综述与进展

蜜蜂抗白垩病机制的研究进展*

晏励民[1**] 刘元珍[2] 刘 芳[3] 苏松坤[1,2***]

(1. 浙江大学动物科学学院 杭州 310058;2. 福建农林大学蜂学学院 福州 350002;
3. 安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036)

摘 要 蜜蜂白垩病(chalkbrood disease)是由蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)引起的蜜蜂幼虫死亡的真菌性疾病,该病已蔓延至世界各地并且发生率仍在上升。因此,抗白垩病机制的研究和抗白垩病蜂种的培育显得十分紧迫,而掌握蜜蜂抗白垩病的机制是成功培育抗白垩病蜂种的前提条件。本文综述了国内外白垩病研究和蜜蜂抗白垩病机制研究的最新进展,尤其对从分子水平研究蜜蜂的抗白垩病机制的重大意义进行了阐述,为利用分子遗传标记辅助选育和生物工程技术并结合传统的育种手段培育具有抗白垩病性能的优良蜜蜂品种(系)奠定基础。

关键词 蜜蜂,白垩病,抗病机制,蜜蜂球囊菌

Progress in research on resistance to chalkbrood in honeybees

YAN Li-Min[1**] LIU Yuan-Zhen[2] LIU Fang[3] SU Song-Kun[1,2***]

(1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
3. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Chalkbrood is a fungal disease of honeybees caused by *Ascosphaera apis* which is globally on the increase. Research into resistance mechanisms and the breeding of resistant honey bees has become particularly urgent. We here review both chalkbrood research and the major advances in research on resistance mechanisms in honey bees. In particular, we focus on the significance of studying the molecular basis of chalkbrood resistance in honey bees at the molecular level. This could provide a genetic basis for cultivating improved strains of resistant honey bees by combining marker-assisted selection and modern bio-engineering technologies with conventional breeding methods.

Key words honey bee, chalkbrood, tolerance character, *Ascosphaera apis*

蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)是一种侵染蜜蜂幼虫,引发蜜蜂白垩病的真菌性病原微生物。蜜蜂幼虫主要通过摄食真菌孢子患病,孢子侵染幼虫后,于封盖期在幼虫体内末端开始生长,菌丝迅速膨胀,穿过上皮层,3 d 后就能穿透虫体,继续在空气中生长。大部分幼虫在封盖期死亡,感染白垩病死亡的幼虫逐渐萎缩干枯至僵硬状,死亡幼虫最后变成白色、灰色或黑色的石灰样硬块(Invernizzi *et al.*,2011)。白垩病早在 20 世纪初就已经被发现(Maassen, 1913),随后逐渐传播至整个世界范围,当前蜜蜂白垩病已经成为对我国西方蜜蜂健康危害十分严重的蜜蜂疾病,有迹象表明白垩病发生率可能正在升高(Kluser and Peduzzi, 2007)。值得关注的是,蜜蜂球囊菌已经成为第一个全基因被测序的昆虫真菌性病原体(Qin *et al.*,2006),分子检测技术在白垩病的诊断等方面也起到日益重要的作用。

纵观国内外白垩病的研究进展,单纯依靠药物治疗措施,达不到令人满意的效果,反而增加了防治成本,引发蜂产品中药物残留超标问题。如

* 资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-45-KXJ3)。

** E-mail:yanlimin1990@aliyun.com

*** 通讯作者,E-mail:susongkun@zju.edu.cn

收稿日期:2012-08-05,接受日期:2013-04-10

果不采取有效措施,该病仍会广泛流行(Taber, 1992)。因此,培育抗白垩病蜂种将成为根治白垩病的理想途径,培育抗白垩病蜂种的首要前提是了解蜜蜂的抗白垩病机制。有些蜂群在感染白垩病后仍能存活,表现出良好的抗病性状,在对这些具有抗病性状的蜂群进行深入研究后,发现其存在一种或多种的行为或生理特征并决定其抗病性(Qin *et al.*,2006)。

本文综述了白垩病的病原体生物学、流行病学和控制方法等研究进展,并将蜜蜂的抗白垩病机制归纳为行为机制、生理机制及分子机制,以期从基因研究方面更好地理解蜜蜂球囊菌繁殖和发病机理的控制机制,为蜜蜂抗白垩病育种提供科学依据。

1　白垩病的病原体生物学

1.1　白垩病的病因和传播机制

蜜蜂球囊菌经过有性生殖产生孢子侵染蜜蜂幼虫是蜂群感染白垩病的根本原因(Aronsrein *et al.*,2010)。尽管成年蜂不受这种病原菌感染,但成年蜜蜂之间能够通过食物传播这种疾病:真菌的孢子通过觅食的蜜蜂携带,当工蜂用被污染的食物饲喂健康幼虫时孢子就会被传递给幼虫,幼虫在摄入含蜜蜂球囊菌孢子的食物后很可能感染上白垩病。蜂群之间主要是通过迷巢工蜂、雄蜂、蜂机具以及被污染的花粉、蜂蜜等传播白垩病。Flores 等(2005a, 2005b)研究发现,巢脾中被蜜蜂球囊菌污染的蜂蜡很可能是白垩病的重要传染源,因为孢子可能从蜂蜡转移到蜂箱的其他部位以及箱内的蜂产品中,其存活年限可以长达 15 年,任何一种蜂房中的材料被真菌孢子污染以后都会成为长期污染源。另外,转地放蜂和蜜蜂商业授粉也是蜜蜂球囊菌大规模传播的重要途径。

1.2　白垩病的发病原理、症状和鉴定方法

孢子被蜜蜂幼虫摄食以后,很可能是被二氧化碳激活并最先在内脏中开始繁殖(Bailey and Ball, 1991)。随后菌丝逐渐膨胀,直到穿透蜜蜂幼虫身体末端的角质层,一般来说,3 ~ 4 日龄的幼虫最容易被感染,被感染的幼虫很快就会减少食物消耗,之后全部停止摄食。Theantana 和 Chantawannakul (2008) 鉴定了蜜蜂球囊菌产生的几种酶,其中一些酶的作用就是帮助病原菌渗透蜜蜂幼虫的中肠膜,渗透肠壁以后,真菌的菌丝就会在动物体腔中生长,最后穿透幼虫尾部。在机械作用和酶的损伤下,血淋巴不能循环,蜜蜂球囊菌从蜜蜂幼虫尾端生长到头部,最后整个蜜蜂幼虫都覆盖了厚厚的白色菌丝。病至末期,虫体逐渐萎缩干枯且僵硬,最后变成白色、灰褐色或黑色的石灰样扁平硬块。

蜜蜂白垩病的传统鉴定方法是以病原的形态学、生物学及培养条件等方面的特征为基础。梁勤和陈大福(2009)研究发现,白垩病的病原在含有酵母膏的马铃薯葡萄糖琼脂和麦芽糖琼脂培养基上生长良好,可以作为病原鉴定和疾病诊断的培养特性。但是这些特征差异并不明显,甚至会出现形态和大小上的重叠,几乎难以区分(熊翠玲,2010)。如果要对患白垩病蜜蜂进行准确地鉴定,还要从分子水平上入手。赵柏林(2007)使用荧光定量 PCR 方法对蜜蜂白垩病作出快速准确的诊断,较传统鉴定方法而言,准确率得到大幅度提高。

2　白垩病的流行病学

低温潮湿的环境会加快蜜蜂球囊菌在蜂巢中的生长繁殖,这也是白垩病在春季最为流行的原因之一。除环境条件以外,真菌菌株和蜜蜂遗传背景的差异性等生物因子的交互作用也可能影响疾病的发生率和严重性。Vojvodic 等(2011a)通过用不同进化支的蜜蜂球囊菌孢子饲喂蜜蜂幼虫,发现其毒力水平表现出近 6 倍的差异。此外,真菌孢子在蜂群中的高浓度集中增长了蜜蜂幼虫被孢子感染的几率,所以疾病的发生率还有可能依赖于真菌的囊孢子产量、孢子的发芽率和传播效率。

当蜂群发生了白垩病以后,较多使用药物来进行治疗。使用化学药物治疗白垩病可能会对蜂产品污染很大,严重影响了蜂产品的品质。随着科学技术的发展,人们开始尝试使用新型药物或方法来治疗白垩病(James,2005),如多功能生物制剂、中草药、天然植物提取液和从蜂蜜中分离的一些芽孢杆菌等。但研制价格便宜、能够治疗该病的特效药物仍需努力。目前,从蜜蜂抗病育种的途径解决蜜蜂的白垩病问题已成为新的发展方向。如果能够从分子水平掌握蜜蜂的抗白垩病机制,发现与抗病性状相关的分子遗传标记,并结合

分子遗传标记辅助选育技术,不但能保证选择的准确性,还可以加快选育速度,大大提高选育抗白垩病蜂种的成功率,安全、有效地解决蜜蜂白垩病困扰。

3 蜜蜂抗白垩病的机制

3.1 行为机制

3.1.1 卫生行为 蜜蜂的卫生行为是指蜜蜂能够检查、咬开封盖巢房并清除巢房内已被病害感染的蜜蜂幼虫的一种行为。一般情况下,若要检查蜂群是否具有卫生行为可通过分别检测蜂群在 24 h 和 48 h 后对冷冻致死的封盖仔的清除能力(Martha *et al.*,1983)。美国学者在培育抗病和抗螨的蜜蜂品系时,发现清巢能力强的蜜蜂品系很少患美洲幼虫腐臭病、白垩病及被蜂螨寄生。

蜜蜂个体从患病幼虫中察觉到化学刺激之后就迅速从巢房中移走患病幼虫,从而减少病原菌的传播,这是蜜蜂的一种群体免疫机制的具体表现。Swanson 等(2009)通过研究发现,蜜蜂的卫生行为除了与先天的遗传基因有关以外,还与蜜蜂对气味识别的敏感度密切相关。从患白垩病的蜜蜂幼虫中检测到三种挥发性混合物,这些挥发性混合物很容易被成年工蜂监测到。两种生化手段均证实,挥发物中的一种醋酸盐成分与蜜蜂球囊菌孢子感染的蜜蜂幼虫联系密切,从而引发了蜜蜂的卫生行为,所以具有敏感识别气味能力的蜜蜂具有较强的清理能力。神经生物学相关研究证实,患病蜂群查探到病原菌时间的长短对于其抗病能力而言至关重要,蜜蜂必须在病原菌的感染力达到一定程度之前侦察到并移走患病蜜蜂个体(Arathi and Spivak, 2001; Arathi *et al.*,2006),否则当病原菌达到传播水平,移走患病蜜蜂的过程可能会加剧病原菌的传播。Invernizzi 等(2011)研究发现具有较强卫生行为的蜂群其优势在于能够在早期发现感染幼虫的死亡并在它们变成干尸之前将其迅速清出巢房。

3.1.2 温度调节行为 蜜蜂通过加热、冷却、改变空气流通速度来调节蜂巢内部温度(Seeley and Visscher, 1985)。在蜂巢中,蜜蜂群体将温度维持在 32 ~ 34℃左右并且设法抑制巢房内湿度出现波动。这种调节温度的能力是蜜蜂抵御生物入侵的一种方法。关于蜜蜂产热来应对病原菌威胁的研究已有报道,Starks 等(2000)发现微小的但是有显著意义的巢础升温,这种升温出现在白垩病的病原菌——蜜蜂球囊菌入侵的时候。蜜蜂球囊菌在 30℃(Bailey, 1981)时最容易对蜜蜂幼虫发起进攻,所以作者推测在病原菌入侵时巢础中 0.56℃的平均升温可能抑制了病原菌的增殖。巢房内温度的降低会增加白垩病的流行,将蜜蜂幼虫于 34℃进行体外培养,同时用蜂球囊菌孢子饲喂蜜蜂幼虫,实验期间将培养温度降低至 27℃,持续进行 24 h,发现期间实验幼虫由于患白垩病而死亡的概率明显升高(Vojvodic *et al.*,2011b),表明温度对白垩病发展程度影响显著。

3.1.3 其他行为 蜜蜂通过梳理行为来清除外来物质,抗病能力较强的蜜蜂用中足进行梳理以防止病原微生物传播到同伴身上。蜜蜂还通过与同伴相互梳理来移除外来物质和同伴身上的病原微生物。Boecking 和 Spivak(1999)提出,蜜蜂的同伴梳理行为可能是由一种梳理舞蹈行为引起的,目前蜜蜂通过梳理行为来损伤或杀死蜂螨的报道研究较多。大部分被病原菌感染的蜜蜂很可能死亡在蜂巢外,蜜蜂能够及时将死亡的成年蜂从巢房中清除,这些行为降低了潜在的病原菌感染蜂群的几率,有利于蜜蜂群体健康(Kralj and Fuchs, 2006, Naug and Gibbs, 2009)。Simone-Finstrom 和 Spivak (2012)发现当蜂群受到蜜蜂球囊菌感染时,蜂群会增加采集蜂胶的蜜蜂数目来抵抗病原菌侵袭,蜜蜂并不摄食蜂胶而是将蜂胶放在蜂箱中来抑制真菌孢子的繁殖。在实验中,增加蜂胶采集的蜂群明显降低了被蜜蜂球囊菌感染的几率,有力地证实蜂胶抗白垩病的效用。

3.2 生理机制

3.2.1 物理防御 蜜蜂球囊菌通过攻破蜜蜂主要的物理防御屏障——角质层和上皮层来感染蜜蜂(Glinski and Jarosz, 2001)。角质层和上皮层的化学组成成分,如蜡和不饱和脂肪酸,具有很强的抗真菌活性,从而阻止病原菌黏附或是进入蜜蜂体内。Crailsheim 和 Riessberger-Gallé (2001) 发现成年蜜蜂的中肠具有一种或多种非诱导性的、对温度稳定的物质,这些物质可能抑制了孢子的萌发,从而降低甚至消除了孢子对蜜蜂的侵染能力。成年蜜蜂中肠提取物的抗菌能力明显强于蜜蜂幼虫的中肠提取物,这种差异很可能就是由于这种物质含量存在差异造成的,这也导致了不同

幼虫个体对病原菌的敏感性不同和抗病能力差异。但关于这种物质是蜜蜂合成的还是存在于蜂产品中尚未得出结论(Crailsheim and Riessberger-Gallé, 2001)。另外,蜜蜂还可以通过改变中肠的pH 值或其他化学条件来抑制微生物的入侵。

3.2.2　免疫防御　当外在的物理屏障被攻破之后,蜜蜂会通过激活由细胞免疫和体液免疫组成的生理性免疫防御系统抵御真菌的侵染(Glinski and Buczek, 2003)。蜜蜂体内的血淋巴一旦检测到入侵病原,细胞免疫应答反应随即开始,同时两种抗菌肽——蛾血素和溶解酵素在被侵染的数小时之后特征性地出现在血淋巴中(Stanley and Miller,2006),有力地抵抗病原菌的侵袭。吞噬作用和封闭作用在蜜蜂抵御致病性真菌的过程中是最常见的防御机制(Glinski and Buczek, 2003)。与免疫相关的血细胞可以直接杀死真菌孢子,并且通过噬菌作用机制毁灭其他外来小分子(Stroschein-Stevenson *et al.*,2009)。体液免疫的活化作用诱导 AMPs 和溶菌酶的合成,并且激活了酚氧化酶合成系统。这些协同作用能够钝化或杀死入侵微生物(Stanley *et al.*,2009),在一定程度上保护蜜蜂不被病原菌侵染。

3.2.3　激活信号通路　除了物理防御和免疫防御,蜜蜂还通过加剧免疫应答对病原菌的侵入做出反应。蜜蜂具有 4 种主要的并相互关联的反应通路:Toll、Imd、Jak/STAT 和 Jnk 通路(Theopold and Dushay, 2007)。这些通路由识别病原菌侵入信号的蛋白质、调节和放大这些信号的蛋白以及直接参与病原菌抑制作用的效应蛋白和代谢物组成(Lemaitre and Hoffmann, 2007)。识别蛋白与不同病原菌的结合存在一定的差异,从而特异性地识别不同的病原菌。例如,β-葡聚糖存在于真菌病原菌的表面,识别蛋白特异性地识别这种物质,将入侵信号传递出去。发现入侵物以后,识别蛋白与蛋白酶、其他细胞因子以及一些信号物质发生作用,最终影响跨膜蛋白,Toll 信号通路和 Jak/STAT 信号通路就是这样起作用的。但是也有例外,Imd 信号通路中本身就存在跨膜蛋白,可以直接与其他蛋白发挥作用。最终转录因子编码抗菌性的多肽或是其他效应因子,免疫途径释放,从而发挥防御病原菌的作用(Evans and Spivak, 2010)。

3.3　分子机制

蜜蜂基因组测序工作的完成为从分子水平进一步研究蜜蜂的抗白垩病机制提供了重要基础。如果能够从分子水平掌握蜜蜂的抗白垩病机制,筛选出与蜜蜂抗白垩病性状密切相关的分子标记,我们就可以为培育抗白垩病蜂种提供理论及技术支持。Hospital(2009)认为,相对与确定抗病性显性基因的大难度、高成本,筛选分子遗传标记无疑为一种有效的育种手段。蜜蜂的卫生行为等一些行为性状几乎都是最理想的抗白垩病性状,但是很难对它们进行准确的定性及定量检测,而分子遗传标记可以直接通过确定与目标基因紧密连锁的基因位点而加快选择速度和提高选择准确度。

筛选抗病性状相关基因的方法主要有两种。一种方法是利用微阵列技术对抗白垩病蜜蜂和白垩病易感蜜蜂进行研究和比较,找出差异表达的基因,再作进一步分析和验证。微阵列技术的优点是可以从行为和生理水平描述基因表达模式,从而获得与抗白垩病性状相关的目的基因,缺点是蜜蜂样本的遗传背景差异会影响基因表达,从而降低实验结果的准确度。另一种方法是用数量性状基因座定位(quantitative trait locus,QTL)技术在染色体区域寻找影响抗白垩病性状的相关基因,因为 QTL 技术适用于所有的遗传性状,通过研究影响性状表达的数量性状基因的数量及它们的相关效应,估算该基因在染色体上的位置(Lapidge *et al.*,2002),从而有效地筛选出目的基因。

Holloway 等(2012)提取了抗白垩病蜜蜂和易感白垩病蜜蜂的 DNA,对其单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点与抗病性状之间的关系进行了研究。通过单标记绘图发现,只有第二条和第十一条染色体的似然比值(logarithm of the likelihood ratio)大于 2.5,从而证明这两条染色体与蜜蜂抗白垩病性状密切相关,同时,筛选出 4 个与抗病性状相关的 SNP 位点附近的一百多条基因,这些潜在的候选分子标记培育抗白垩病蜂种提供了良好的思路。Aronstein 和 Murray(2010)使用 cDNA-AFLP 和 qRT-PCR 分析,发现了蜜蜂发挥抗真菌感染作用所需的主要转录物,这些转录物还参与转录调节、细胞凋亡、营养代谢及 RNA 转录加工等重要事件,更值得关注的是转录基因与抗白垩病相关的 SNP 位点具有很高

的相似性。这些研究无疑为我们改良蜜蜂遗传信息、培育抗病蜂种提供了宝贵的信息。

4 展望

长期以来,人们对蜜蜂抗白垩病机制进行了多方位、深层次的研究,在很多方面取得了进展,但总体研究多集中在行为水平和生理水平,而对培育抗白垩病蜂种最为重要的分子机制的研究还存在很多空白领域,少量的关于蜜蜂抗白垩病相关的候选基因也未进行验证,更没有进行基因功能的研究,因此深入到基因层面来确定与蜜蜂抗白垩病性状相关的分子遗传标记研究刻不容缓。

Liu 等(2011)利用新一代高通量测序技术成功筛选出与蜜蜂哺育、采集行为转变相关的 mRNA, Li 等(2012)采用 Illumina-Solexa 深度测序技术来揭示了不同的蜜蜂属中采集蜂基因表达的差异,为从分子水平筛选出与抗白垩病相关的基因提供了技术思路。此外,我们只有从分子水平掌握蜜蜂抗白垩病的机制,找出抗白垩病性状相关的基因,才有可能成功培育抗白垩病蜂种,解决日益严峻的白垩病病害。因此,利用分子遗传标记辅助选育和基因工程技术选育抗白垩病新蜂种无疑是一个最有效、最长远的发展方向,也是养蜂业健康发展的有效保障之一。

参考文献(References)

Arathi HS, Ho G, Spivak M, 2006. Inefficient task partitioning among nonhygienic honeybees. *Apis mellifera* L., and implications for disease transmission. *Animal Behaviour*, 72:431 – 438.

Arathi HS, Spivak M, 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 62:57 – 66.

Aronsrein KA, Murray KD, 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103:S20 – S29.

Aronsrein KA, Murray KD, Saldivar E, 2010. Transcriptional responses in honey bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics*, 11:391.

Bailey L, 1981. Honey bee Pathology. Academic Press, London, UK. 40 – 44.

Bailey L, Ball BV, 1991. Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK. 53 – 62.

Boecking O, Spivak M, 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30:141 – 158.

Crailsheim K, Riessberger-Galle U, 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, 32:91 – 103.

Evans JD, Spivak M, 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103:S62 – S72.

Flores J, Spivak M, Gutierrez I, 2005a. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Vet. Microbiol.*, 108:141 – 144.

Flores JM, Gutierrez I, Espejo R, 2005b. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia*, 97:1171 – 1176.

Glinski Z, Buczek K, 2003. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta*, 38:183 – 189.

Glinski Z, Jarosz J, 2001. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta*, 36(1):12 – 24.

Holloway B, Sylvester HA, Bourgeois L, Rinderer TE, 2012. Association of single nucleotide polymorphisms to resistance to chalkbrood in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 51(2):154 – 163.

Hospital F, 2009. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica*, 136:303 – 310.

Invernizzi C, Rivas F, Bettucci L, 2011. Resistance to chalkbrood disease in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies with different hygienic behavior. *Neotrop. Entomol.*, 40(1):28 – 34.

James RR, 2005. Impact of disinfecting nesting boards on chalkbrood control in the alfalfa leafcutting bee. *J. Econ. Entomol.*, 98(4):1094 – 1100.

Kluser S, Peduzzi P, 2007. Global Pollinator Decline: A Literature Review. UNEP/GRID-Europe. 1 – 12.

Kralj J, Fuchs S, 2006. Parasitic Varroa destructor mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37:577 – 587.

Lapidge KL, Oldroyd BP, Spivak M, 2002. Seven suggestive quantitativ trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Biomedical and Life Sciences*, 89:565 – 568.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25:697 – 743.

Li ZG, Liu F, Li WF, Zhang SW, Niu D, Xu HS, Hong QH, Chen SL, Su SK, 2012. Differential transcriptome profiles of heads from foragers: comparison between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Apidologie*,

Published on line, DOI:10.1007/s13592-012-0119-z.

Liu F, Li WF, Li ZG, Zhang SW, Chen SL, Su SK, 2011. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: Comparison between nurses and foragers. *Journal of Insect Physiology*, 57:274 – 279.

Maassen A, 1913. Weitere Mitteilungen uber der seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees]. *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt fur Land-und Forstwirtscshaft*, 14:48 – 58.

Martha G, Stephen T, Gary V, 1983. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease, *J. Apidologie*, 14:29 – 39.

Naug D, Gibbs A, 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*. doi:10.1051/apido/2009039.

Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM, 2006. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol. Biol.*, 15 (5):715 – 718.

Seeley TD, Visscher PK, 1985. Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecological Entomology*, 10:81 – 88.

Simone-Finstrom MD, Spivak M, 2012. Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees? *PLoS ONE*, 7(3):1 – 7.

Stanley D, Miller J, Tunaz H, 2009. Eicosanoid actions in insect immunity. *J. Innate Immun.*, 1:282 – 290.

Stanley DW, Miller JS, 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119(1):1 – 13.

Starks PT, Blackie CA, Thomas D, Seeley PT, 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87:229 – 231.

Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD, 2009. Phagocytosis of *Candida albicans* by RNAi-treated *Drosophila* S2 cells. *Methods Mol. Biol.*, 470:347 – 358.

Swanson JAI, Torto B, Kells SA, Mesce KA, Tumlinson JH, Spivak M, 2009. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: Identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae. *J. Chem. Ecol.*, 35: 1108 – 1116.

Taber S, 1992. Studies on chalkbrood disease. *American Bee Journal*, 132(5):327 – 328.

Theantana T, Chantawannakul P, 2008. Protease and β-N acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *J. Apicult. Res.*, 47(1):68 – 76.

Theopold U, Dushay MS, 2007. Mechanisms of *Drosophila* immunity—an innate immune system at work. *Curr. Immunol. Rev.*, 3:276 – 288.

Vojvodic S, Jensen AB, Markussen B, Eilenberg J, Boomsma JJ, 2011a. Genetic variation in virulence among chalkbrood strains infecting honeybees. *PLoS ONE*, 6:1 – 5.

Vojvodic S, Jensen AB, James RR, Boomsma JJ, Eilenberg J, 2011b. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Veterinary Microbiology*, 149:200 – 205.

梁勤, 陈大福,2009. 蜜蜂保护学(第二版). 北京:中国农业出版社. 83 – 85.

熊翠玲, 2010. 蜜蜂白垩病分子诊断技术的研究. 硕士学位论文. 福州:福建农林大学.

赵柏林, 2007. 蜜蜂白垩病 PCR 及荧光实时定量 PCR 诊断方法的建立. 硕士学位论文. 长春:吉林农业大学.