同一生境条件下六个野生授粉蜂种间蜜蜂 RNA 病毒的传播与流行*

周云倩[1**] 汪正威[2] 缪思位[3] 刘 军[3] 张 炫[1***]

（1. 云南农业大学动物科学技术学院蜂学系，昆明 650201；2. 中国科学院西双版纳热带植物园，昆明 650223；
3. 普洱蜜林生物科技有限公司，普洱 665000）

摘 要 **【目的】** 新病原侵害是导致全球授粉蜂群数量持续下降的主要原因，加之现代养蜂业规模和范围的不断扩大，正对我国本土野生授粉蜂种健康造成严重威胁。为此在我国授粉蜂种多样性最为丰富的西双版纳地区开展蜜蜂 RNA 病毒病感染状况研究，以获取地区重要授粉蜂种蜜蜂 RNA 病毒感染状况数据，为本土授粉蜂种多样性保护提供基础数据。**【方法】** 利用荧光定量 PCR 方法对野生授粉蜂种多样性最为丰富的西双版纳地区广泛分布的 6 个蜜蜂种(黑胸无刺蜂 *Tetragonula pagdeni*、黄纹无刺蜂 *Lepidotrigona flavibasis*、光足无刺蜂 *Tetragonula laeviceps*、顶无刺蜂 *Lepidotrigona terminata*、大蜜蜂 *Apis dorsata* 和小蜜蜂 *Apis florea*) 进行云南省最常见的 5 种蜜蜂 RNA 病毒[黑蜂王台病毒 Black queen cell virus (BQCV、慢性麻痹病毒 Chronic bee paralysis virus (CBPV)、残翅病毒 Deformed wing virus (DWV)、以色列麻痹病毒 Israeli acute paralysis virus (IAPV)和囊状幼虫病毒 Sacbrood bee virus (SBV)]定量定性分析。**【结果】** 数据显示黑蜂王台病毒（BQCV）检出率最高，为 56.7%；其次是囊状幼虫病毒（SBV）和慢性麻痹病毒（CBPV）分别为 53.3%和 44.4%，而残翅病毒（DWV）和以色列急性麻痹病毒（IAPV）感染率较低，分别为 38.9%和 25.6%；且这 6 种野生授粉蜂种均存在多种病毒联合感染的现象。因 SBV 在 6 个蜂种样本中均被检出，又对其进行了定量分析，数据显示小蜜蜂阳性样本的 SBV 拷贝量最高，大蜜蜂的 SBV 拷贝量最低，与两种饲养蜂种（西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和东方蜜蜂 *Apis cerana*）比较，西方蜜蜂样本的 SBV 携带量显著高于其他蜂种。在对 6 种野生蜂寄主 SBV 毒株的 Lp 区氨基酸序列的分析中发现 6 种野生蜂样本中的 SBV 的氨基酸序列与原寄主西方蜜蜂毒株发生程度不同的变异。其中小蜜蜂、黄纹无刺蜂、顶无刺蜂毒株变异度较大，并表现为一个相似度较大的变种毒株。**【结论】** 实验结果表明因外来蜂种-西方蜜蜂饲养范围的不断扩大，其携带的多种蜜蜂 RNA 病毒已通过蜜粉食物途径传播到本地区多种主要授粉蜂种中，并表现较高的感染率，已对地区本土野生授粉蜂种的健康产生威胁。

关键词 RT-qPCR；同生境条件；本土野生授粉蜂种；蜜蜂 RNA 病毒；流行与传播

RNA virus transmission and epidemic potential among six wild bee species from identical habitat conditions

ZHOU Yun-Qian[1**] WANG Zheng-Wei[2] MIAO Si-Wei[3] LIU Jun[3] ZHANG Xuan[1***]

(1. Department of Apiology in Faculty of Animal Science and Techology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
3. Puer Milin Biotechnology Co., Ltd., Puer 665000, China)

Abstract **[Aim]** The spillover of new pathogens, potentially as a result of the co-occurrence of viruses in wild bees and honeybees, is a significant factor contributing to the decline in breeding bee colonies. The continuous expansion in the scale and scope of the beekeeping industry may also pose a threat to the health of wild bee pollinators in China. In this study, we

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31560667）；云南省国际科技特派员项目（202203AK140020）

**第一作者 First author，E-mail：1105069077@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：879308688@qq.com

收稿日期 Received：2023-11-21；接受日期 Accepted：2024-03-11

conducted a survey on the infection status of bee RNA virus disease across six wild bee species in Xishuangbanna, a region of China known for its rich diversity in bee species. The data obtained from this research will enhance our understanding of RNA virus infections in wild bee species in this tropical region and aid in the protection of local pollinator species. **[Methods]** Five honeybee viruses, including Black queen cell virus (BQCV), Sacbrood bee virus (SBV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), SBV, and Israel acute paralysis virus (IAPV) were investigated in six wild pollinating bee species from Xishuangbanna, including four species of stingless bees (*Tetragonula pagdeni*, *Lepidotrigona flavibasis*, *Tetragonula laeviceps*, *Lepidotrigona terminata*), and two species of honeybee (*Apis dosata*, *Apis florea*). **[Results]** Black queen cell virus (BQCV) was found to be the most prevalent virus (56.7%), followed by SBV (53.3%), CBPV (44.4%) SBV (38.9%), and IAPV (25.6%). Multiple virus co-infections were identified across all six bee species, with SBV detected and quantified in each. The results showed that the prevalence of SBV was highest in *Apis florea* and lowest in *Apis dorsata*. Amino acid sequence analysis of the Lp region from different SBV strains between the six bee hosts showed a high level of diversity compared to the original host (*Apis mellifera*) virus strain. The amino acid sequences from *Apis florea*, *Lepidotrigona flavibasis,* and *Lepidotrigona terminata* showed a high degree of similarity to the variant strain, which could be a novel sequence. **[Conclusion]** This research contributes valuable insights into the distribution of bee virus hosts, driven by the continuous expansion of the breeding range of introduced honeybee species (*Apis mellifera*). The emergence of new pathogens in *A. mellifera* could pose a threat to important local pollinators.

Key words RT-qPCR; same habitat conditions; local wild honeybee species; bee RNA virus; transmission and epidemic

近年来，因新病原的传播与扩散导致以全球范围蜜蜂为代表的授粉昆虫种群数量急剧下降（Maggi *et al.*，2016）。蜜蜂可为植物提供有效的授粉活动，进而为植食性动物提供食物，我国资源蜂种的持续丢失对地区生态系统和生物多样性的稳定已产生不可忽视的影响（张炫等，2012）。

蜜蜂病毒是影响蜜蜂健康的主要病原体（Tantillo *et al.*，2015），蜜蜂 RNA 病毒因缺乏校对机制而具高变异性，可通过同生境下共享食物途径对以花蜜花粉为食的多种野生蜂种进行侵染（Singh *et al.*，2010），并在不良环境条件下流行与爆发，威胁蜜蜂种群健康。云南省西双版纳傣族自治州属热带季风性气候，是我国授粉蜂种生物多样性最为丰富的地区，分布有 5 个本土野生蜜蜂种，也是无刺蜂多样性最为丰富的地区。此前已在当地大蜜蜂 *Apis dorsata* 和小蜜蜂 *Apis florea* 的蜂群中检测出蜜蜂残翅病毒（Deformed wing virus，DWV）和黑蜂王台病毒（Black queen cell virus，BQCV）（Zhang *et al.*，2012）。

热带地区超过 25%的植物依靠无刺蜂授粉（Heard, 1999），无刺蜂种群密度对于维护地区生态系统发挥重要作用。研究数据显示阿根廷和巴西的多种无刺蜂（*Tetragonisca fiebrigi*、*Plebeia droryana*、*Plebeia emerinoides*、*Trigona spinipes*、*Nannotrigona testaceicornis*、*Tetragonisca angustula* 和 *Tetragona elongata*）被检测到多种蜜蜂 RNA 病毒（Alvarez *et al.*，2018；Guimarães-Cestaro *et al.*，2020）。但国内仍缺乏较为全面的蜜蜂 RNA 病毒在野生无刺蜂种群中流行与传播的相关数据（Zhang *et al.*，2021），为了深入了解原寄主为西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的蜜蜂 RNA 病毒对本地授粉种群的危害状况，并获得有关野生蜜蜂中蜜蜂 RNA 病毒的分布信息，本研究对西双版纳地区分布的 4 种土著无刺蜂种（黑胸无刺蜂 *Tetragonula pagdeni*、黄纹无刺蜂 *Lepidotrigona flavibasis*、光足无刺蜂 *Tetragonula laeviceps*、顶无刺蜂 *Lepidotrigona terminata*）样本进行 RT-qPCR 定量检测，同时比对同生境下的大蜜蜂和小蜜蜂两个野生蜂种蜜蜂 RNA 病毒感染情况，用以评估多寄主蜜蜂 RNA 病毒对本土重要野生授粉蜂种的威胁，为地区授粉蜂种多样性保护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样本采集及保存

在中国科学院西双版纳热带植物园内采集 4

种常见无刺蜂种（黑胸无刺蜂、黄纹无刺蜂、光足无刺蜂和顶无刺蜂）和两种野生蜜蜂种（大蜜蜂和小蜜蜂）样本，每个蜂种 3 群，每群 15 头，标记后置于 - 80 ℃液氮保存。

1.2　总 RNA 提取及反转录

将获得的蜜蜂样本按每群 5 头，参照 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂说明书提取样品总 RNA，标记后于 - 80 ℃冰箱贮存备用。

使用 Hifair® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)试剂盒对提取的 RNA 进行反转录，反应体系：ddH_2O 7 μL，5×g DNA digester Mix 3 μL，RNA 模板 5 μL。42 ℃孵育 2 min，然后进行反转录。将配制好的混合液加入去除基因组 DNA 的反应液中，混合液体系：4×Hifair® SuperMix plus 5 μL。反应程序：25 ℃ 5 min，55 ℃ 15 min，85 ℃ 5 min。

1.3　5 种蜜蜂 RNA 病毒的荧光定量 PCR 检测方法建立

使用零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒将纯化回收目的片段克隆至 pUCI-Blunt Zero 载体，构建重组质粒 pUCI-Blunt。后使用质粒小提试剂盒收获阳性质粒。测定标准品的浓度并根据公式计算拷贝数（copies/μL）=（6.02×1 023）×（ng/μL×10^{-9}）/（DNA length×660）。用 ddH_2O 对标准质粒进行 10 倍等比稀释，对质粒终浓度进行计算，放入 - 20 ℃冰箱保存备用。

1.4　样本蜜蜂 RNA 病毒定量检测

蜜蜂样本两步法反应体系为 20 μL：Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL，正向引物 0.4 μL，反向引物 0.4 μL，DNA 1 μL，ddH_2O 8.2 μL，反应程序如下：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃（具体退火温度见表 1）退火/延伸 30 s，40 个循环。

1.5　阳性样本的 SBV 序列分析

试验所用的 5 种 RNA 病毒的荧光定量 PCR 引物碱基序列见表 1。对 6 个总 RNA 样本进行 SBV 序列测定，将 SBV 阳性样本的 RT-PCR 产物纯化后送检，获得 6 个蜂种样本的 SBV 基因序列用于核苷酸序列以及氨基酸序列分析。

表 1　5 种 RNA 病毒的荧光定量 PCR 引物碱基序列

Table 1　Fluorescent quantitative PCR primers of five honeybee viruses

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence	产物长度（bp） Product length (bp)	参考文献 References
DWV-F	TCATCCGTAGAAAGCCGAGT	121	王红坤等，2022
DWV-R	TGTGGTGTAGTAAGCGTCGT		
SBV-F1	ATGCGGTGGCTATGCGAGTAAATC	86	王艺桦等，2023
SBV-R1	CAACGTAGTGCGAGGCTCATCAG		
SBV-F2	CAAGAACGTCCACTACACCGA	248	
SBV-R2	GCTGTGTAGCGTCCCCCTGAATAGATT		
BQCV-F	ATAGTGGCGGAGATGTATGC	133	秦浩然，2012
BQCV-R	GAGTAGTAGGAGCGACTTCAC		
CBPV-F	ACCGAATCTGATTATTGTGAAGCC	73	张体银等，2022
CBPV-R	GCTCGCAAATGGCGTTAGA		
IAPV-F	ACTAGTGGACGAAGCGAGTT	127	张体银等，2021
IAPV-R	TGTACTGGGCAGTTACAGCA		

2　结果与分析

2.1　6 种蜜蜂样本 RNA 病毒的阳性检出率

本次研究中的 6 个蜂种检测样本量均为 15 头工蜂（*N*=15），其中蜜蜂黑胸无刺蜂样本被检出 3 种蜜蜂病毒阳性，DWV 的检出率最高为 73%，其次为 SBV 和 IAPV 均达为 60%，BQCV 和 CBPV 未检出；黄纹无刺蜂在进行的 5 种蜜蜂

RNA 病毒检测中均被检出阳性样本，其中 DWV 感染率最高，为 66.7%；光足无刺蜂除 DWV 未检出外，其他 4 种蜜蜂 RNA 病毒均被检出，CBPV 和 BQCV 的检出率各高达 100%和 73.3%；顶无刺蜂样本的 5 种蜜蜂 RNA 病毒均被检出阳性样本，感染率最高为 BQCV 的 40%，最低为 SBV 的 20%。同生境下的大蜜蜂样本被检出 3 种蜜蜂 RNA 病毒，其中 BQCV 病毒检出率为 100%，SBV 检出率为 80%，DWV 检出率为 60%；在小蜜蜂样本中 5 种蜜蜂病毒均被检出，其中 BQCV、CBPV 和 SBV 的检出率均高达 100%，而 DWV 和 IAPV 的检出率分别为 6.7%和 13.3%（表 2）。

所有蜂种均出现单样本多病毒感染现象，黑胸无刺蜂和黄纹无刺蜂的单样本 3 种病毒检出率为 26.7%，光足无刺蜂和顶无刺蜂的单样本 4 种病毒检出率为 6.7%。而大蜜蜂的单样本 60%的 3 种病毒检出率和小蜜蜂单样本 20%的 4 病毒检出率均高于无刺蜂（表 3）。

表 2　6 个蜜蜂种样本的单一病毒检出率(阳性样本百分比)

Table 2　Prevalence of five bee virus in wild bees (percentage of positive samples)

蜂种 Bee species	病毒检出率（%）Virus detection rate (%)				
	DWV	SBV	BQCV	CBPV	IAPV
黑胸无刺蜂 *Tetragonula pagdeni*	73.3	60.0	0.0	0.0	60.0
黄纹无刺蜂 *Lepidotrigona flavibasis*	66.7	11.1	26.7	20.0	20.0
光足无刺蜂 *Tetragonula laeviceps*	0.0	33.3	73.3	100.0	26.7
顶无刺蜂 *Lepidotrigona terminata*	26.7	20.0	46.6	35.0	33.3
大蜜蜂 *Apis dorsata*	60.0	80.0	100.0	0.0	0.0
小蜜蜂 *Apis florea*	6.7	33.3	33.3	33.3	13.3

DWV：残翅病毒 Deformed wing virus；SBV：囊状幼虫病毒 Sacbrood bee virus；BQCV：黑蜂王台病毒 Black queen cell virus；CBPV：慢性蜜蜂麻痹病毒 Chronic bee paralysis virus；IAPV：以色列麻痹病毒 Israeli acute paralysis virus.

表 3　6 种蜜蜂样本的多病毒感染率

Table 3　Percentage of virus co-infection in six wild bee species

蜂种 Bee species	混合感染病毒数量 Number of co-infected viruses		
	4 (%)	3 (%)	2 (%)
黑胸无刺蜂 *Tetragonula pagdeni*	—	26.7	40.0
黄纹无刺蜂 *Lepidotrigona flavibasis*	—	26.7	20.0
光足无刺蜂 *Tetragonula laeviceps*	6.7	33.3	46.7
顶无刺蜂 *Lepidotrigona terminata*	6.7	13.3	40.0
大蜜蜂 *Apis dorsata*	—	60.0	26.7
小蜜蜂 *Apis florea*	20.0	13.3	—

黑胸无刺蜂样本同时检出 3 种蜜蜂病毒（DWV、SBV 和 IAPV）的比例率为 26.7%，黄纹无刺蜂样本 5 种蜜蜂病毒均被检出（DWV、SBV、BQCV、CBPV 和 IAPV），但同一样本同时检出 3 种病毒的比例为 26.7%，光足无刺蜂样本同时检出 4 种病毒（SBV、BQCV、CBPV 和 IAPV）的比例为 6.7%，顶无刺蜂样本 5 种蜜蜂病毒均被检出（DWV、SBV、BQCV、CBPV 和 IAPV），但同一样本同时检出 4 种病毒的比例为 6.7%，大蜜蜂和小蜜蜂样本 5 种蜜蜂病毒均被检出（DWV、SBV、BQCV、CBPV 和 IAPV），且混合感染率均高于无刺蜂。

The three viruses detection rate of *Tetragonula pagdeni* and *Lepidotrigona flavibasis* is 26.7% in single sample. The four viruses detection rate of *Tetragonula laeviceps* and *Lepidotrigona terminata* is 6.7% in single sample. Both *A. dorsata* and *A. florea* samples were detected five viruses and the mixed infection rate is higher than other five stingless bees species.

2.2　6 种野生蜂及 2 种饲养蜂种样本 SBV 病毒量定量及氨基酸序列差异性分析

2.2.1　6 种授粉蜂样本 SBV 病毒量定量检测及差异性分析

西双版纳地区的 6 种野生蜂样本 SBV 携带量进行定量检测，并与两种本地区人工饲养蜂种——西方蜜蜂和东方蜜蜂样本的

SBV 拷贝量进行比对，结果显示西方蜜蜂的 SBV 拷贝量最高；大蜜蜂样本的 SBV 拷贝量最低，东方蜜蜂和小蜜蜂样本的 SBV 携带量均显著高于无刺蜂样本（图 1）。

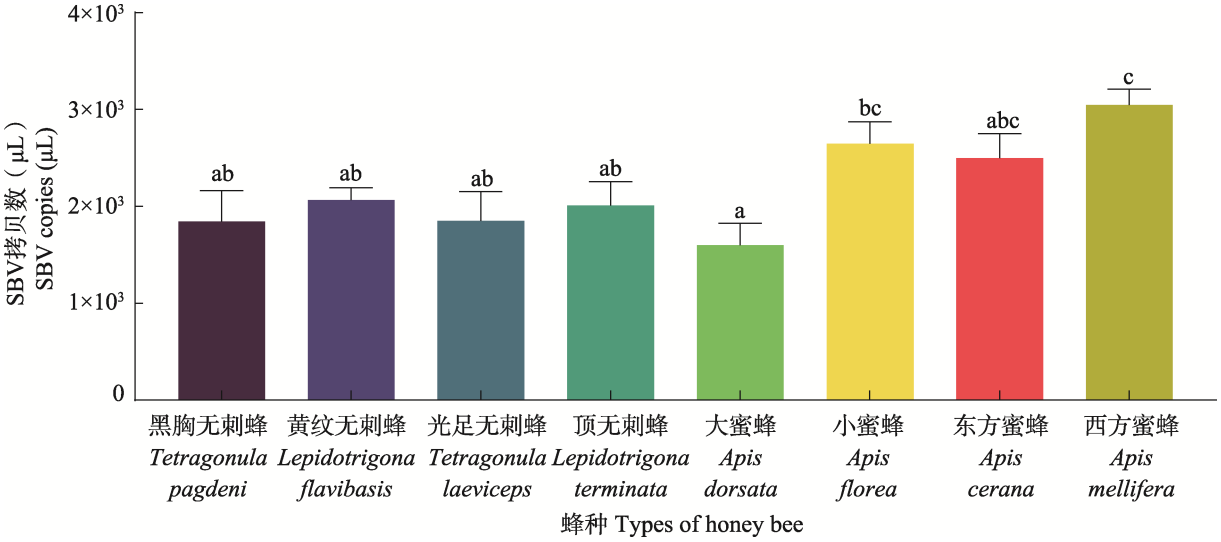

图 1　6 种野生蜂和 2 种饲养蜂种工蜂样本的 SBV 拷贝量差异性分析

Fig. 1　SBV copy quantity difference among six wild bee and two domestic bees

柱状图上标有不同字母表示差异显著（P<0.05，单因素方差分析），
相同字母表示差异不显著（P>0.05，单因素方差分析）。
Different letters above bars indicate significant difference (P<0.05, one-way ANOVA),
while the same letters indicate no significant difference (P>0.05, one-way ANOVA). The same below.

2.2.2　6 种野生蜂与 2 种饲养蜂种（东方蜜蜂和西方蜜蜂）样本 SBV 核酸序列系统进化分析及 SBV 不同寄主毒株 Lp 区氨基酸序列比对　对所获得的 6 个野生蜂种核酸序列进行系统发育分析，并引入 2 种饲养蜂种（东方蜜蜂和西方蜜蜂）的 SBV 核酸数据进行比对，发现 4 种无刺蜂和 2 种野生蜜蜂（大蜜蜂和小蜜蜂）扩增的 SBV 病毒聚集在一起，本土饲养蜂种东方蜜蜂和外来蜂种西方蜜蜂的 SBV 各自在系统发育树中形成了两个不同的分支（图 2）。SBV 为正链 RNA 病毒，其高突变特性具极强的环境适应能力，可通过水平传播途径侵染新的寄主，实现跨种传播。研究结果显示，SBV 及其它 4 种蜜蜂 RNA 病毒已导致西双版纳地区 6 种主要野生授粉蜂种感染，4 种无刺蜂和 2 种野生蜜蜂的 SBV 毒株在系统发育树种显示具更高的变异性，表明 SBV 已从西方蜜蜂蜂群成功扩散到西双版纳地区的野生授粉蜂种种群中。

同时对 6 种版纳地区野生授粉蜂种 SBV 毒株 Lp 区的氨基酸序列比对后发现与西方蜜蜂的 SBV 毒株（KY465675.1）序列相似度最高。但小蜜蜂、黄纹无刺蜂、顶无刺蜂的氨基酸序列表现出较大的变异特性，而大蜜蜂、黑胸无刺蜂、光足无刺蜂的氨基酸序列具较高相似度（图 3）。

3　结论与讨论

常见的 5 种蜜蜂 RNA 病毒（DWV、SBV、BQCV、CBPV 和 IAPV）在西双版纳地区常见 4 种无刺蜂和 2 种野生蜜蜂种群中均有分布，并表现高感染率和多种病毒混合感染现象，表明原寄主为西方蜜蜂的多种蜜蜂 RNA 病毒已通过同生境食物共享途径大范围扩散到本土野生授粉蜂种群中。

蜜蜂 RNA 病毒在蜜蜂采集行为中会在蜜源植物花组织中沉积（张炫等，2012），病毒通过花蜜和花粉食物途径实现不同蜂种的水平传播

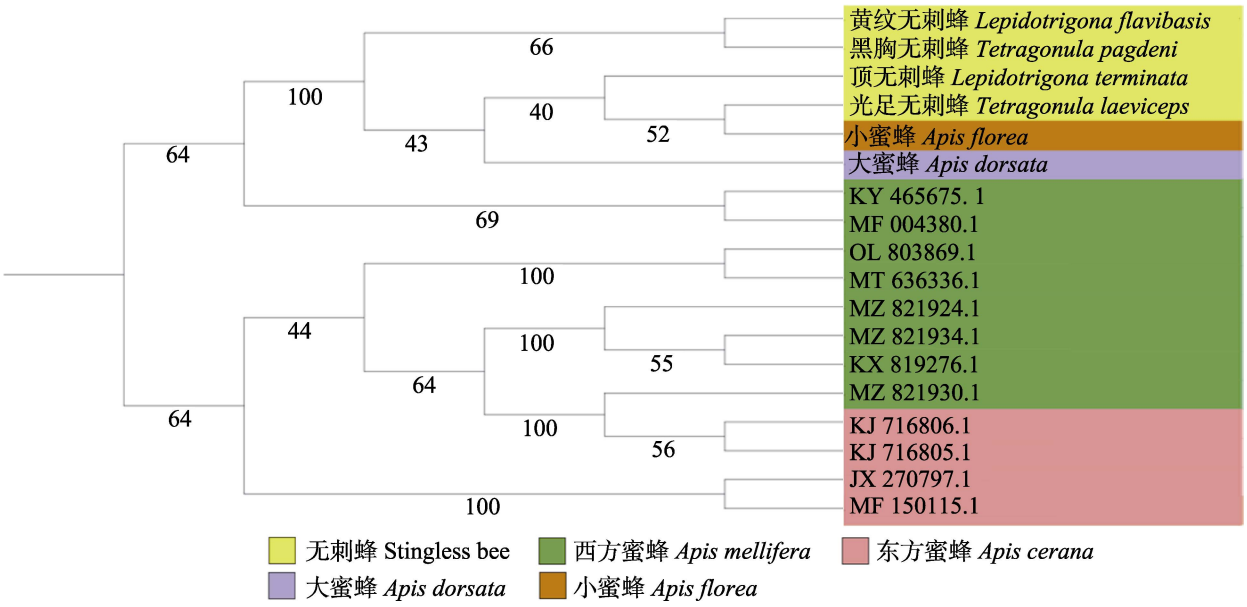

图 2　8 种寄主蜂种 SBV 毒株系统进化关系

Fig. 2　Evolutionary relationships of SBV taxa

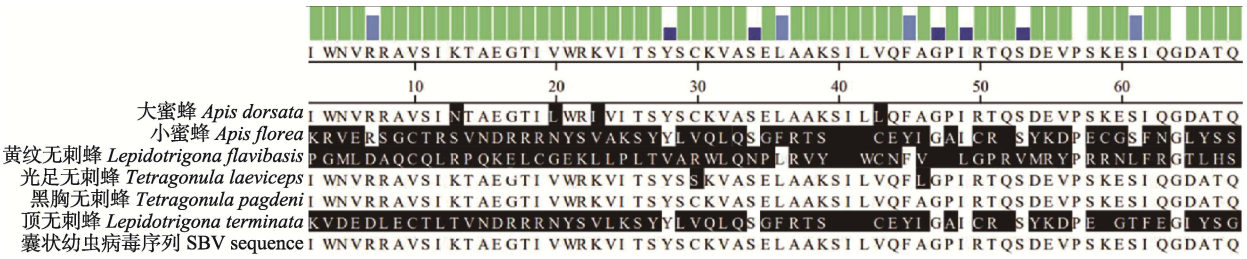

图 3　6 种野生蜂 SBV 片段与西方蜜蜂的氨基酸序列对比

Fig. 3　Comparison of amino acid sequences of SBV fragments of six wild bees

（Singh *et al.*，2010；Purkiss and Lach，2019；Dalmon *et al.*，2021；张丽娜等，2021），加之授粉蜂种社会性生活习性和互饲行为，极易实现群内传播（Alger *et al.*，2019）。而蜜蜂 RNA 病毒又通过跨世代的垂直传播方式以隐性感染的方式长期留存在于被感染蜂群中，导致感染个体活力下降，寿命缩短，当环境压力增大时通过拷贝量激增表现发病症状，危害土著授粉蜜蜂种群健康（Phillip *et al.*，2021）。

SBV 病毒核酸序列中的 Lp 区具高度可变特征，其主要发挥抑制宿主依赖性 mRNA 翻译和刺激病毒内部核糖体进入活性位点两种作用（Glaser *et al.*，2001；Hinton *et al.*，2002）。西双版纳地区 6 种主要授粉蜂种的 SBV 毒株 Lp 区氨基酸序列与原寄主西方蜜蜂的 SBV 毒株比较显示不同的变异度，其中大蜜蜂、黑胸无刺蜂、光足无刺蜂差异不显著，而小蜜蜂、黄纹无刺蜂、顶无刺蜂差异极显著。研究发现高变异性的蜜蜂 RNA 病毒在同生境条件下通过蜜粉食物途径已成功侵入多个新寄主，并因不同寄生条件在分子水平发生适应性进化（Zhang *et al.*，2012）。

实验数据显示西双版纳地区常见的野生授粉蜂种已被多种蜜蜂 RNA 病毒侵染，西双版纳地区野生授粉蜂种种群表现出的高病毒感染率和多病毒联合侵染现象已对本土重要授粉蜂种的健康水平产生潜在威胁。通过对野生蜂种病毒量动态监测有助于了解野生本土授粉蜂种的健康水平，为进行本土授粉蜂种保护提供基础数据和方法。

参考文献 (References)

Alger SA, Burnham PA, Brody AK, 2019. Flowers as viral hot spots:

Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS ONE*, 14(11): e0221800.

Alvarez LJ, Reynaldi FJ, Ramello PJ, García ML, Sguazza GH, Abrahamovich AH, Lucia M, 2018. Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Sociaux*, 65: 191–197.

Burnham PA, Alger SA, Case BK, Boncristiani H, Hébert-Dufresne L, Brody AK, 2021. Flowers as dirty doorknobs: Deformed wing virus transmitted between *Apis mellifera* and *Bombus impatiens* through shared flowers. *Journal of Applied Ecology*, 58(10): 2065–2074.

Dalmon A, Diévart V, Thomasson M, Fouque R, Vaissière BE, Guilbaud L, Le Conte Y, Henry M, 2021. Possible spillover of pathogens between bee communitiesforaging on the same floral resource. *Insects*, 12(2): 122.

Glaser W, Cencic R, Skern T, 2001. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: Involvement of C-terminal residues in self-processing and cleavage of eIF4GI. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38): 35473–35481.

Guimarães-Cestaro L, Martins MF, Martínez LC, Alves MLTMF, Guidugli-Lazzarini KR, Nocelli RCF, Malaspina O, Serrão JE, Teixeira ÉW, 2020. Occurrence of virus, microsporidia, and pesticideresidues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *Naturwissenschaften*, 107(3): 16.

Heard TA, 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44: 183–206.

Hinton T, Ross-Smith N, Warner S, Belsham G, Crabb B, 2002. Conservation of L and 3C proteinase activities across distantly related aphthoviruses. *Journal of General Virology*, 83(12): 3111–3121.

Maggi MD, Antúnez K, Invernizzi C, Aldea P, Vargas M, Negri P, Brasesco C, Jong DD, Message D, Teixeira ÉW, Principal J, Barrios C, Ruffinengo SR, Silva RR, Eguaras MJ, 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47: 835–854.

Purkiss T, Lach L, 2019. Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. *Proceedings of The Royal Society*, 286(1908): 20191071.

Qin HR, 2012. Cross-species infection of honeybee virus and *Nosema ceranae* on bumblebees. Doctor dissertation. Kunming: Yunnan Agricultural University. [秦浩然, 2012. 蜜蜂病毒与东方蜜蜂微孢子虫对熊蜂的跨种侵染. 博士学位论文. 昆明: 云南农业大学]

Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, Vanengelsdorp D, Lipkin WI, Depamphilis CW, Toth AL, Cox-Foster DL, 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter-TaxaVirus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE*, 5(12): e14357.

Tantillo G, Bottaro M, Di Pinto A, Martella V, Di Pinto P, Terio V, 2015. Virus Infections of Honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Science,* 4(3): 5364.

Wang HK, Wang YH, Zhou DY, Dong K, Zhang X, 2022. Establishment of two-step fluorescence quantitative PCR method for detection of deformed wing virus in honeybee. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 51(3): 154–161. [王红坤, 王艺桦, 周丹银, 董坤, 张炫, 2022. 蜜蜂残翅病毒两步法荧光定量 PCR 检测方法的建立. 河南农业科学, 51(3): 154–161.]

Wang YH, Wang HK, Zhou YQ, Zhou DY, Zhang X, 2023. Establishment and application of SYBR Green real-time fluorescentquantitative PCR method for sacbrood virus. *Chinese Veterinary Science*, 53(5): 559–565. [王艺桦,王红坤, 周云倩, 周丹银, 张炫, 2023. 中蜂囊状幼虫病毒 SYBR Green Ⅰ实时荧光定量 PCR 方法的建立与应用. 中国兽医科学, 53(5): 559–565.]

Zhang L, Deng Y, Zhao H, Zhang M, Hou C, 2021. Occurrence and phylogenetic analysis of deformed wing virus in stingless bee (*Apidae* sp.) in China: A case report. *Frontiers in Insect Science*, 12(1): e748074 .

Zhang LN, Deng YC, Hong CS, 2021. Occurrence and phylogenetic analysis of deformed wing virus in *Apis cerana* and *Aethina tumida*. *Journal of Environmental Entomology*, 43(5): 1107–1112. [张丽娜, 邓炎春, 侯春生, 2021. 蜜蜂残翅病毒在中华蜜蜂及其蜂箱奇露尾甲的发生与进化分析. 环境昆虫学报, 43(5): 1107–1112.]

Zhang TY, Huang CJ, Tian GN, Hong HY, Wang WJ, Zhang ZD, Lin SJ, 2021. Development and application of the real-time RT-PCR assay for the detection of Israeli acute paralysis virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 43(12): 1287–1292. [张体银, 黄嫦娇, 田国宁, 侯义宏, 王武军, 张志灯, 林素洁, 2021. 以色列急性麻痹病毒 Taq Man 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用. 中国预防兽医学报, 43(12): 1287–1292.]

Zhang TY, Wang WJ, Lin SJ, Zhang ZD, Li SY, Yu SY, 2022. Establishment of a real-time RT-PCR method for detection of the chronic bee paralysis virus. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 30(3): e1–8. [张体银, 王武军, 林素洁, 张志灯, 李宋钰, 于师宇, 2022. 蜜蜂慢性麻痹病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 中国动物传染病学报, 30(3): e1–8.]

Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. A review of bee virology progress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1095–1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1095–1116.]

Zhang X, Dong K, Zhou DY, Liu YQ, 2017. Native honeybee diversity and resource protection. Collected essays from the 2017 Academic Conference from the *Apis cerena* Working Committee of the Chinese Beekeeping Society. 2017: 8. [张炫, 董坤, 周丹银, 刘意秋, 2017. 关注本土蜜蜂资源保护. 中国养蜂学会中华蜜蜂工作委员会. 中国养蜂学会中蜂工作委员会 2017 年换届暨学术交流会论文集. 2017: 8.]

Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP, 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1): 156–159.