

蜜蜂麻痹病病毒研究进展

冯峰 陈淑静

(中国农业科学院养蜂研究所, 北京)

尹明标

(中国预防医学科学院病毒研究所, 北京)

The Advances of Researches in Bee Paralysis Virus

Feng Feng Chen Shu-jing

(Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Yin Ming-biao

(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing)

关键词: 慢性麻痹病病毒; 急性麻痹病病毒; 慢性麻痹病相关病毒; 缓慢性麻痹病病毒; 药物防治

Key Word: Chronic paralysis virus; Acute paralysis virus; Slow paralysis virus; Chronic paralysis virus associate; The treatment of medication

早在一百多年前已发现成年蜜蜂的“麻痹”症状, 在蜂群中有一些成年蜜蜂表现异常, 它们的翅与躯体颤抖不能飞翔, 几天以后很快死亡。长久以来, 许多学者认为蜜蜂麻痹病的病原体可能是病毒, 但一直未得到证实。直到1963年, Bailey等才首先分离出两种蜜蜂麻痹病病毒, 并用分离出来的两种病毒注射感染健康蜜蜂, 几天内蜜蜂出现麻痹症状, 失去飞翔能力。其中一种病毒感染的蜜蜂, 出现颤抖症状, 几天后死亡, 作者称这种病毒为慢性蜜蜂麻痹病病毒(CBPV)。另一种病毒感染的蜜蜂出现麻痹症状后1~2天内很快死亡, 称为急性蜜蜂麻痹病病毒(ABPV)^[1]。后来, 在成年蜜蜂的提取液内, 又发现了一种与上述病毒抗血清不起反应的病毒颗粒, 这种病毒注射感染健康蜜蜂后大约12天死亡, 死亡前1~2天, 前两对足出现“麻痹”症状, 这种病毒称为缓慢性麻痹病病毒(SPV), 以区别于慢性与急性麻痹病病毒^[2]。近年来, 还发现了一种病毒颗粒, 在血清学上与慢性麻痹病病毒不发生关系, 单独注射蜜蜂也不能增殖, 除非在接种液中同时含有慢性蜜蜂麻痹病病毒, 这种病毒称为慢性蜜蜂麻痹病相关病毒(CPVA)。慢性麻痹病相关病毒与慢性麻痹病病毒相互之间可能作为卫星病

本文于1987年12月23日收到。

毒或辅助病毒而发生关系^[3-5]。

上述几种病毒是侵染成年蜜蜂的重要病原体,引起成年蜜蜂的麻痹与早期死亡,给养蜂生产造成严重损失。对这类病毒的研究不仅具有较大的经济意义,而且对昆虫病毒学、昆虫病理学、经济昆虫学等方面的研究提供了重要的理论和实践知识。鉴于慢性麻痹病病毒在蜂群中分布广泛,危害性大,研究也较深入,是本文叙述的重点。

一、慢性蜜蜂麻痹病病毒的地理与季节特征

纯化的慢性蜜蜂麻痹病病毒制剂含有许多不等轴的颗粒,多数是椭圆形的。四种大小、长度分别为 30, 40, 55 与 65nm, 宽度大约为 23nm, 它们的沉降系数分别为 82S, 97—106S, 110—124S 与 125—136S。从自然感染的蜜蜂与人工感染的蜜蜂病毒制剂中,测得不同大小的颗粒具有类似的相对比率。但所有大小不同的颗粒在氯化铯密度梯度中,都具有相同的浮力密度(1.33g/ml),在电泳中呈单一成分迁移,说明它们的沉降系数是由长度决定的。

不同地区取样获得的慢性蜜蜂麻痹病病毒的沉降系数可能不同。例如美国分离的慢性蜜蜂麻痹病病毒,其沉降系数较英国的小,纯化的病毒制剂沉降系数仅为 86, 96 与 109S,长形颗粒也较英国分离的病毒制剂中少得多。我国分离的慢性蜜蜂麻痹病病毒制剂所含的长颗粒也较英国的少^[6]。尽管病毒颗粒大小的比率存在地理差异,但用同源与异源抗血清检测,都表明它们在血清学上是相同的。

对蜜蜂麻痹病病毒的季节特征也进行了研究。有的学者认为,蜜蜂麻痹病没有明显的季节差异,只不过在不同季节的蜂群,包括自然界与人工饲养的蜂群,蜜蜂拥挤密集状态不一样,在秋季,异常的拥挤增加了病毒通过表皮微孔传播的可能性,而出现不规则感染和爆发麻痹病。但也有学者发现,某些地区不同季节收集的麻痹病蜂,在所制备的病毒制剂中长形颗粒的比例不同,秋天蜜蜂麻痹病病毒制剂中长形颗粒较春天的多^[7]。这种差异可能具有重要意义,因为最大感染力与最长颗粒有关^[8]。长颗粒可能具有完整的遗传信息,感染力强,而短颗粒的遗传信息可能有缺损。

二、慢性蜜蜂麻痹病病毒在蜂体组织内的分布与感染途径

蜜蜂的许多组织易被病毒感染,包括脑髓与神经节内,例如从一只蜜蜂中分离出 10^8 — 10^{11} 个病毒颗粒,大约有一半集中在头部。表面看来健康的蜜蜂,在它们的胸腺与咽腺中也发现病毒颗粒。蜜囊内集中了大量病毒颗粒,这可能是在食道腺体内繁殖的病毒分泌到蜜囊内,当然也有可能是采蜜时粘到花粉上的病毒颗粒^[9]。

慢性麻痹病病毒通过蜜蜂口器感染要求 10^{10} 病毒颗粒,才能引起麻痹,但注射血淋巴只需要 100 个或更少的病毒颗粒即可引起疾病。混入水中的喷洒剂量大约需 10^9 — 10^{10} 病毒颗粒,喷洒的病毒可能是通过气管感染的。在自然界,感染剂量仅要求几个病

毒颗粒,有可能是病毒颗粒通过毛脱落后留下的表皮微孔,直接作用于上皮组织细胞浆。当蜜蜂紧密拥挤在一堆时,有可能侵入伤口,增加病毒颗粒的感染率。不论经何种途径感染,蜜蜂受感染后在 30℃ 与 35℃ 条件下饲养,一般经 5~7 天后出现颤抖,不能飞翔,再过一天左右死亡。温度愈低,受感染病毒的蜜蜂死亡愈慢,然而蜜蜂感染后病毒在 30℃ 下繁殖多于 35℃^[10]。

表面看来健康的蜂群中,在其成年蜜蜂的若干组织内发现病毒,这种隐性感染广泛存在于自然界。另外,轻微感染的蜂群,有时会自发地痊愈。麻痹病的敏感性似乎主要取决于遗传因子^[11]。对麻痹病的敏感性表现为母性遗传特征的德国蜂,尽管含有较多的慢性麻痹病病毒,但一般表现为健康状态,除非放在未经开垦的“森林”区域,这说明除了遗传因子外,环境因素对于慢性蜜蜂麻痹病病毒的活化也是重要的。

三、慢性蜜蜂麻痹病病毒蛋白质 与核酸组分及其结构

慢性蜜蜂麻痹病的核酸对核糖核酸酶敏感,证明病毒基因组是单股 RNA 链。在弱酸或弱碱溶液(1N)中保温时,病毒颗粒形成圆形蛋白质空壳。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析病毒核酸,证明慢性麻痹病病毒含有五条单股 RNA 组分,其中 2 条 RNA 链较大,分子量分别为 1.35×10^6 与 0.9×10^6 道尔顿,另有 3 条较小的 RNA 链,分子量大约为 0.35×10^6 道尔顿。

Bailey 早期提出,不同大小的慢性麻痹病病毒颗粒核酸含量不同,最短的颗粒含有最小的 RNA,长形颗粒含有较大的 RNA^[12]。含有最短颗粒的制剂较含有最长颗粒的制剂感染性低。利用蔗糖密度超离心将不同大小的病毒颗粒分开,分离慢性麻痹病病毒的 RNAs,希望阐明不同大小的 RNAs 是由不同大小的颗粒分别壳体化的。然而尽管将不同大小的病毒颗粒很好地分开,但并没有将 5 种 RNA 分离开来。不同大小的病毒颗粒制剂经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,均含有相似比率的 5 种 RNA。上述结果提示,凝胶电泳显示的 5 条带是反映大小不同的病毒颗粒内核酸之间的差异,慢性蜜蜂麻痹病病毒 RNA 是否以 5 个节段形式存在于病毒颗粒内,值得进一步探讨。

不同浓度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定慢性蜜蜂麻痹病病毒蛋白质,结果证明仅含有一种病毒蛋白质,分子量大约为 23,500 道尔顿。这表明病毒核衣壳是由若干分子量相同的蛋白质亚单位组成的。

四、慢性麻痹病病毒与慢性麻痹病相关病毒

经常在慢性蜜蜂麻痹病病毒感染的蜂群中,伴随一种慢性蜜蜂麻痹病相关病毒。它是一种 17nm 直径的对称颗粒,颗粒大小相同。具有典型的核蛋白吸收光谱,沉降系数为 41S,在氯化铯中的浮力密度为 1.38g/ml,也是单股 RNA。但在血清学上与慢性麻痹病病毒无关。慢性麻痹病相关病毒与若干动物和植物中存在的卫星病毒类似,必须依

赖其它病毒的遗传信息才能复制。注射含有慢性麻痹病病毒但测不出慢性麻痹病相关病毒的制剂, 在感染的蜜蜂内, 有时复制出慢性麻痹病相关病毒。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析慢性麻痹病相关病毒核酸, 证明它具有 3 个单股 RNA 组分, 这 3 个组分 (RNA A, RNA B 与 RNA C) 与慢性麻痹病病毒的 3 个小 RNA 组分 (RNA3a, RNA3b 与 RNA3c) 非常类似, 也有可能就是一样的。这 3 个 RNA 有可能被装配成血清学不相关的、形态上不不同的两种颗粒。比较慢性麻痹病病毒内的 RNA3a 3b 与 3c 的比率与慢性麻痹病相关病毒颗粒内的 RNA A、B 与 C 数量之间的关系, 符合上述结论。在某些情况下, 慢性麻痹病相关病毒 RNA A、B 与 C 高度有效地装配在慢性麻痹病病毒颗粒内, 这解释了纯化慢性麻痹病病毒制剂注射蜜蜂产生慢性麻痹病相关病毒的原因^[13,14]。

与其它辅助病毒类似, 慢性麻痹病病毒与慢性麻痹病相关病毒在复制过程中, 相互之间竞争病毒蛋白质^[15]。因此当慢性麻痹病相关病毒加到慢性麻痹病病毒接种液时, 前者干扰后者的复制。在接种慢性麻痹病病毒制剂的蜜蜂中, 产生慢性麻痹病相关病毒的数量与复制慢性麻痹病病毒的数量、颗粒长度及最大沉降系数呈反比关系。慢性麻痹病病毒与慢性麻痹病相关病毒的 RNAs 复制也呈反比关系。

慢性麻痹病病毒与慢性麻痹病相关病毒在血清学上无关, 以及慢性麻痹病相关病毒在慢性麻痹病病毒存在的情况下可以复制, 这些现象提示, 慢性麻痹病相关病毒的核衣壳多肽是由它的一个 RNA 组分编码的, 然而慢性麻痹病相关病毒的 RNA 也可被慢性麻痹病病毒的核衣壳多肽装配。一种病毒的 RNA 被另一种病毒的核衣壳蛋白质包住, 在相关病毒之间经常有效地发生, 而在非相关病毒之间低效或甚至完全不可能发生^[16,17]。慢性麻痹病相关病毒的 RNA 有效地被慢性麻痹病病毒核衣壳蛋白质装配, 可能是由于两者 RNA 存在共同的序列, 也有可能含有慢性麻痹病病毒核衣壳装配的启动子。

五、急性蜜蜂麻痹病病毒及其传播

这种病毒是在研究慢性蜜蜂麻痹病病毒时发现的。表面看来健康的蜜蜂提取液注射健康蜜蜂后, 某些蜜蜂引起急性麻痹病。我们也从慢性麻痹病的蜂群中取出 50 只表面健康的蜜蜂进行纯化, 发现了急性麻痹病病毒^[18]。电镜鉴定为 30nm 等轴颗粒, 260nm/280nm 比值为 1.22, 纯化病毒液感染健康蜜蜂, 第 2 天即出现死亡, 第 3 天全部死亡。

急性麻痹病病毒与慢性麻痹病病毒的区别在于: (1) 形态不一样, 急性麻痹病病毒是等轴的, 而慢性麻痹病病毒是不对称的; (2) 在自然感染的麻痹病蜂群中, 慢性麻痹病病毒比急性麻痹病病毒颗粒多得多; (3) 注射上述两种病毒后的蜜蜂寿命相差很大, 注射慢性麻痹病病毒出现症状后还可存活若干天, 而急性麻痹病出现症状后大约 1 天就死亡; (4) 急性麻痹病病毒复制较慢性麻痹病病毒快, 很快达到较高浓度; (5) 两者无血清学关系。

与慢性麻痹病病毒相似, 急性麻痹病病毒摄入量少于致死值时, 喂后不久, 积聚在成年蜜蜂的各种组织内。随后病毒数量逐渐减少, 不引起明显的症状。只有当病毒进入血淋巴内, 才会引起全身受毒而致死。急性麻痹病病毒在蜜蜂幼虫中不繁殖, 与囊状幼

虫病病毒不同。

急性麻痹病病毒通常引起隐性感染,一般发生在表面健康的蜜蜂,未发现在自然界传播而引起蜜蜂麻痹与死亡。然而来源于莫斯科的急性麻痹病病毒可引起野外蜜蜂死亡^[19],它是通过大蜂螨(*Varroa jacobsoni*)传播的。来自南美伯利兹的急性麻痹病病毒也可在自然界引起蜜蜂致病与死亡^[20]。急性麻痹病病毒除了注射外,不那么容易感染,可能就是由于它的感染要求媒介的缘故。大蜂螨可将病毒刺入成年蜜蜂的血淋巴,而在那里复制,导致疾病的发生与死亡。

六、缓慢麻痹病病毒

用 Triton X-100 纯化麻痹病病毒,它使慢性蜜蜂麻痹病病毒裂解,但另一些病毒不受影响。电镜鉴别为对称性颗粒,直径大约为 30nm,含有 RAN,沉降系数大约为 176S,浮力密度为 1.35g/ml,与前述三种麻痹病病毒无血清学关系。病毒注射成年蜜蜂后 12 天左右死亡。在死亡前 1~2 天,前二对足出现典型的麻痹症状。目前我国尚未分离出这种病毒。

七、蜜蜂麻痹病的防治措施

蜜蜂麻痹病病毒,特别是慢性麻痹病病毒对成年蜜蜂危害很大,影响繁殖与蜂产品产量,因此设计合理的防治措施极为重要。作为卫星病毒或辅助病毒的慢性麻痹病相关病毒,可以干扰慢性麻痹病病毒在蜜蜂中的复制,尤其是抑制最具有感染性的长形颗粒的数量,可能反映了机体对麻痹病的防御机制。这一现象在防治蜜蜂麻痹病时可以提供设计的思路。另外在自然界中,急性麻痹病可能通过中间媒介,例如大蜂螨等传播。而防治大蜂螨是蜂病防治中的重要环节,因此阻断中间媒介,有助于防止病毒传播。上述研究提示,阐明蜜蜂麻痹病病毒的传播机制,有助于寻找阻断病毒的途径。

蜜蜂麻痹病的药物防治受到了广泛的重视。Poltev 等用每毫升生理盐水内含有 5 毫克的核糖核酸酶处理蜜蜂,明显抑制蜜蜂麻痹病病毒的复制^[21]。我国在蜜蜂麻痹病的药物防治方面也取得了较好的结果。李俊泽利用“801”防治慢性麻痹病,有效率平均达 76%^[22]。冯峰等用我国研制的抗蜂病毒一号防治慢性麻痹病,平均效果达 90% 以上^[23]。

不同蜜蜂麻痹病病毒不仅在血清学上各不相同,而且在症状表现上也有所差异,即使一种病毒对不同的蜜蜂个体,甚至对来自一个蜂群的不同蜜蜂也可能产生不同的症状,这很可能与遗传因素有关。另外,不同蜜蜂麻痹病病毒感染蜜蜂后对温度的敏感性也不同,急性麻痹病病毒感染蜜蜂后,放置在 35℃ 条件下,这一温度是健康个体的最适温度,可使受感染的蜜蜂得到保护,但不能抑制病毒的繁殖。相反慢性麻痹病病毒在较高温度下蜜蜂致死最快,在较低温度下繁殖迅速。除此以外,不同蜜蜂麻痹病病毒对蜜蜂致病的严重性与它们在宿主中的繁殖密度也不成比例。上述一系列差别提示,抑制病

毒繁殖以及避免宿主受到致命攻击的防御机制可能是不同的。但到目前为止,对这一机制的认识还是非常肤浅的。分子生物学的研究有助于阐明这一机制的本质,病毒基因组结构及其基因表达的研究,可以最终从分子水平上阐明蜜蜂麻痹病的致病与复制机理,从而为蜜蜂麻痹病防治战略的设计提供理论根据。

参 考 文 献

- [1] Bailey, L. et al., 1963, *Virology*, 21: 190.
- [2] Bailey, L. and R.D. Woods., 1974, *J. Gen. Virol.* 25: 175.
- [3] Bailey, L., 1976, *Advances in Virus Res.* 20: 27..
- [4] Bailey, L. et al., 1980, *J. Gen. Virol.* 46: 149.
- [5] Mossop, D.W. and R.I.B. Francki., 1978, *Virology*, 66: 562.
- [6] 冯峰等, 1986, *病毒学学报*, 2: 175.
- [7] Reinganum, C., 1968, *J. Invertebr. Pathol.* 12: 471.
- [8] Bailey, L., 1968, *Annu. Rev. Entomol.* 13: 191.
- [9] Bailey, L. et al., 1976, *J. Gen. Virol.* 31: 459.
- [10] Bailey, L. and R.G. Milne., 1969, *J. Gen. Virol.* 4: 9.
- [11] Bailey, L., 1971, *Sci. Prog. Oxf.* 59: 309.
- [12] Bailey, L., 1968, *J. Gen. Virol.* 2: 251.
- [13] Overton, H.A. et al., 1982, *J. Gen. Virol.* 63: 171.
- [14] Bull, B.V. et al., 1985, *J. Gen. Virol.* 66: 1423.
- [15] Kaper, J.M. and E. Tousignant., 1977, *Virology*, 30: 186.
- [16] Peterson, F.F. and M.K. Brakko., 1973, *Virology*, 51: 174.
- [17] Dodds, A.J. and W.I. Hamilton., 1976, *Advances in Virus Res.* 20: 53.
- [18] 冯峰等, 1984, *中国养蜂*, 4: 25.
- [19] Batuev, Y.M., 1979, *Pchelovodstvo*, 7: 10.
- [20] Bailey, L. et al., 1979, *J. Gen. Virol.* 43: 641.
- [21] Poltev, V.I. et al., 1971, *Second Symposium on Bee Pathology*, pp.466-468.
- [22] 李俊译, 1985, *中国养蜂* 4: 3.
- [23] 冯峰等, 1984, *中国养蜂* 5: 24.