- Posada-Florez F, Childers AK, Heerman MC, *et al.* Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12445.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, *et al.* Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010, 25 (6): 345–353.
- Prisco GD, Zhang X, Pennacchio F, *et al.* Dynamics of persistent and

- acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera* [J]. *Viruses*, 2011, 3 (12): 2425–2441.
- Remnant EJ, Mather N, Thomas L, et al. Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2019, 286 (1895): 20182452.
- Rigaud T, Perrot-Minnot MJ, Brown M JF. Parasite and host assemblages: Embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2010, 277 (1701): 3693–3702.
- Roberts JMK, Anderson DL, Durr PA. Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 6911–6925.
- Ryabov EV, Childers AK, Lopez D, et al. Dynamic evolution in the key honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics [J]. *PLoS Biology*, 2019, 17 (10): e3000502.
- Ryabov EV, Christmon K, Heerman MC, et al. Development of a honey bee RNA virus vector based on the genome of deformed wing virus [J]. *Virology*, 2020, 12 (4): 374.
- Ryabov EV, Fannon JM, Moore JD, et al. The Iflaviruses sacbrood virus and deformed wing virus evoke different transcriptional responses in the honeybee which may facilitate their horizontal or vertical transmission [J]. *Peer Journal*, 2016, 4: e1591.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, et al. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor* – mediated, or *In Vitro*, transmission [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10 (6): e1004230.
- Sabová L, Sobeková A, Staron M, et al. Toxicity of oxalic acid and impact on some antioxidant enzymes on in vitro-reared honeybee larvae [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26 (19): 19763–19769.
- Sachman-Ruiz B, Narváez-Padilla V, Reynaud E. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México [J]. *Biological Invasions*, 2015, 17 (7): 2043–2053.
- Samuelson EEW, Chen-Wishart ZP, Gill RJ, et al. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38957.
- Sánchez-Eugenía R, Goikolea J, Gil-Cartón D, et al. Triatoma virus recombinant VP4 protein induces membrane permeability through dynamic pores [J]. *Journal of Virology*, 2015, 89 (8): 4645–4654.
- Schlappi D, Lattrell P, Yañez O, et al. Foodborne transmission of deformed wing virus to ants (*Myrmica rubra*) [J]. *Insects*, 2019, 10 (11): 394.
- Schroeder DC, Martin SJ. Deformed wing virus: The main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide [J]. *Virulence*, 2012, 3 (7): 589.
- Sguazza GH, Reynaldi FJ, Galosi CM, et al. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 194 (1–2): 102–106.
- Shah KS, Evans EC, Pizzorno MC. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus [J]. *Virology Journal*, 2009, 6 (1): 182.
- Shen XM, Liao CY, Lu XP, et al. Involvement of three esterase genes from *Panonychus citri* (McGregor) in fenpropathrin resistance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17 (8): 1361.
- Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, et al. Honey bee *Apis mellifera* parasites in the absence of *Nosema ceranae* fungi and *Varroa destructor* mites [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (6): e98599.
- Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, et al. RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter-taxa virus transmission *via* pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (12): e14357.
- Škubník K, Nováček J, Füzik T, et al. Structure of deformed wing virus, a major honey bee pathogen [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114 (12): 3210–3215.
- Sorrell I, White A, Pedersen AB, et al. The evolution of covert, silent infection as a parasite strategy [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2009, 276 (1665): 2217–2226.
- Sparks TC, Nauen R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015, 121: 122–128.
- Steinmann N, Corona M, Neumann P, et al. Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (6): e129956.
- Taning C NT, Christiaens O, Berkvens N, et al. Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: Laboratory testing against larval and adult stages [J]. *Journal of Pest Science*, 2016, 89 (3): 803–814.
- Tehel A, Vu Q, Bigot D, et al. The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees [J]. *Viruses*, 2019, 11 (2): 114.
- Teresa SM, Carzaniga R, Ball BV, et al. Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor* [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89 (7): 1685–1689.
- Traniello IM, Bukhari SA, Kevill J, et al. Meta-analysis of honey bee neurogenomic response links deformed wing virus type A to precocious behavioral maturation [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 3101.
- Tritschler M, Vollmann JJ, Yanez O, et al. Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 14988.
- Valles SM, Chen Y, Firth AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Iflaviridae* [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98 (4): 527–528.
- Vaudo AD, Patch HM, Mortensen DA, et al. Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113 (28): e4035–e4042.
- Wantuch HA, Tarp DR. Removal of drone brood from *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and retain adult drones [J]. *Journal of*

- Economic Entomology*, 2009, 102 (6): 2033–2040.
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, *et al.* Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites [J]. *Science*, 2016, 351 (6273): 594–597.
- Wu YF, Dong XF, Kadowaki T. Characterization of the copy number and variants of deformed wing virus (DWV) in the pairs of honey bee pupa and infesting *Varroa destructor* or *Tropilaelaps mercedesae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1558.
- Yang XL, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (21): 7470–7475.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 3419–3424.
- Yue C, Schroder M, Gisder S, *et al.* Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88: 2329–2336.
- Zakar E, Javor A, Kusza S. Genetic bases of tolerance to *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) [J]. *Insectes Sociaux*, 2014, 61 (3): 207–215.
- Zhang JQ, Zhang Y, Han RC. The high-throughput production of dsRNA against sacbrood virus for use in the honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Virus Genes*, 2016, 52 (5): 698–705.
- Zhang X, Chen YP, He SY. A review of bee virology progress [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (5): 1095–1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹. 蜜蜂病毒学研究进展 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (5): 1095–1116]
- Zhang Y, Han RC. A saliva protein of *Varroa* mites contributes to the toxicity toward *Apis cerana* and the DWV elevation in *A. mellifera* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 3387.
- Zhang Y, Han RC. Progress in research of honey bee mite *Varroa destructor* [J]. *Journal of Environment Entomology*, 2012, 34 (3): 345–353. [张祎, 韩日畴. 蜜蜂寄生螨—狄斯瓦螨的研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2012, 34 (3): 345–353]
- Zhang Y, Liu XJ, Zhang WQ, *et al.* Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56 (9): 1207–1218.
- Zhao YZ, Heerman M, Peng WJ, *et al.* The dynamics of deformed wing virus concentration and host defensive gene expression after *Varroa* mite parasitism in honey bees, *Apis mellifera* [J]. *Insects*, 2019, 10 (1): 16.
- Zheng HQ, Gong HR, Huang SK, *et al.* Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, (1–2) 177: 1–6.
- Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee [J]. *Virology*, 2011, 417 (1): 106–112.