

서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)과 동양종 꿀벌(*Apis cerana*)에서 *Nosema ceranae* (Microsporidia)의 진단과 비교

변규호[¶] · 트란 반 또안[¶] · 이명렬 · 심하식 · 김혜경 · 윤미영 · 홍인표 · 우순옥 · 최용수*
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과 꿀벌육종연구실

Detection and Comparison of *Nosema* (*Nosema* spp.) in *Apis mellifera* and *Apis cerana*

Kyu Ho Byeon[¶], Tran Van Toan[¶], Myeong Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim,
Mi Young Yoon, In Pyo Hong, Soon Ok Woo and Yong-Soo Choi*

Department of Agricultural Biology, RDA, National Academy of Agriculture Sciences, Wanju,
Republic of Korea

(Received 4 October 2014; Revised 21 October 2014; Accepted 6 November 2014)

Abstract

The worldwide beekeeping countries has been lose colonies increasingly. *Nosema* spp. is one of factors about colony lose. *Nosema* spp. are a parasite of not only the European honey bee, *Apis mellifera*, but also several *Apis* spp. (*Apis cerana* etc.); However, little is known about the effects of *N. ceranae* on *A. mellifera* and *A. cerana*. *Nosema* positive samples (determined from light microscopy of spores) of adult worker bees were tested to determine *Nosema* species using species specific PCR primers of the 16S rDNA gene for detection of *N. Apis* and *N. ceranae*. Additionally we were detected of *Nosema* spp. by normal primer, it was detection of both *Nosema* spp. PCR detection methods is easier than morphologically method to distinguish *N. ceranae* and *N. apis*. We were detected only *N. ceranae* in all samples, indicating that this species present in apiaries by gene specific PCR. While our research was for one year, it can determinants about seasonal infection that there may be a seasonality to *N. ceranae* infections. *Nosema* spp. were increased at the spring season; So, we were counted number of spores of *Nosema* spp. in *A. mellifera* and *A. cerana* colonies at spring season by haemocytometer. Being able to foresee future *Nosema* spp. infections can be used to inform beekeepers on *Nosema* spp. management.

Key words: Colony loss, *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Nosema Apis*, *Nosema ceranae*, PCR

서 론

미포자충(Microsporidia)은 세포내에서 증식하여 궁

극적으로 마비를 일으키는 병을 일으키는 것으로써 곤충을 비롯한 무척추동물에 많이 알려져 있다 (Larsson, 1986). 이러한 미포자충(Microsporidia)은 서

*Corresponding author. E-mail: bechoi@korea.kr

[¶]: coauthor

양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에서도 문제를 일으키는 질병을 야기하는데, 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에서는 *Nosema*병을 일으키는 미포자충(Microsporidia)과 각종 질병 및 해충에 대하여서는 매우 많이 알려져 있다. *Nosema*의 세포 내 생활 형태에 대한 연구도 진행되어 (Faith H *et al.*, 1969) *Nosema*가 일으키는 세포독성은 이미 알려져 있다. 이러한 꿀벌에 피해를 주는 병원체인 *Nosema*는 꿀벌바이러스 등과 같은 각종 질병 원인체 및 해충과 연관성을 보이면서 꿀벌봉군붕괴현상의 주요한 요인으로 추측되어 관련한 연구가 활발하게 이루어졌는데(Diana L. Cox-Foster *et al.*, 2007), 좀 더 심도 있는 질병과 꿀벌봉군감소간의 연관관계를 구명하기 위한 연구가 다양하게 진행되는 중 최근 꿀벌봉군감소와 *Nosema*병의 연관성에 대한 연구결과가 보고되고 있다(Higes M *et al.*, 2006, 2007). 이러한 *Nosema*병을 일으키는 병원체는 *Nosema apis*와 *Nosema ceranae* 두 종이 있는데, *N. ceranae*는 중국 북경의 동양종 꿀벌(*A. cerana*)에서 최초로 진단되어 알려졌으며(Fries *et al.*, 1996), *N. apis*와 *N. ceranae*의 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)과 동양종 꿀벌(*A. cerana*)에의 교차 감염에 대한보고도 있다(Fries 1997). 최근에는 *N. ceranae*와 꿀벌이 마비를 일으키는 바이러스와 동시에 발생했을 때 월동기 꿀벌의 감소에 미치는 연구결과로 꿀벌의 생리·생태적 환경과 연관해서 *N. ceranae*가 봉군의 감소 및 월동 봉군 폐사에 영향을 미친다는 보고도 있다(Ivan Toplak *et al.*, 2013). *N. ceranae*는 *N. apis*와는 크기와 16s rDNA의 염기서열이 차이를 보이며, 크기는 *N. apis*가 *N. ceranae*에 비하여 크다(Ingemar Fries, 2010). 이러한 차이점을 이용하여 특이적인 primer를 제작하여 각각의 *Nosema*를 진단하거나 정량분석까지 가능한 기술이 개발되어 이용되고 있다(Brenna E. Traver *et al.*, 2011, 2012; S Nabian *et al.*, 2013). *Nosema*는 봉군 내에서 일벌의 먹이교환을 통하여 전염된다(Michael L. Smith, 2012). 따라서 거의 대부분의 꿀벌 질병이 비슷한 양상을 보이는 것과 같이 *Nosema*병도 발생초기에 방제 하지 못하면 전체 봉군으로의 확산이 매우 빠르게 된다. 현재 전세계적으로 가장 많이 쓰이고 있으며, 가장 효과적인 *Nosema* 방제 약제로 알려져 있는 것으로 fumagillin이 있다.

Fumagillin은 효과적인 *Nosema* 방제 약제이기는 하나 포유동물에 대한 독성을 가지고 있으며, 생산물에 대한 잔류의 위험성이 있는 물질이다. 이러한 fumagillin 약제를 약 10배 및 100배 희석된 저농도로 사용했을 때에는 *N. apis*의 방제에는 효과적으로 작용을 하나 *N. ceranae*를 방제하는데는 효과적이지 못하며, 원액을 사용하였을 때 약제 방제 효과가 보고되고 있는데, 그 원인으로 fumagillin 저해효소를 *N. ceranae*가 분비함으로써 일어나는 현상이며(Wei-Fone Huang *et al.*, 2013), 이 결과 *N. ceranae*를 방제하기 위하여 약제의 과다 사용으로 인한 생산물 오염을 경고하고 있다(Lowther WT *et al.*, 2000; Lefkove B *et al.*, 2007). 아울러 일벌과 여왕벌의 수명을 단축시키는 부작용도 보고되었다(Webster TC 1994; Rada V *et al.*, 1997).

따라서 본 연구에서는 꿀벌의 봉군감소에 영향을 미치는 *Nosema*병의 연중 발생 양상을 관찰하여 양봉농가의 *Nosema* 방제용 약제의 사용 시기를 결정하는데 도움을 주고 약제의 적절한 사용을 유도하여 *Nosema*병 방제 약제의 생산물에 대한 잔류로 인한 생산물 품질 하락을 감소시키고 소비자의 건강을 위협하는 요인을 없애고 특히, *N. ceranae*의 발생에 따른 올바른 방제의 중요성을 확산하여 피해를 예방할 수 있는 기초자료로 활용할 목적으로 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

Nosema 시료

Nosema 발생 양상을 확인하기 위하여 사용된 꿀벌은 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)와 동양종 꿀벌(*A. cerana*) 두 종으로서 농촌진흥청 실험양봉장의 실험봉군에서 시료를 채취하였으며, 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에서 약제처리를 하지 않은 봉군의 *Nosema* 발생 양상을 조사하였다(Fig. 1). 이러한 *Nosema* 발생 정도를 국내 사육종인 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)와 동양종 꿀벌(*A. cerana*) 두 종간 비교를 위하여 Fig. 1에서 구명된 *Nosema* 대증식기인 3~5월동안 봉군별 *Nosema* 발생을 조사하였다.

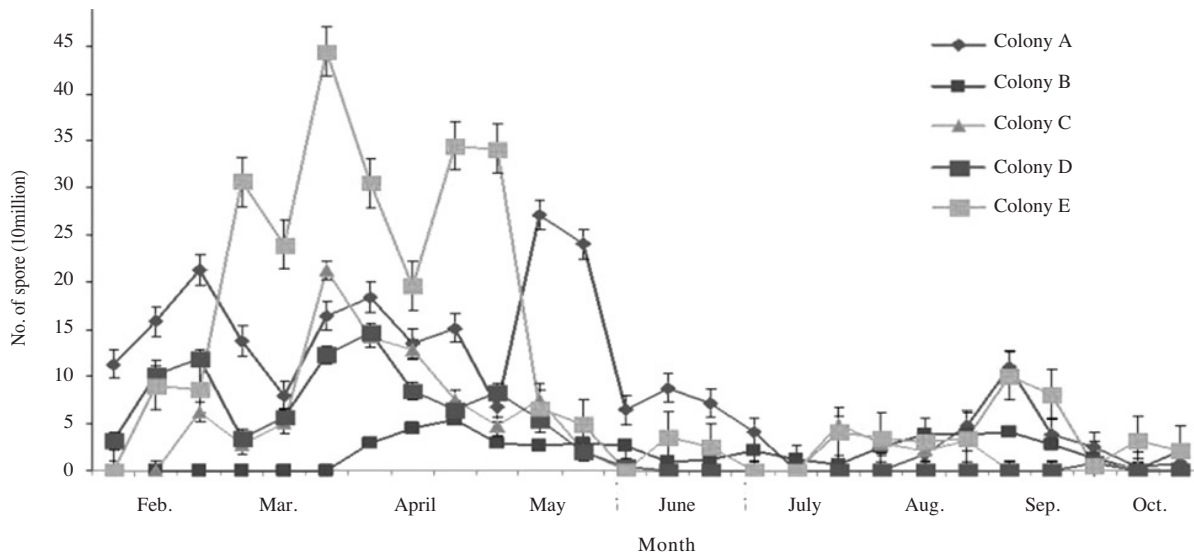


Fig. 1. Number of *Nosema* spores in *Apis mellifera* colonies per monthly.

Haemocytometer 계수

Nosema 포자수를 확인하기 위하여 봉군별로 채집된 일벌시료의 중장만 해부하여 각각 10마리씩 유발에 멸균수 10ml과 섞어서 곱게 갈고, 약 5분간 정치한 후 상층액의 1 μ l를 haemocytometer (Superior, German)에 놓고 위상차 현미경으로 400X 배율에서 포자수를 측정하였다.

Genomic DNA 분리

Nosema 포자를 관찰하기 위하여 사용되고 남은 시료를 14,000rpm으로 5분간 원심분리하여 침전물을 PCR (Polymerase Chain Reaction) template로 사용할 Genomic DNA 분리하는데 사용하였으며, Genomic DNA 분리를 위하여 Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega, USA)를 사용하여 분리하였다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

*Nosema*는 현미경상으로 포자의 크기를 관찰하여 크기가 크면 *N. apis*, 작으면 *N. ceranae*로 구별할 수 있으나 일반적인 광학현미경으로는 구분하기가 거의 불가능하거나 매우 어렵다. 따라서 정확한 감염 양상을 확인하기 위하여 16s rDNA primer를 제작하여 각각의 *Nosema*를 특이적으로 진단할 수 있도록 하였으

며, 16s rDNA primer는 *Nosema* spp.-F; 5' -GGC AGT TAT GGG AAG TAA CA-3', *Nosema* spp.-R; 5' -GGT CGT CAC ATT TCA TCT CT-3', *Nosema-ceranae*-F; 5' -CGG ATA AAA GAG TCC GTT ACC-3', *Nosema-ceranae*-R; 5' -TGA GCA GGG TTC TAG GGA T-3', *Nosema-apis*-F; 5' -CCA TTG CCG GAT AAG AGA GT-3', *Nosema-apis*-R; 5' -CCA CCA AAA ACT CCC AAG AG-3' 를 사용하여 각각 208(*Nosema* spp.)-nt, 250(*Nosema ceranae*)-nt, 269(*Nosema apis*)-nt의 *Nosema* 16s rDNA가 증폭되도록 PCR 반응은 PTC-200 (MJ research, USA)을 사용하였으며, PCR 반응을 위한 조성은 10pmol의 primer를 1 μ l씩 사용하여 PCR premix (Bioneer, Korea)를 이용하여 total 20 μ l로 수행하였으며 template로는 정제된 genomic DNA를 각각 원액, 10배, 30배, 50배로 멸균수를 사용하여 희석한 후 1 μ l씩 사용하여 total 20 μ l로 수행하였다. PCR 조건으로는 Pre-denaturation 95 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 52 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 35 cycle을 반응하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 post-polymerization을 1분간 수행한 후 1.2% Agarose gel에 전기영동 후 확인하였다.

Gene Cloning 및 염기서열 분석

Gene specific primer를 사용하여 증폭된 PCR product의 size가 1.2% Agarose gel을 통하여 확인된 후 Wizard[®]

SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, USA)을 이용하여 정제 후 pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA)을 사용하여 TA-cloning을 수행하였으며, 제한효소 처리와 PCR을 통하여 clone을 선별한 후 DNA-sequencing (ABI 3100)을 통하여 최종적인 염기서열을 확인하였다. 확인된 clone은 NC-16s로 명명하였으며, 결정된 염기서열들은 Clustal X program (V. 1.81) 및 NCBI (National Center for Biotechnological Information)에서 제공되는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 GenBank에 기록된 모든 유전자 염기서열과 multiple alignment 등의 방법으로 유전자의 상동성 및 특성을 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에서의 연중 *Nosema* 포자 발생 양상

서양종 꿀벌(*A. mellifera*)을 사육하는 양봉농가에서는 일반적으로 봄철에 *Nosema*병 예방 및 치료를 위한 각종 약제를 처리하고 있다. 본 연구에서 확인된 바와 같이 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에서 *Nosema* 포자의 발생 및 증감은 계절별 특성을 보이고 있는데, 월동기가 지나고 한 달 정도 경과 후에 *Nosema* 포자수가 급격하게 증가하고 있으며, 약 두 달(4월) 정도 경과 후에 *Nosema* 포자수가 최대치에 이른다. 또한 유밀기인 5~7월경까지 급격하게 포자수가 감소하는 경향을 보이다가 무밀기인 8월~9월경 약간의 포자 증가 추세를 확인 할 수 있다(Fig. 1). *Nosema*병은 일반적으로 탈분(화분 배설)을 하는 시기에 벌통근처 및 벌통에 묻은 형태의 탈분을 하는 것과 일벌들이 벌통 근처를 기어 다니는 형태의 병징을 보인다(Afonso C *et al.*, 2012; Holly L Holt *et al.*, 2013). 본 연구의 결과 이러한 증세를 보이는 시기는 일반적으로 *Nosema* 포자가 이미 최대치에 도달했을 때 양봉장에서 확인할 수 있는 병징으로 이 시기에는 약제를 사용하여도 효율적인 *Nosema*병 방제가 어렵다. 따라서 연중 *Nosema*병을 적은 비용과 적은 약제의 사용으로 생산물에 대한 약제 잔류 등의 위험까지 줄일 수 있는 방법으로는 봉군

이 월동 후 약 한 달 이내에 예방 차원의 *Nosema* 약제를 사용하는 것이 좋다는 것을 보여준다. 실제 *Nosema* 포자는 연중 증감을 반복하면서 방제약제를 사용하지 않아도 유밀기에는 포자수가 급격하게 감소하는 것을 확인 할 수 있는데, 이와 같은 현상을 보인다 하더라도 *Nosema*병의 방제는 필수적으로 수행되어야 한다. 봄철 *Nosema*병이 발생한 봉군의 일벌은 외역을 하기 어렵고 봉세가 발달하는 속도가 그렇지 않은 봉군에 비하여 느려서 국내 양봉농가의 주 소득원인 아카시아벌꿀등을 생산하는데 지장을 줄 수 있다.

연중 *Nosema* 포자가 가장 많이 증식하는 시기인 봄철(3~5월) *Nosema* 포자 수 조사 및 감염봉군 조사 결과, 조사 봉군 당 평균 45.8%의 감염율을 보였으며, 포자수는 서양종 꿀벌(*A. mellifera*) 일벌 한 마리 당 60~95만개의 포자가 관찰되었으며, 평균 73만개의 포자를 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한, 동양종 꿀벌(*A. cerana*) 일벌에서는 평균 62%의 감염봉군 비율을 보이며, 개체 당 60만~350만개의 포자가 관찰되었으며, 평균 240만개의 포자가 관찰되어 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에 비하여 약 3배 이상의 포자수를 확인할 수 있었다(Table 1, Fig. 2, Fig. 3). 이러한 결과에 따라서 국내 사육 중인 꿀벌 종인 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)과 동양종 꿀벌(*A. cerana*)의 *Nosema*병 발생을 비교하여 보면, 동양종 꿀벌(*A. cerana*)의 *Nosema*병의 감염정도가 매우 심각함을 알 수 있다. 2009년 이후 국내 동양종 꿀벌(*A. cerana*)는 sacbrood virus에 의한 낭충봉아부패병 발생으로 약 90% 정도의 봉군이 폐사하는 상황이 발생하고 그 영향이 최근까지 지속적으로 반복되고 있다. 그러한 관점에서 볼 때 동양종 꿀벌(*A. cerana*)의 봉군 폐사를 촉진하고 낭충봉아부패병을 더욱 확산시키는 역할을 하는 것으로 *Nosema*도 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 금후 동양종 꿀벌(*A. cerana*)에 대한 *Nosema*병 방제는 낭충봉아부패병 예방 및 관리 기술과 함께 중요한 방제 대상 질병일 것으로 보이며, *Nosema* 포자수의 감소를 통한 낭충봉아부패병 발생도 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

일반적으로 *Nosema*병을 진단하기 위해서는 일벌의 증장을 분리하여 유발에 멸균수와 함께 마쇄 후 haemocytometer를 이용하여 포자 수 측정을 하면서 진

Table 1. Comparison of *Nosema* spores in *Apis mellifera* colonies during spring season (March~May)

	Number of colonies	Number of bees	Number of infected bees	Mean spores/bee	Infection rate of colony	Infection rate of apiary
<i>A. mellifera</i>						
March	8	80	3	607,800	4.0	37.5
April	16	160	9	953,829	5.6	50.0
May	6	60	3	642,133	5.0	50.0
Total/Mean	30	300	15	734,587	4.9	45.8
<i>A. cerana</i>						
March	9	90	28	3,598,500	31.1	44.4
April	10	100	12	633,760	12.0	50.0
May	16	140	43	3,071,429	31.0	92.9
Total/Mean	35	330	83	2,434,563	24.7	62.4

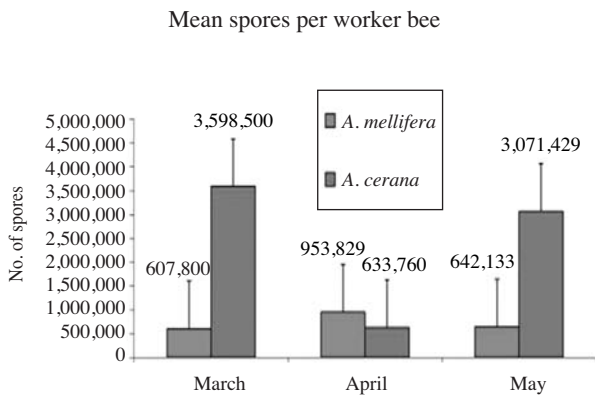


Fig. 2. Comparing of *Nosema* spores in colony seasonally (Spring) between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Mean spores per worker bee during spring season (March to May). Number of *Nosema* spores was counted by haemocytometer totally 30 worker bee per colony.

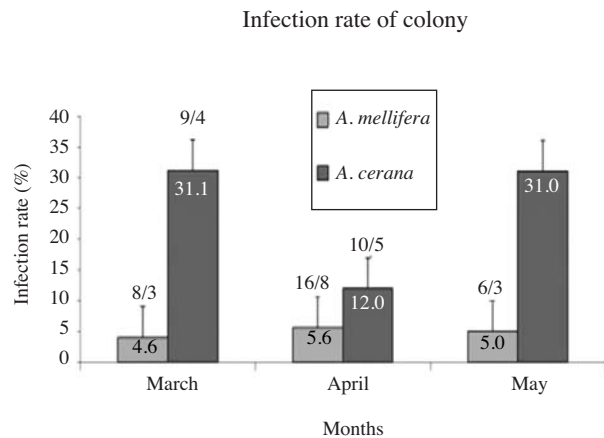


Fig. 3. Comparing of infection rate of *Nosema* in colony seasonally (Spring) between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Number of *Nosema* spores was counted by haemocytometer totally 30 worker bee per colony.

단을 하게 되는데, 이는 *N. apis*와 *N. cerana*를 구분해서 진단하는 것이 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서는 *N. apis*와 *N. cerana*를 특이적으로 진단할 수 있는 primer를 제작하여 PCR을 통한 *Nosema* 진단법을 개발하였다. Gene specific primer를 이용한 PCR에서 *N. apis*와 *N. cerana* 두 종을 동시에 진단할 수 있는 primer와 *N. apis*와 *N. cerana*를 각각 특이적으로 진단할 수 있는 primer로 PCR한 결과 본 연구에 사용된 시료에서 *N. apis*는 진단되지 않았으며, 전체 시료에서 *N. cerana*만 진단되었다(Fig. 4A). PCR 산물의 염기서열 분석결과 primer 부분을 제외하고 210bp의 염기서열(Fig. 4B)을 NCBI BLAST 결과 *N. cerana* 16s rDNA의

염기서열과 100% 일치함을 확인하였다. 따라서 국내에는 *N. apis*에 비하여 *N. cerana*에 의한 *Nosema*병 발생이 대부분이며, *N. cerana*의 약제 저항성 및 질병발생 위험성 등에 대한 보고를 바탕으로 볼 때 국내 *Nosema*병 발생에 따른 봉군감소 등의 피해가 예상된다.

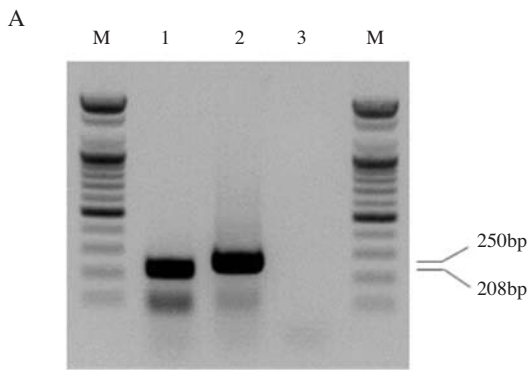
적 요

최근 꿀벌의 봉군감소로 인한 꿀벌봉군붕괴현상인 Colony Collapse Disorder (CCD)를 야기하는 여러 가지 원인 중 하나로 *Nosema*병이 많은 관심을 보이고 있는

Table 2. Gene specific primer set for detection of 16s rDNA in *Nosema* spp.

	Primer	Sequence	Products (bp)
A	<i>Nosema</i> F	5'-GGC AGT TAT GGG AAG TAA CA-3'	208
	<i>Nosema</i> R	5'-GGT CGT CAC ATT TCA TCT CT-3'	
B	<i>N. ceranae</i> F	5'-CGG ATA AAA GAG TCC GTT ACC-3'	250
	<i>N. ceranae</i> R	5'-TGA GCA GGG TTC TAG GGA T-3'	
C	<i>N. Apis</i> F	5'-CCA TTG CCG GAT AAG AGA GT-3'	269
	<i>N. Apis</i> R	5'-CCA CCA AAA ACT CCC AAG AG-3'	

A; Detection primer set for *Nosema* spp., B; Detection gene specific primer set for *N. ceranae*, C; Detection gene specific primer set for *N. apis*.



B
 CTCGGGGAATCTTAAGTCTTTCTTCCAAGAAAGTAGGGCAA
 GCTATGCTCTTGGGATGTGAGATCCAGTGCCGGTTGGGAGAA
 GCCGTTACCCTTCGGGGAATCTTCAAAAAACACACAACCTGG
 GGAGGGTTTGGCAAGCTGCTGACGCCGTAGCATTGCGTTGG
 ATCAGGTCAGATCCTTAAACTGACGATTGAGTCAGGCGTGT

Fig. 4. PCR and DNA sequence analysis of *Nosema* spp. (A) PCR amplification of representative bee samples collected from 2013 to 2014 in the RDA. For x-axis, No. 1 indicates that DNA was amplified with generic primers, *Nosema* F/R; No. 2 indicates DNA was amplified with specific primers, *Nosema ceranae* F/R; and No. 3 indicates DNA was amplified with specific primers, *N. apis* F/R, respectively. The primer pairs, *Nosema* F/R, *N. apis* F/R, and *N. ceranae* F/R generated PCR fragments of 208, 250, and 269 bp, respectively. (B) Sequence of *N. ceranae*. DNA that was extracted from bees collected from apiary in RDA.

데, 꿀벌에 *Nosema*병을 유발하는 원인체로는 *Nosema apis*와 *Nosema ceranae* 두 종이 있다. 특히 *Nosema ceranae*는 동양종 꿀벌(*Apis cerana*)에서 최초 보고된 이후 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에 확산되어 상호간 교차 감염이 일어나고 있는 추세인데, *Nosema ceranae*는 *Nosema apis*에 비하여 약제에 의한 방제효율도 낮으며, 이로 인한 봉군감소를 일으키고 있으며, 추후 더 많은 봉군감소에 영향을 미칠 가능성이 매우 높다.

따라서 본 연구에서는 국내 연중 *Nosema*의 발생 양상을 연구한 결과 봄철(3~5월)에 *Nosema* 포자가 가장 많이 증식하는 것을 확인하였으며, 농진청 실험양봉장에서 시험결과 전체 시험봉군에서 *Nosema ceranae*만이 검출되었다. 또한, 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에 비하여 동양종 꿀벌(*A. cerana*)에서 더 많은 *Nosema* 포자수가 관찰되었다. 최근 낭충봉아부패병 바이러스로 인한 봉군의 폐사가 지속적으로 반복되고 있는 동양종 꿀벌(*A. cerana*)에 *Nosema*병이 만연하고 있어서 낭충봉아부패병 바이러스의 발현에도 영향을 주어 더 빠른 속도로 동양종 꿀벌(*A. cerana*)의 감소가 발생하고 있음을 알 수 있다. 따라서 본연구의 결과를 바탕으로 양봉농가에서는 *Nosema*병의 조기방제를 통한 봉군감소 등의 피해를 줄이고 *Nosema*방제 약제의 부적절한 시기 및 과량사용으로 인한 양봉산물의 오염을 예방하는데 기초자료로 사용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 기관고유과제(No.PJ008601)의 연구비지원을 받아 도출된 성과입니다.

인용문헌

Amao, M.B., Cano, A and Acosta, M. 2001. The hydrophilic Afonso, C., Paixao VB, Costa RM. 2012. Chronic toxoplasma infection modifies the structure and the risk of host behavior. PLoS One 2012. 7(3): e32489.
 Brenna, E. Traver, Richard D. Fell. 2011. Prevalence and

- infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. J. Invertebr. Pathol. 107: 43-49.
- Brenna, E. Traver, Matthew R. Williams, Richard D. Fell. 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. Journal of Invertebrate Pathology 109: 187-193.
- Diana, L. Cox-Foster, Sean Conlan, Edward C. Holmes, Gustavo Palacios, Jay D. Evans, Nancy A. Moran, Phenix-Lan Quan, Thomas Briese, Mady Hornig, David M. Geiser, Vince Martinson, Dennis vanEngelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis, W. Ian Lipkin. 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. Science. 318: 283-287.
- Faith, H. Gray, Ann Cali, and John D. Briggs. 1969. Intracellular Stages in the Life Cycle of the Microsporidian *Nosema apis*. J. Invertebr. Pathol. 14: 391-394.
- Fries, I., 1997. Protozoa. In: Morse, R.A., Flottum, K. (Eds.), Honey Bee Pests, Predators and Diseases. A.I. Root Company, Medina.
- Higes, M., Martin R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92: 93-95.
- Higes, M., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honey bees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invertebr. Pathol. 94: 211-217.
- Holly, L. Holt, Katherine A. Aronstein and Christina M. Grozinger. 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). BMC Genomics 2013. 14: 799.
- Ingemar, Fries. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology. 103: S73-S79.
- Ivan, Toplak, Ursska Jamnikar Cigleneccki, Katherine Aronstein and Aless Gregorc. 2013. Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.). Viruses. 5: 2282-2297.
- Larsson, R., 1986. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. Prog. Protistol. 1: 325-390.
- Lefkove, B., Govindarajan B., Arbiser JL. 2007. Fumagillin: an anti-infective as a parent molecule for novel angiogenesis inhibitors. Expert Rev Anti Infect Ther. 5: 573-579.
- Lowther, WT, Matthews BW. 2000. Structure and function of the methionine aminopeptidases. Biochim Biophys Acta 1477: 157-167.
- Michael, L. Smith. August 2012. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? PLOS ONE/www.plosone.org. Volume 7, Issue 8.
- Rada, V., Machova M., Huk J., Marounek M., Duskova D. 1997. Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. Apidologie 28: 357-365.
- Webster, TC. 1994. Fumagillin Affects *Nosema*-*Apis* and Honey-Bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 87: 601-604.
- Wei-Fone, Huang, Leellen F. Solter, Peter M. Yau, Brian S. Imai. 2013. *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. PLOS Pathogens /www.plospathogens.org. Volume 7, Issue 8.