

蜜蜂以色列急性麻痹病毒 (IAPV) 研究进展*

李志国 苏松坤**

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

Advances on Israeli acute paralysis virus of honeybee. LI Zhi-Guo, SU Song-Kun** (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract A massive and abrupt decline in honeybees, sufficient to cause a serious pollination crisis, occurred in America and parts of Europe from winter 2006 to spring 2007. The sudden collapse of honeybee colonies is known as colony collapse disorder (CCD) and was initially thought to be caused by Israeli acute paralysis virus (IAPV). Following more research, it is generally accepted that a variety of pathogenic factors may cause CCD. This paper summarizes recent advances in research on IAPV.

Key words honeybee, Israeli acute paralysis virus (IAPV), colony collapse disorder (CCD), pathogenesis

摘要 2006 年冬季至 2007 年春季, 美国发生了大范围的蜜蜂突然消失现象, 类似的情况也发生在欧洲的部分地区, 引发了严重的授粉危机。科学家对此展开了深入细致的研究并推测以色列急性麻痹病毒 (Israeli acute paralysis virus, IAPV) 很可能是蜂群崩溃失调病 (colony collapse disorder, CCD) 的致病因素。随着研究的深入, 对 CCD 的致病因素及其发生机制有了更深入的认识, 并趋向于认为多方面的致病因素可能导致了 CCD 的发生。本文综述了目前国内外对 IAPV 的研究进展。

关键词 蜜蜂, 以色列急性麻痹病毒 (IAPV), 蜂群崩溃失调病 (CCD), 致病机理

2006 年冬季至 2007 年春季, 美国发生了大范围的蜜蜂突然消失现象, 区别于早春蜂群群势减弱的正常现象, 这次蜜蜂损失数量竟占整个蜂群总数的 80% ~ 100%, 同样的现象也发生在欧洲的部分养蜂场。科学家将其定义为蜂群崩溃失调病 (colony collapse disorder, CCD)。表面看起来很健康的蜂群短时间内大量成年工蜂突然消失, 在巢脾上只剩下蜂王、幼虫和一些未成年工蜂以及花粉等残留食物, 且在蜂箱内并无死亡蜜蜂的残存尸体, 也没有寄生害虫的存在^[1]。蜜蜂的大量突然消失, 在美国等西方国家引发了严重的授粉危机^[2,3]。到目前为止, 科学家们对 CCD 的各种可能的致病因素一一做了研究分析, 推测了包括以色列急性麻痹病毒 (Israeli acute paralysis virus, IAPV)、蜂螨、农业杀虫剂、转基因作物、真菌等各种可能的致病因素^[4]。最近, 美国的科学家认为患 CCD 蜂群的蜜蜂被某种能攻击其核糖体的病毒侵染, 导致蜜蜂不能合成对生命有重

要作用的蛋白质^[5]。本文对国际上关于 IAPV 的研究进展做一综述。

1 IAPV 和 CCD 的相关性

IAPV 病毒最早于 2004 年由以色列希伯来大学的 Ilan Sela 等人发现, 被 IAPV 感染的蜜蜂会出现翅膀颤抖, 进而麻痹而死于蜂箱外^[6]。Cox-Foster 等^[7]采用宏基因组的方法, 对出现 CCD 症状的巢脾和正常的巢脾中的微生物群落进行了调查分析, 并对蜂群内各种微生物进行了 RNA 测序, 发现 IAPV 和克什米尔蜜蜂病毒 (Kashmir bee virus, KBV) 与 CCD 的关系最大。通过序列比对分析, IAPV 与 KBV 和急性蜜蜂麻痹病毒 (acute bee paralysis virus,

* 资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. nyctx-43-kxj4)、浙江省自然科学基金、“863”项目 (No. 2007AA10Z332)。

** 通讯作者, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

收稿日期: 2009-10-30, 修回日期: 2010-01-21

ABPV) 有很近的亲缘关系, IAPV 很可能是 KBV 的亚型。结果显示 IAPV 在有 CCD 症状蜂群里存在的概率为 83.3%, 而在无 CCD 症状蜂群里存在的概率仅为 1%, 表现出与 CCD 强烈的相关性, 所以可以推测 CCD 的主要病原为 IAPV。如果从一个蜂群中鉴定出 IAPV, 那么这个蜂群患有 CCD 的机率超过 96%。

Blanchard 等^[8]于 2007 年冬季至 2008 年春季, 对出现过大量蜜蜂失踪和死亡的蜂场的蜜蜂分析发现, 35 个蜂场中有 5 个蜂场的蜜蜂样品发现 IAPV, 这也是首次在法国养蜂场检测到了 IAPV, 不过并不确定 IAPV 和蜜蜂数量大幅度减少之间存在因果关系。

2 IAPV 的分子生物学及遗传结构特征

2.1 IAPV 的分子生物学特征

蜜蜂的多种病毒基因组已被完整测序, 包括 KBV、ABPV、囊状幼虫病病毒 (sacbrood virus, SBV)、蜜蜂残翅病毒 (deformed wing virus, DWV)、黑蜂王台病毒 (black queen cell virus, BQCV) 等^[6]。根据复制酶的特征, 它们都属于小核糖核酸病毒总科 (*Picornaviridae*)^[9], *Picornaviridae* 总科的大部分病毒仅有一个大的开放读码框 (ORF), 其 5' 端编码衣壳蛋白, 3' 端编码复制酶^[10]。其中, KBV、ABPV、BQCV 3 种蜜蜂病毒属于 *Dicistroviridae* 科^[11,12]。虽然 *Dicistroviridae* 科属于 *Picornaviridae* 总科, 但是 *Dicistroviridae* 科病毒成员的遗传结构特征明显不同于 *Picornaviridae* 总科的其它病毒成员^[10]。

属于 *Dicistroviridae* 科的病毒携带有被一基因间区域隔开的两个开放读码框, 开放读码框用于编码两个多聚蛋白且这两个多聚蛋白被一小段间隔物隔开。根据同源性和基因组的结构特征, IAPV 的基因结构类似于 *Dicistroviridae* 科的病毒成员^[10]。IAPV 病毒基因组是由 9 487 个核糖核苷酸 (不包括 polyA 尾) 组成, 它的两个开放读码框被一个由 184 个核苷酸组成的基因间区域分开。靠 5' 端的开放读码框编码翻译与 RNA 复制和蛋白质加工相关的、由 1 900

个氨基酸构成的非结构性多聚蛋白质, 靠 3' 端的开放读码框编码翻译用于加工不同衣壳蛋白的、由 944 个氨基酸组成的结构性多聚蛋白, 与 *Picornaviridae* 总科其它病毒恰好相反。IAPV 的病毒粒子也携带有短的缺陷干扰型 (DI) 核糖核酸, 一部分缺陷干扰型核糖核酸是 IAPV 的 RNA 和其它 *Dicistrovirus* 病毒 RNA 的重组体, 另一部分则是 IAPV 与非病毒 RNAs 的重组体^[6]。此外, IAPV 有两个内核糖体进入位点 (IRES), 一个位于 5' 端非翻译区 (UTR), 另一个位于两个 ORF 之间的基因间区域, 在衣壳蛋白的起始翻译合成时起介导作用^[13]。与 CAP-dependent 翻译起始调控机制相比, IRES 介导的翻译起始机制降低了病毒对寄主的依赖性^[14,15], 此机制被认为是病毒破坏宿主蛋白质翻译合成过程的方式之一^[16]。

2.2 IAPV 非结构性多聚蛋白编码特征

IAPV 翻译合成的非结构性多聚蛋白包含解螺旋酶、蛋白酶、RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 三种结构域单元, 其中解螺旋酶区域携有三个标记性序列: 序列 A 负责核苷酸的结合与水解, 其基序为⁵¹²GESGVGK⁵¹⁸; 序列 B 位于催化核心, 其基序为⁵⁵⁷WDN⁵⁶⁰; 序列 C 的基序为⁵⁶³QNVVYDD⁵⁷⁰^[6]。蛋白酶区域携带有两个标记性序列, 一个为半胱氨酸蛋白酶的经典标记序列¹³⁰¹GDCC¹³⁰⁴, 另一个为假定的底物结合部位序列¹³²⁰GIHVAG¹³²⁵。RdRp 区域中的亚区 1 携带有 8 个保守区域, 依次为:¹⁵⁶⁴TLK-¹⁵⁶⁸¹⁵⁷⁹KTRVFS¹⁵⁶⁴¹⁶¹⁹NVY¹⁶²¹¹⁶⁴³DFST-¹⁶⁴⁹¹⁶⁹⁹THSQPSGNP¹⁶⁷⁷、YGDD (RdRp 的标记性序列)、¹⁷⁸³TDELK¹⁷⁸⁷¹⁸⁰⁵LKR¹⁸⁰⁷和¹⁸²⁰APL-CMDTILEMPNW¹⁸³³^[9]。

2.3 IAPV 结构性多聚蛋白编码特征

在翻译合成结构性多聚蛋白的过程中有可能出现密码子连读的现象, 终止密码子位于开放读码框的 3' 端, 紧随其后的是一蛋氨酸密码子, 共翻译合成 944 个氨基酸。由于蛋白质的起始位点有可能不是蛋氨酸^[17~19], 所以翻译合成的结构性多聚蛋白的 N 端有可能不同, 通过 Edman 降解法可以确定结构性多聚蛋白中存在

5 种不同的 N 端序列结构, 分别是:¹²⁶SVL¹²⁸、³³⁹SQKSTS³⁴⁴、³⁹⁸GWSKP⁴⁰²、⁴²⁷SVP⁴²⁹、⁷⁰¹INIGNK⁷⁰⁶。*Dicistroviridae* 科不同病毒种类的成熟衣壳蛋白各不相同, 在和 IAPV 同源性最近的 ABPV 和 KBV 中存在大约 9.5、24、33 和 35 ku 的四类衣壳蛋白。IAPV 中主要存在四类大约 17、26、33 和 35ku 的衣壳蛋白, 在多聚蛋白的合成过程中, 这四类主要的衣壳蛋白轮流地对多聚蛋白进行加工作用, 同时存在大约 19、30 和 46ku 的次要蛋白^[6]。

3 IAPV 的分类学特征

在 IAPV 发现之前, 已从蜜蜂上分离到包括蜜蜂慢性麻痹病毒 (chronic bee paralysis virus, CBPV)、KBV、ABPV、SBV、DWV、BQCV 等至少 18 种蜜蜂病毒^[20]。Palacios 等^[10]通过系统进化分析法对 IAPV 的遗传结构进行分析, 认为至少存在 3 种不同的 IAPV 谱系, 美国存在其中的 2 种, 最初于以色列发现的 IAPV 则属于第 3 种谱系。国际病毒分类委员会 (ICTV) 对 *Dicistroviridae* 科病毒的正式分类命名仍然没有统一的认识^[21], Palacios 等^[10]也认为 IAPV 很可能是 KBV 的亚型。序列分析表明 IAPV 最有可能和 KBV、ABPV 具有同源性。虽然 IAPV 的结构性多聚蛋白与 KBV、ABPV 的最具有同源性, 但是 IAPV 与 KBV、ABPV、CBPV、DWV 等病毒的抗体并不发生反应。此外, IAPV 与 KBV、ABPV 非编码区 (UTRs) 的同源性不是很明显^[6]。

4 IAPV 的致病机理及预防机制

被 IAPV 侵染后的蜜蜂早期腹部、胸部逐渐变黑, 在蜂箱外的空地上转圈, 既不采食也不能飞行, 随后胸部绒毛脱落, 最后蜜蜂静止不动麻痹抽搐而死^[6]。Maori 等^[22]还发现被 IAPV 感染的 30% 的以色列蜜蜂基因组已将该病毒未经转录的主要用于负责编码多聚蛋白的 RNA 序列部分或全部地整合入自身的基因组中, 并且那些基因组中含有完整病毒序列的蜜蜂对该病毒产生了抗性。此外, 病毒与宿主之

间遗传信息的交换是相互的, 在 DI 型病毒粒子的 RNA 中同样存在宿主的基因片段, 可能是由于宿主和病毒的 RNA 发生重组, 后经逆转录作用, 而引起了宿主和病毒之间的基因整合^[6, 22]。利用这一机制, 为蜜蜂抗病表现型的筛选、抗病品种的选育以及获得 IAPV 抗体提供了可能, 也为更加深入地研究 IAPV 的侵染机制打下基础^[23]。Johnsona 等^[5]使用全基因组微阵列分析法比较了来自健康蜂群与患有 CCD 蜂群蜜蜂中肠的基因表达情况, 结果发现患有 CCD 蜂群蜜蜂的中肠存在有大量的核糖体 RNA (rRNA) 片段, 并认为其可能是 IAPV、DWV 等病毒侵染的结果, 进而阻止了蛋白质的翻译过程。由于蛋白质合成能力的降低, 蜜蜂对外界环境中的各种致病因子的抵抗能力随之减弱, 进而导致了蜂群的消亡。

Maori 等通过合成来源于 IAPV 基因序列的双链 RNA (dsRNA) 饲喂被 IAPV 感染的实验蜂群而使 IAPV 出现基因沉默的现象, 进而降解了 IAPV 的转录产物, 结果实验蜂群并未消亡, 并结合巧妙的实验设计而得出在控制 IAPV 及 CCD 方面, RNA 干扰技术是一个行之有效的方法^[24]。值得一提的是, 他们在瓦螨中也发现了 IAPV 的存在, 瓦螨的基因组中同样存在 IAPV 的基因片段。或许其充当了携带 IAPV 的载体, 瓦螨与 IAPV 的协同侵染, 加速了蜂群的消亡。

5 我国已检测到 IAPV 的存在及对策

美国在从中国进口的蜂王浆中检测到了 IAPV 的存在^[7], Palacios 等通过对 IAPV 保守区域 RdRp 序列的研究指出中国、俄罗斯、澳大利亚等国家存在 IAPV 的可能性很大^[10]。最近, 韩国、中国同样检测到了 IAPV 的存在^[25, 26]。虽然我国已检测到了 IAPV 的存在, 但到目前为止, 国内养蜂生产中尚未发现疑似 CCD 的典型症状。2009 年 7、8 月份, 我们对江苏省 5 个县 的 50 家蜂场及浙江省的部分蜂场进行了一次实地调查。调查结果显示几乎所有的蜂场都存在蜂螨危害, 部分蜂场有季节性爬

蜂病、白垩病,欧洲幼虫腐臭病、美洲幼虫腐臭病等病害已不再是养蜂生产的主要病害。所调查的蜂场近年均没有发生过大量蜜蜂死亡或蜂群群势不明原因大幅下降现象。此外,现阶段养蜂生产中所遇到的蜜蜂在蜂箱外的空地上转圈,蜜蜂胸部、腹部变黑,形体变小,胸部绒毛脱落,最后抽搐麻痹而死的现象虽然和蜜蜂被 IAPV 侵染后的症状相似,但由于 ABPV、KBV、蜂螨等病害侵染蜜蜂后也可能出现类似的状况^[27,28],所以其究竟是 IAPV、蜂螨等病害所致还是其它一些综合性因素所导致,仍有待于进一步的研究分析。当前,我们的主要任务是采取必要的防范措施,同时借鉴国际上先进的检测技术并结合我国养蜂业的实际情况,加紧制定一行之有效的防治方法以服务于我国养蜂业,防患于未然。

参 考 文 献

- Oldroyd B. P. What's killing American honey bees? *PLoS Biol.*, 2007, **5**(6):1 195 ~ 1 199.
- Holden C. Report warns of looming pollination crisis in North America. *Science*, 2006, **314**(5 798):397.
- Stokstad E. Pollinator diversity declining in Europe. *Science*, 2006, **313**(5 785):286.
- Stokstad E. The case of the empty hives. *Science*, 2007, **316**(5 827):970 ~ 972.
- Johnsena R. M., Evans J. D., Robinson G. E., et al. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *PNAS*, 2009, **106**(35):14 790 ~ 14 795.
- Maori E., Lavi S., Mozes-Koch R., et al. Isolation and characterization of IAPV, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel; evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.*, 2007, **88**(12):3 428 ~ 3 438.
- Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E. C., et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 2007, **318**(5 848):283 ~ 287.
- Blanchard P., Schurr F., Celle O., et al. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.*, 2008, **99**(3):348 ~ 350.
- Koonin E. V., Dolja V. V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1993, **28**(5):375 ~ 430.
- Palacios G., Hui J., Quan P. L., et al. Genetic analysis of israel acute paralysis virus; distinct clusters are circulating in the united states. *J. Virol.*, 2008, **82**(13):6 209 ~ 6 217.
- de Miranda J. R., Drebot M., Tyler S., et al. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.*, 2004, **85**(8):2 263 ~ 2 270.
- Lanzi G., de Miranda J. R., Boniotti M. B., et al. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.*, 2006, **80**(10):4 998 ~ 5 009.
- Nakashima N., Uchiumi T. Functional analysis of structural motifs in dicistroviruses. *Virus Res.*, 2009, **139**(2):137 ~ 147.
- Pestova T. V., Lomakin I. B., Hellen C. U. T. Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep.*, 2004, **5**(9):906 ~ 913.
- Pestova T. V., Hellen C. U. T. Translation, interrupted. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006, **13**(2):98 ~ 99.
- Belsham G. J. Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res.*, 2009, **139**(2):183 ~ 192.
- Johnson K. N., Christian P. D. The novel genome organization of the insect picorna-like virus *Drosophila* C virus suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. *J. Gen. Virol.*, 1998, **79**(1):191 ~ 203.
- Domier L. L., McCoppin N. K. *In vivo* activity of *Rhopalosiphum padi* virus internal ribosome entry sites. *J. Gen. Virol.*, 2003, **84**(2):415 ~ 419.
- Nishiyama T., Yamamoto H., Shibuya N., et al. Structural elements in the internal ribosome entry site of *Plautia stali* intestine virus responsible for binding with ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**(9):2 434 ~ 2 442.
- Allen M., Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 1996, **77**(3):141 ~ 162.
- Mayo M. A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.*, 2002, **147**(8):1 655 ~ 1 656.
- Maori E., Tanne E., Sela I. Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology*, 2007, **362**(2):342 ~ 349.
- 苏松坤, 湛毅, 蔡芳, 等. 蜂群崩溃失调病(CCD)研究进展. 中国蜂业, 2007, **58**(11):5 ~ 7.
- Maori E., Paldi N., Shafir S., et al. IAPV, a bee-affecting virus associated with colony collapse disorder can be silenced

by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol.* , 2009 , **18**(1) :55 ~ 60.

25 Choi Y. S. , Lee M. L. , Lee M. Y. Detection of israel acute paralysis virus (IAPV) from the honeybee in Korea. *Korean J. Apicult.* , 2008 , **22**(2) :159 ~ 165.

26 Yan X. , Liu X. J. , Chen J. H. , *et al.* First detection of Israel Acute Paralysis Virus (IAPV) in *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) in China. *Sociobiology* , 2009 , **54** (1) :95 ~ 100.

27 Baker A. C. , Schroeder D. C. The use of RNA-depent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order *Picornavirales*) infecting *Apis mellifera* L. populations. *Viol. J.* , 2008 , **5** :10.

28 Sammataro D. , Gerson U. , Needham G. Parasitic mites of honey bees : life history , implication , and impact. *Annu. Rev. Entomol.* , 2000 , **45** :519 ~ 548.