

# 基于昆虫共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒 和蚊媒病控制研究进展

潘晓玲<sup>1</sup>, 刘起勇<sup>2,3</sup>, 奚志勇<sup>1,4</sup>

1 美国密歇根州立大学微生物学和分子遗传学系, 密歇根 东兰辛 48824; 2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所  
媒介生物控制室, 传染病预防控制国家重点实验室; 3 世界卫生组织媒介生物监测与管理合作中心;

4 中山大学-密歇根州立大学热带病虫媒控制联合研究中心

**摘要:** 沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 是一种在自然界节肢动物体内广泛存在、能经卵传递的革兰阴性胞内共生菌。估计约 65% 的昆虫种类和 28% 的蚊虫种类天然携带沃尔巴克氏体。当携带沃尔巴克氏体的雄蚊与不携带或者携带不同沃尔巴克氏体型的雌蚊交配, 雌蚊产的卵将不会孵化, 该性状称为胞质不相容性 (cytoplasmic incompatibility, CI)。胞质不相容性赋予携带沃尔巴克氏体的雌蚊生殖优势, 从而使其可以扩散到蚊群中去; 同时沃尔巴克氏体在蚊媒体内能对多种人类病原体 (如登革热病毒、黄病毒和疟原虫等) 产生抗性。基于以上特性可建立 2 种虫媒病控制的新策略: ① 将野生的传病蚊媒改变成对人类病原体具有抗性的蚊虫, 从而阻断蚊媒病的传播 (种群替换); ② 持续诱导引起胞质不相容性的交配, 从而压制或区域性根除传病蚊媒 (种群压制)。

**关键词:** 沃尔巴克氏体; 胞质不相容性; 种群压制; 种群替换

中图分类号: R386; R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)01-0001-07

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.01.001

## Advance in developing *Wolbachia* as a mean to control mosquito and mosquito-borne diseases

PAN Xiao-ling<sup>1</sup>, LIU Qi-yong<sup>2,3</sup>, XI Zhi-yong<sup>1,4</sup>

1 Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, Michigan, 48824, USA;

2 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 WHO Collaborating Center for Vector Surveillance and Management; 4 Sun Yat-sen University-Michigan State University Joint Center of Vector Control for Tropical Diseases

Supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 311030), Guangdong Innovative Research Team Program (No. 2011S009), Scientific and Technological Leading Talents of Guangzhou Development District (No. 2013L-P116), a grant from the Foundation for the NIH through the Grand Challenges in Global Health Initiative of the Bill and Melinda Gates Foundation, a grant (No. R01 AI-080597) from the National Institutes of Health/National Institute for Allergy and Infectious Disease

**Abstract:** *Wolbachia* spp. are maternally transmitted Gram-negative endosymbiotic bacteria. With infection occurring in a wide range of invertebrates, *Wolbachia* is estimated to infect 65% of insect species and 28% of mosquito species in nature. An early embryo death, a phenotype referred to as cytoplasmic incompatibility (CI), will occur when infected males mate with uninfected females, or females that carry different type of *Wolbachia*. CI provides reproductive advantage to infected females, resulting in spread of *Wolbachia* into mosquito population. Furthermore, *Wolbachia* can confer mosquito resistant to a variety of human pathogens, including dengue virus, yellow fever virus and malaria parasites. This has led to large efforts to develop *Wolbachia*-based vector control strategies. One is referred to as population replacement, in which a disease susceptible wild type vector population is modified into a disease resistant population, resulting in blocking of disease transmission. Another is population suppression, in which CI mating is induced in the target population, resulting in suppression, or even eradication of a vector population.

**Key words:** *Wolbachia*; Cytoplasmic incompatibility; Population suppression; Population replacement

**基金项目:** 教育部科学技术研究重点 (重大) 项目 (311030); 广东省引进创新科研团队计划 (2011S009); 广州开发区科技领军人才项目 (2013L-P116); 美国国立卫生研究院和盖茨全球健康大挑战联合基金; 美国国立卫生研究院/国家过敏症与传染病研究所基金 (R01 AI-080597)

**作者简介:** 潘晓玲, 女, 博士, 从事感染沃尔巴克氏体的蚊虫宿主的抗病毒分子机制研究。Email: xpan@msu.edu

由病媒蚊虫传播的流行性乙型脑炎、疟疾、登革热、丝虫病、黄热病等是新发和重现传染病的重要组成部分,危害着人类健康,成为全球关注的重要公共卫生问题之一。蚊虫作为重要的媒介生物,是蚊媒传染病控制的重点。多年来,针对其防控以化学杀虫剂为主。随着生物防治蚊虫技术的发展,基于昆虫共生菌沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)的蚊媒和蚊媒病控制逐渐成为研究及应用热点。现就基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制原理、实验室研究、目前所取得的最新现场实验进展及其应用前景和挑战进行综述。

## 1 蚊虫共生菌沃尔巴克氏体的发现及分布

自然界中,沃尔巴克氏体是广泛存在于节肢动物与线虫体内可由母性遗传(maternal transmission)的一种细胞内革兰阴性菌。该共生菌可通过多种方式影响并调控其寄生宿主的生殖与发育,如杀雄(male killing)、雌性(feminization)、孤雌生殖(parthenogenesis)以及胞质不相容性(cytoplasmic incompatibility, CI)<sup>[1]</sup>。其中,胞质不相容性是最常见的,也是在蚊虫中至今唯一发现的表型。

1924年,沃尔巴克氏体由 Hertig 和 Wolbach<sup>[2]</sup>从尖音库蚊(*Culex pipiens*)的生殖组织中首次被发现,在最初的鉴定实验中,将富含沃尔巴克氏体的蚊卵巢匀浆接种到鸡胚胎、小鼠腹腔、脑腔中,均未检测到增殖和病变,排除其为病原体的可能。1936年沃尔巴克氏体被正式命名为 *Wolbachia pipiensis*<sup>[3]</sup>。分类学上,属于变形菌门(Proteobacteria)变形菌纲 α 亚门(Alphaproteobacteria),立克次体目(Rickettsiales)立克次体科(Rickettsiaceae)沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)。

在其发现初期,沃尔巴克氏体一直被认为是一种稀有而罕见的细菌,然而,随着分子生物学检测技术的发展和广泛应用,研究者们发现沃尔巴克氏体广泛分布于昆虫和蝉、螨、蜘蛛、蝎以及线虫等节肢动物。最近调查数据显示至少 65% 的昆虫种类天然携带沃尔巴克氏体<sup>[4-5]</sup>。其中,28.1% 蚊种(包括 29.6% 伊蚊、42.1% 库蚊和 50.0% 曼蚊)携带沃尔巴克氏体<sup>[6-7]</sup>。由此推测,沃尔巴克氏体可能是昆虫共生菌中分布最广最丰富的一类微生物。

根据立克次体目种系发生进化研究(Phylogenetic analysis)显示,沃尔巴克氏体独立于其他属之外,归在一个单系群,并可细分为 A~H 8 个亚组(supergroups)<sup>[8]</sup>。C 和 D 亚组沃尔巴克氏体只分布于丝虫;而其他 6 个亚组的沃尔巴克氏体在节肢动物中均有分布。昆虫最常见感染的是 A 和 B 亚组沃尔巴克氏体,跳虫(Springtails)仅携带 E 亚组的沃尔巴克氏体, F 亚组的

沃尔巴克氏体可共生于节肢动物和丝虫,而白蚁(Termites)仅发现感染 H 亚组沃尔巴克氏体<sup>[8]</sup>。其中,共生于线虫的沃尔巴克氏体与其宿主不仅呈现系统进化一致性,而且与其宿主有互利(mutualist)共生关系(symbiosis)。而共生于节肢动物的沃尔巴克氏体却与其宿主的系统进化没有显著一致性,通常表现为一种兼性(commensal)的共生关系。

## 2 基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制原理

### 2.1 沃尔巴克氏体引起的胞质不相容性

1950 年 Laven<sup>[9]</sup>发现某些库蚊种内交配是不亲和的,且该不亲和性具有胞质遗传特性(即通过雌性而不是雄性遗传),并命名该现象为胞质不相容性<sup>[10-12]</sup>。直至 1971 年, Yen 和 Barr<sup>[13]</sup>发现该胞质不相容性是由沃尔巴克氏体引起:携带沃尔巴克氏体的雄性库蚊与不携带沃尔巴克氏体的雌性库蚊交配产生的蚊卵不能被正常孵化。这不仅是沃尔巴克氏体研究史中一个重要的发现,亦给研究者们提供了利用沃尔巴克氏体实现蚊虫生物控制的理论基础。

胞质不相容性可分为单向胞质不相容性(unidirectional CI)和双向胞质不相容性(bidirectional CI)。单向胞质不相容性即感染了沃尔巴克氏体的雄性与不感染沃尔巴克氏体的雌性交配产生的子代不能正常发育而发生早期的胚胎死亡。反之,感染沃尔巴克氏体的雄性与感染沃尔巴克氏体的雌性交配产生的子代可正常发育并感染沃尔巴克氏体。由此,沃尔巴克氏体在种群的感染率会随着宿主的繁衍而不断提高。感染沃尔巴克氏体的宿主将逐渐成为该种群中的优势群体。如果父本和母本携带不同型沃尔巴克氏体,则会引起双向胞质不相容,其受精卵于胚胎期死亡。

沃尔巴克氏体引起的单向和双向胞质不相容性在白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)的研究中得到清晰的验证。在自然界中,白纹伊蚊天然携带 *wAlbA* 和 *wAlbB* 两型沃尔巴克氏体。在实验室中,研究人员已经建立了携带单一 *wAlbA* 或 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体的白纹伊蚊(图 1),如携带 *wAlbA* 或 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体的雄蚊与无感染的雌性交配,其子代因单向胞质不相容性而不能存活;如感染 *wAlbA* 型沃尔巴克氏体的雄蚊与感染 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体的雌性交配,其子代则发生双向胞质不相容性而不能存活。研究证实携带 *wAlbA* 和 *wAlbB* 型的双重感染可提高白纹伊蚊的适应力(fitness),包括增强其繁殖力(fecundity),如寿命增长、产卵率及孵化率提高<sup>[14-15]</sup>。

尖音库蚊复合组(*Culex pipiens* complex)是沃尔巴克氏体 *wPip* 型的天然宿主,但对该复合组成员的研究

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
|   | ♂ | ♂ | ♂ | ♂ | ♂ |
| ♀ | ☺ | ✕ | ✕ | ✕ | ✕ |
| ♀ | ☺ | ☺ | ✕ | ✕ | ✕ |
| ♀ | ☺ | ✕ | ☺ | ✕ | ✕ |
| ♀ | ☺ | ☺ | ☺ | ☺ | ✕ |
| ♀ | ☺ | ✕ | ✕ | ✕ | ☺ |

注: ♀. 雌蚊; ♂. 雄蚊; 红色、绿色和黑色分别代表携带不同型别的沃尔巴克氏体(如 *wAlbA*、*wAlbB* 或 *wPip*); 白色代表未携带沃尔巴克氏体。单向 CI. 未携带沃尔巴克氏体的雌蚊(白色)与携带的雄蚊交配, 或者交配的雄蚊携带沃尔巴克氏体型别多于雌蚊, 雌蚊产的卵不孵化。双向 CI. 携带沃尔巴克氏体雌蚊和携带不同型别沃尔巴克氏体的雄蚊交配, 雌蚊所产的卵均不能孵化。✕. 胚胎死亡(或发生胞质不相容); ☺. 胚胎存活。

图1 沃尔巴克氏体引起的胞质不相容性

Figure 1 *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility

发现了至今为止在节肢动物中发现的最为复杂的胞质不相容性。早在 1967 年, Laven<sup>[12]</sup>就描述了尖音库蚊的沃尔巴克氏体含有 17 种不同的细胞型(cytopypes), 杂交实验显示彼此间存在不同的胞质不相容性。近年来的研究进一步确认了尖音库蚊复合组中不同成员所携带的 13 个细胞型<sup>[16]</sup>。需强调的是, 这些不同的细胞型与沃尔巴克氏体目前的分类不能形成相关性, 因为基于目前常用于分类的基因(如 *ftsZ*、*rps6* 等), 其序列不存在多态性(polymorphism), 而这些能引起胞质不相容性的细胞型在分类学上都属于 *wPip* 型, 因此目前的研究致力于发现能够区分这些引起胞质不相容性的不同 *wPip* 细胞型的标记基因。但另一方面, 这些复杂的胞质不相容性模式, 则为研究提供了一个更精细、复杂而完美的研究模型<sup>[17]</sup>。根据种系进化发生分析, *wPip* 型属于沃尔巴克氏体 B 亚组内一个小分支, 相关分子进化研究显示其至少可分为 5 个不同的基因型<sup>[18]</sup>。由此解释其宿主呈现的复杂胞质不相容性, 源于同一型沃尔巴克氏体内多种基因型的差异。分别感染这些不同亚型 *wPip* 沃尔巴克氏体的雄性和雌性交配, 其子代可能有 3 种不同命运: ①子代可正常发育存活; ②子代不能正常发育, 且是双向胞质不相容, 即携带不同 *wPip* 亚型的雌雄交配, 其受精卵不能正常发育; ③子代因单向胞质不相容不能正常发育。

目前关于沃尔巴克氏体引起的胞质不相容性的分子机制尚不明了, 但是有 3 种假说或模型可一定程度上解释自然界中已观察到的、由沃尔巴克氏体引起的胞质不相容性表型: “锁和钥匙”假说(lock-and-key)、 “缺失和再生”假说(titration-restitution)和“减速”假说(slow-motion)<sup>[19]</sup>。“锁和钥匙”假说解释沃尔巴克氏体

在其宿主精子发育过程中予以修饰, 其作用如同在父本染色体上“上锁”, 而存在于宿主卵母细胞的沃尔巴克氏体, 如同具备了解锁的“钥匙”, 虽然沃尔巴克氏体在精子的发育过程中最终被丢弃于一个被称做垃圾袋(waste-bag)的部件而不存在于成熟的精子内, 但被“上锁”的精子只有遇到含有同型沃尔巴克氏体的卵母细胞, 其父本染色体才能被“解锁”而进行正常的有丝分裂。反之, 如遇上不携带沃尔巴克氏体的卵母细胞, 被“上锁”的精子将一直被锁定, 不能进行进一步的发育。“缺失和再生”假说则认为沃尔巴克氏体对其宿主的修饰作用是移取其宿主精子的某些蛋白, 因此, 即使成熟精子不携带该共生菌, 但自身有所“缺失”, 只有与含有同型沃尔巴克氏体的卵母细胞结合, 其缺失的蛋白才会被共存于卵母细胞内的沃尔巴克氏体归还而令其重生。反之, 有“缺失”的精子即使与卵子结合, 受精卵也终因父本染色体不能正常发育而死亡。“减速”假说认为沃尔巴克氏体将其宿主生殖细胞设置成“减速”模式, 在受精过程中, 只有当同样“减速”模式的精子和卵母细胞相遇, 方能彼此一致、同步完成胚胎发育的第一轮有丝分裂。反之, 父本和母本染色体在有丝分裂期不同步, 将出现胚胎的早期死亡或胞质不相容。所有假说中, “锁和钥匙”假说是最精简且与大多数实验观察结果吻合, 但能决定“锁和钥匙”的沃尔巴克氏体基因还有待发现。虽然另外 2 个假说存在有待完善的方面, 但也从不同角度对“锁和钥匙”给予补充, 尤其“减速”假说有很好的细胞学数据证据做为支持<sup>[20-21]</sup>。目前, 胞质不相容的分子机制依然是研究热点, 相信不久的将来我们终将揭示长达半个多世纪的谜题, 从而可在蚊媒和其传播的疾病控制中更好地利用沃尔巴克氏体引起的胞质不相容性以建立更有效的新型策略。

2.2 沃尔巴克氏体引起的蚊媒对人类病原体的抗性最初的研究发现共生于果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内的沃尔巴克氏体可使其宿主具有抗病毒的特性, 该抗病毒特性主要针对于 RNA 病毒<sup>[22]</sup>, 而对 DNA 病毒似乎效果不明显。在媒介蚊虫的进一步研究发现, 沃尔巴克氏体可减低甚至清除人类病原体在蚊媒中的感染, 抑制登革热病毒、基孔肯雅病毒、黄病毒、疟原虫、丝虫等广泛病原体在蚊媒中的生长<sup>[23-25]</sup>, 从而具有阻断虫媒病传播的前景。目前, 其抗病毒机制的研究主要集中于从蚊虫天然免疫和代谢 2 个方面开展纵向深入探索。在天然免疫方面, 沃尔巴克氏体的共生提高其宿主蚊体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, 宿主的应对措施是激活其免疫 Toll 通路, 表达大量的抗氧化剂(antioxidant)以平衡高活性氧给自身带来的压力和危害, 而作为 Toll 通路下游的抗菌肽效应

因子亦随之激活而呈现高表达,从而对入侵的病毒产生强烈的抑制作用<sup>[26]</sup>。在代谢方面,研究发现沃尔巴克氏体可能抑制了病原体在蚊媒体内生长所需要的代谢分子(如脂肪酸等),或者是沃尔巴克氏体在与病原体竞争宿主的关键代谢产物时使后者成为失败者而被排除。而更新的证据支持沃尔巴克氏体介导的抗病原体作用是多种机制并存,通过增强宿主的天然免疫和改变宿主的代谢途径等多种途径在蚊虫体内建立一个能对广泛的病原体具有抗性的生理学环境。这种多种机制并存的证据进一步加强了沃尔巴克氏体在蚊媒和蚊媒病控制上的应用前景,因为这意味着病原体对该抑制作用将更难产生抗性。

### 3 基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制实验室研究

**3.1 沃尔巴克氏体新感染型蚊种的建立** 应用沃尔巴克氏体进行蚊媒控制首先需要在靶标蚊虫中建立新型的感染型,携带这种新型的感染型蚊株需与野生靶标蚊虫产生胞质不相容性。尽管沃尔巴克氏体在自然界广泛分布,但一些重要的蚊媒,如登革热的主要媒介埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)和所有传播疟疾按蚊如冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*),天然不携带沃尔巴克氏体。对于这些蚊种可通过胚胎显微注射(Embryonic microinjection)建立一个稳定携带新型沃尔巴克氏体的蚊株。胚胎显微注射始于20世纪初<sup>[27]</sup>,在20年代首先于果蝇中建立了通过胚胎显微技术进行种间转移沃尔巴克氏体<sup>[28]</sup>,之后对该技术进一步改进,使其可以应用于蚊媒中,并首先在白纹伊蚊中成功建立稳定携带新型沃尔巴克氏体的蚊株<sup>[29]</sup>。之后,在埃及伊蚊<sup>[30-32]</sup>和斯氏按蚊(*An. stephensi*)<sup>[25]</sup>中都获得成功。并且,实验证实新建立的、稳定携带沃尔巴克氏体的埃及伊蚊和斯氏按蚊可表现胞质不相容,并分别对登革热病毒和疟疾具有抗性<sup>[23-25]</sup>。

随着研究的广泛开展,新宿主的选择也不仅局限于天然不感染的蚊种,已携带共生沃尔巴克氏体的蚊种可通过抗生素或适度高温清除感染<sup>[13, 33-35]</sup>,再将新型沃尔巴克氏体放入,这样在客观上就形成了用一种新型沃尔巴克氏体置换原有沃尔巴克氏体型的效应;或者在已有的感染基础上,加入新型的沃尔巴克氏体于其体内。目前,利用此技术已经建立了全新的单型、双重甚至三重沃尔巴克氏体感染的实验室种群<sup>[28, 36-42]</sup>。此外,将感染沃尔巴克氏体的雌性与其亲缘关系接近但不感染的蚊种进行数代杂交[该技术也称作渐渗(introgression)],也可培育出共生沃尔巴克氏体且遗传背景与父本几乎相同的蚊种<sup>[43]</sup>。这些实

验室技术为实施基于沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制提供了重要的技术支持。

**3.2 适应力研究** 新型沃尔巴克氏体的共生对蚊虫的适应力(fitness cost)变化是实验室研究的一个重要关注点,它包括沃尔巴克氏体感染对宿主的寿命、发育周期、交配行为、吸血叮咬行为(biting behavior)、繁殖能力等的影响<sup>[44]</sup>。

以埃及伊蚊为例,感染 *wMelPop-CLA* 型沃尔巴克氏体影响其宿主幼虫和蛹的发育时间以及成虫翅膀长短和大小<sup>[45-46]</sup>。此外,还降低蚊卵的存活能力和保存时间,提高对人血的依赖,如吸食非人源血源,所产蚊卵数量减少<sup>[47]</sup>;而感染 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体,对其宿主的影响较小,产卵率无显著性影响,但呈现约15%的繁殖代价(fecundity cost)<sup>[31]</sup>。沃尔巴克氏体对宿主的适应力变化不仅与其不同型别有关,而且与其在宿主体内的分布及分布密度相关<sup>[46]</sup>。这些信息为新型共生蚊株是否能在野外现场成功应用提供了重要的参考依据。

**3.3 抗病毒特性研究** 携带新型沃尔巴克氏体蚊株对病毒的易感性、对病毒增殖和病毒传播的影响都需要实验室反复实验确认。仍以埃及伊蚊为例,登革热的媒介效能实验显示,携带 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体的埃及伊蚊中肠、头部及唾液腺内的病毒核酸拷贝数相较于相同处理的野生型埃及伊蚊,呈显著降低。蚀斑滴定检测2组蚊虫的唾液腺内具有活性的病毒颗粒,结果也显示 *wAlbB* 型沃尔巴克氏体使其宿主对病毒的传播有显著的抑制作用<sup>[25]</sup>。同样在 *wMelPop-CLA* 型沃尔巴克氏体感染的埃及伊蚊中,也证实这种对登革热病毒的抗性和抑制作用;在共生有 *wMelPop-CLA* 型沃尔巴克氏体的宿主细胞内,登革热病毒不能共存或仅有极少的病毒颗粒存在<sup>[24]</sup>。故 *wMelPop-CLA* 对登革热病毒的抑制效果强于 *wAlbB* 型,推测与 *wMelPop-CLA* 型沃尔巴克氏体在其宿主中呈现高密度的分布相关<sup>[46, 48]</sup>。由此可知,沃尔巴克氏体的高密度分布给宿主带来更显著的适应力降低的同时亦使其宿主对病毒具有更强抑制作用,因此,需要双方面考虑其影响,掌握好这把双刃剑,慎重甄选出具有强适应力、竞争力且有效的可用于现场实验的沃尔巴克氏体型别。

**3.4 蚊媒种群压制(population suppression)和种群替换(population replacement)** 在上述研究基础上,可在实验室笼内模拟对靶标蚊虫的种群压制和种群替换效果。种群压制指基于单向或者双向胞质不相容,将实验室建立的携带沃尔巴克氏体的雄蚊释放于天然不感染或感染不同型沃尔巴克氏体的靶标蚊群中,通过多次连续释放以引起胞质不相容性的不育,逐步减少靶标蚊群数量。理论上,通过释放足够数量的沃尔巴克

氏体感染雄蚊并持续足够长时间可实现靶标蚊种的根除(eradication)。种群替换策略是将感染新型沃尔巴克氏体、抗病的雌蚊释放于靶标蚊群中以引起单向胞质不相容性,当释放足够数量的雌蚊,经历足够代次繁衍,沃尔巴克氏体可扩散到所有的靶标蚊群中,从而使新的抗病蚊株取代原有的传病蚊媒,由此达到减少疾病传播的目的<sup>[49]</sup>。

其中,通过释放引起胞质不相容性的雄蚊来达到种群压制的策略与绝育昆虫技术(sterile insect technique, SIT)<sup>[50-51]</sup>类似。绝育昆虫技术通过向靶标昆虫中持续释放经射线而致绝育的雄虫,直至其种群根除,该技术已成功在南美洲区域性根除螺旋锥蝇(*Cochliomyia hominivorax*, 通常称 Screw worm)和地中海果蝇(*Ceratitis capitata*),并由政府和国际原子能机构合作将其以产业化模式来规模性运作。基于沃尔巴克氏体胞质不相容的蚊虫控制策略也被称为不相容昆虫技术(incompatible insect technique, IIT)<sup>[11, 52-55]</sup>。对于上述 2 种策略均需要实验室进行小规模模拟实验,积累翔实的数据并建立数学模型,为实际现场工作计算精准的释放昆虫数量以及释放干预周期提供基础。

#### 4 基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制现场实验

基于沃尔巴克氏体的蚊虫生物控制现场实验最早始于 1967 年:Laven<sup>[11]</sup>于缅甸仰光北面的小村庄(Burma, Rangoon, Okpo),持续 3 个月(1967 年 2—5 月)释放可与当地雌蚊交配引起胞质不相容的致乏库蚊(*Culex pipiens fatigans*)雄蚊(该蚊株从其他地区采集获得),结果显示 12 周后当地该蚊种得以彻底根除。其以时间短、效应显著而成为经典案例。但一方面因为当时还不知道该胞质不相容性的表型是由沃尔巴克氏体引起的,另一方面还没有建立能人工感染沃尔巴克氏体的胚胎显微注射技术,该种群压制技术无法得以进一步推广。

随着实验室研究数据和野外现场经验的积累,很多旨在有效控制虫媒疾病传播、基于沃尔巴克氏体的蚊媒控制技术已从实验室拓展到现场实验:在澳洲东北的约克斯诺波(Yorkeys Knob)和戈登韦尔(Gordonvale),从 2011 年 1 月至 2012 年 3 月,分 10 次连续释放携带 *wMel* 型沃尔巴克氏体的埃及伊蚊雄蚊及雌蚊,通过种群替换以控制这一登革热的主要传播媒介。虽然原计划欲采用 *wMelPop* 型沃尔巴克氏体<sup>[56]</sup>,其特性为可缩短寄生宿主埃及伊蚊的寿命。但是源自果蝇的 *wMel* 型沃尔巴克氏体不仅可提高其宿主埃及伊蚊的抗病毒能力,且对宿主的适应力影响较小<sup>[48]</sup>。此外,数学模型预测相较于 *wMelPop* 型沃尔巴克氏体,

*wMel* 型沃尔巴克氏体使其宿主埃及伊蚊可更顺利、有效地侵入野生蚊群。基于上述信息, *wMel* 型最终得以应用。连续监测结果显示,当地埃及伊蚊中携带 *wMel* 型沃尔巴克氏体的比例呈稳定上升趋势,在停止释放后的第 5 周,当地 100% 的埃及伊蚊感染 *wMel* 型沃尔巴克氏体<sup>[57]</sup>。这是目前已取得成功的种群替换现场案例,该实验的成功为应用沃尔巴克氏体阻断蚊群对登革热病毒的传播提供了现场实验可行性的支持。

基于上述成功经验,2013 年 4 月经实验反复论证后<sup>[58]</sup>,在越南中南海岸的庆和省三阮岛(Vietnam, Khanh Hoa province, Tri Nguyen Island)释放感染沃尔巴克氏体的埃及伊蚊,截止 8 月底,已取得初步成功,当地 80% 的埃及伊蚊感染沃尔巴克氏体<sup>[59]</sup>。

目前,通过应用沃尔巴克氏体技术致力于全球范围根除登革热已形成一个国际合作团队,来自中国、美国、澳大利亚、巴西、哥伦比亚、印度尼西亚、泰国、越南的各国沃尔巴克氏体研究专家联袂合作一个非盈利项目“消灭登革热”计划(Eliminate Dengue Program)<sup>[60]</sup>。在各国专家的共同努力和协力合作下,基于沃尔巴克氏体的生物控制现场实验均在积极进展中。

已开展的其他疾病蚊媒的现场实验还包括在法国波利尼西亚和其他太平洋岛屿国家,其目的是使用基于不相容昆虫技术的现场实验控制波利尼西亚伊蚊(*Ae. polynesiensis*)。 *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* 是南太平洋地区的淋巴丝虫病(Lymphatic filariasis)的主要媒介和登革热的重要传播媒介<sup>[61-62]</sup>。目前,小范围的野外实验已于一个小海岛开展并历时约 30 周<sup>[63-64]</sup>,跟踪数据显示人为释放的共生沃尔巴克氏体的波利尼西亚伊蚊雄蚊已适应当地环境显示出其竞争能力<sup>[64]</sup>,为将来大范围的野外实验提供了初步数据。

另外,意大利环境农业中心(CAA, Centro Agricoltura Ambiente “G. Nicoli”)和意大利国立新技术、新能源和经济持续性发展部(ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development)合作,开展了一个旨在控制白纹伊蚊的技术整合型生物控制项目。该项目已通过将新型沃尔巴克氏体——*wPip* 型沃尔巴克氏体成功导入已清除原有双重沃尔巴克氏体感染的白纹伊蚊中<sup>[65]</sup>,建立了可引起双向胞质不相容的新型沃尔巴克氏体感染的白纹伊蚊<sup>[14]</sup>。野外初步实验显示,该新型感染蚊种雌蚊与野外雄蚊交配可导致胞质不相容,且在自然环境中呈现较小的适应力变化。

#### 5 基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制应用前景

在基于沃尔巴克氏体蚊虫的种群替代策略中,因

蚊群携带了稳定共生的沃尔巴克氏体而对病毒具有长期的抗性,故具有持续有效的优点。在疾病流行区一旦种群替换完成,即使有新的传染源(如患者)的输入,疾病流行也不能发生,因此可达到持续控制疾病的效果。此外,由于该技术对其他生物和环境零污染,具有绿色环保的好处。在实际运用中具有低成本、操作简单等特点使其可广泛使用,且能与其他虫媒控制(如化学杀虫剂)和疾病控制(如疫苗和药物)方法整合使用,彼此没有干扰。因以活体蚊群为工具,可发挥其主动寻找靶标蚊群交配的优势,而无需进行靶标蚊群孳生地的精确定位。活体蚊群具有一定范围飞行能力,因此效应不仅仅局限于实施干预的地点,干预效应可在一定范围内呈辐射性放大。上述优点已在现场实验中得以体现,相信在未来的生物控制中,以其独特的优势终将得以更广更多的运用。

## 6 基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒生物控制面临的问题

基于共生菌沃尔巴克氏体的蚊虫生物控制策略也面临一些技术上的挑战。类似于许多生物控制技术,实现野外蚊群与沃尔巴克氏体的长期稳定共生需要一定周期,所以,该策略时效较化学杀虫剂慢。但该缺点相对于其控病效果的特效性是可以接受的。此外,该技术的应用具有蚊种特异性,对于干预地点存在多种媒介蚊群均可传播同种疾病的情况,需要对每一虫媒单独设计和应用控制方法。虽然在运用阶段其成本低、操作简单,但是前期基于胚胎注射技术的建立新型沃尔巴克氏体具有很大的技术难度,整个过程也许需较长的时间。但以上问题随着技术的发展相信在不久的将来都会得到解决。

### 参考文献

- [1] Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, et al. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control[J]. Acta Trop, 2013, 10.1016/j.actatropica.2013.11.004.
- [2] Hertig M, Wolbach SB. Studies on Rickettsia-Like micro-Organisms in insects[J]. J Med Res, 1924, 44(3):329-374.7.
- [3] Hertig M. The *Rickettsia*, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens* [J]. Parasitology, 1936, 28:453-486.
- [4] Jiggins FM, Bentley JK, Majerus ME, et al. How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling[J]. Proc Biol Sci, 2001, 268(1472): 1123-1126.
- [5] Werren JH, Windsor DM. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?[J]. Proc Biol Sci, 2000, 267(1450): 1277-1285.
- [6] Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, et al. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae)[J]. J Med Entomol, 2000, 37(3):340-345.
- [7] Ricci I, Cancrini G, Gabrielli S, et al. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications[J]. J Med Entomol, 2002, 39(4):562-567.
- [8] Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(10):741-751.
- [9] Laven H. Crossing experiments with European and American strains of the *Culex pipiens* complex [J]. Z Tropenmed Parasitol, 1954, 5(3):317-323.
- [10] Laven H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens*-complex[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1959, 24:166-173.
- [11] Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility[J]. Nature, 1967, 216(5113):383-384.
- [12] Laven H. Speciation and evolution in *Culex pipiens* [M]// Wright J, Pal R. Genetics of Insect Vectors of Disease. Amsterdam, Holland, Elsevier, 1967:251-275.
- [13] Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L [J]. Nature, 1971, 232(5313): 657-658.
- [14] Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadachakul W. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive[J]. Genetics, 2002, 160(3):1087-1094.
- [15] Dobson SL, Rattanadachakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus* [J]. Heredity (Edinb), 2004, 93(2): 135-142.
- [16] Duron O, Bernard C, Unal S, et al. Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens* [J]. Mol Ecol, 2006, 15(10):3061-3071.
- [17] Guillemaud T, Pasteur N, Rousset F. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens* [J]. Proc Biol Sci, 1997, 264(1379): 245-251.
- [18] Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, et al. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10):2761-2772.
- [19] Poinot D, Charlat S, Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts[J]. Bioessays, 2003, 25(3):259-265.
- [20] Lassy CW, Karr TL. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans* [J]. Mech Dev, 1996, 57(1):47-58.
- [21] Tram U, Sullivan W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility [J]. Science, 2002, 296(5570):1124-1126.
- [22] Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* [J]. PLoS Biol, 2008, 6(12):e2.
- [23] Bian G, Xu Y, Lu P, et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti* [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4):e1000833.
- [24] Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium [J]. Cell, 2009, 139(7):1268-1278.
- [25] Bian G, Joshi D, Dong Y, et al. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection [J]. Science, 2013, 340(6133):748-751.
- [26] Pan X, Zhou G, Wu J, et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(1):e23-31.
- [27] Lecal JC, Perona R, Feramisco J. Microinjection [M]. Berlin, Germany: Birkhäuser, 1999:9-12.

- [28] Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM, et al. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* [J]. Science, 1993, 260(5115): 1796–1799.
- [29] Xi Z, Dean JL, Khoo C, et al. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2005, 35(8): 903–910.
- [30] Lobo NF, Hua-Van A, Li X, et al. Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a piggy Bac vector [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(2): 133–139.
- [31] Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population [J]. Science, 2005, 310(5746): 326–328.
- [32] Jasinskiene N, Juhn J, James AA. Microinjection of *Aedes aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes [J]. J Vis Exp, 2007(5): 219.
- [33] Portaro JK, Barr AR. “Curing” *Wolbachia* infections in *Culex pipiens* [J]. J Med Entomol, 1975, 12(2): 265.
- [34] Wright JD, Wang BT. Observations on *Wolbachiae* in mosquitoes [J]. J Invertebr Pathol, 1980, 35: 200–208.
- [35] Trpis M, Perrone JB, Reissig M. Control of cytoplasmic incompatibility in the *Aedes scutellaris* complex [J]. J Hered, 1981, 72: 313–317.
- [36] Poinot D, Bourtzis K, Markakis G, et al. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships [J]. Genetics, 1998, 150(1): 227–237.
- [37] Braig HR, Guzman H, Tesh RB, et al. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart [J]. Nature, 1994, 367(6462): 453–455.
- [38] Giordano R, O'Neill SL, Robertson HM. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana* [J]. Genetics, 1995, 140(4): 1307–1317.
- [39] Clancy DJ, Hoffmann AA. Behavior of *Wolbachia* endosymbionts from *Drosophila simulans* in *Drosophila serrata*, a novel host [J]. Am Nat, 1997, 149(5): 975–988.
- [40] Rousset F, Braig HR, O'Neill SL. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects [J]. Heredity (Edinb), 1999, 82(Pt 6): 620–627.
- [41] Sasaki T, Ishikawa H. Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection [J]. Heredity (Edinb), 2000, 85(Pt 2): 130–135.
- [42] Charlat S, Nirgianaki A, Bourtzis K, et al. Evolution of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and *D. sechellia* [J]. Evolution, 2002, 56(9): 1735–1742.
- [43] Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, et al. The endosymbiont *Wolbachia pipiensis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line [J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2083.
- [44] Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease [J]. EMBO Rep, 2011, 12(6): 508–518.
- [45] McMeniman CJ, O'Neill SL. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(7): e748.
- [46] Moreira LA, Ye YH, Turner K, et al. The *wMelPop* strain of *Wolbachia* interferes with dopamine levels in *Aedes aegypti* [J]. Parasit Vectors, 2011, 4: 28.
- [47] McMeniman CJ, Hughes GL, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* disrupts mosquito egg development to a greater extent when mosquitoes feed on nonhuman versus human blood [J]. J Med Entomol, 2011, 48(1): 76–84.
- [48] Walker T, Johnson PH, Moreira LA, et al. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations [J]. Nature, 2011, 476(7361): 450–453.
- [49] McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(3): 181–193.
- [50] Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management [M]. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2005: 563–727.
- [51] Alphey L, Benedict M, Bellini R, et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis [J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2010, 10(3): 295–311.
- [52] Boller EF, Russ K, Vallo V, et al. Incompatible races of European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), their origin and potential use in biological control [J]. Entomol Exp Appl, 1976, 20: 237–247.
- [53] Bourtzis K, Robinson AS. Insect pest control using *Wolbachia* and/or radiation [M]// Bourtzis K, Miller TA. Insect Symbiosis. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2006: 225–246.
- [54] Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, et al. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(42): 15042–15045.
- [55] Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I, et al. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) genetic sexing strain [J]. Entomol Exp Appl, 2009, 132: 232–240.
- [56] McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Science, 2009, 323(5910): 141–144.
- [57] Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission [J]. Nature, 2011, 476(7361): 454–457.
- [58] Jeffery JA, Thi Yen N, Nam VS, et al. Characterizing the *Aedes aegypti* population in a Vietnamese village in preparation for a *Wolbachia*-based mosquito control strategy to eliminate dengue [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(11): e552.
- [59] Eliminate Dengue Program. Cairns field trial update [EB/OL]. [2013-06-19]. <http://www.eliminatedengue.com/progress>.
- [60] Lepage D, Bordenstein SR. *Wolbachia*: Can we save lives with a great pandemic? [J]. Trends Parasitol, 2013, 29(8): 385–393.
- [61] Lardeux F, Riviere F, Sechan Y, et al. Control of the *Aedes* vectors of the dengue viruses and *Wuchereria bancrofti*: the French Polynesian experience [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2002, 96 Suppl 2: S105–116.
- [62] Cao-Lormeau VM, Roche C, Aubry M, et al. Recent emergence of dengue virus serotype 4 in French Polynesia results from multiple introductions from other South Pacific Islands [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29555.
- [63] Brelsfoard CL, Sechan Y, Dobson SL. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2008, 2(1): e129.
- [64] O'Connor L, Plichart C, Sang AC, et al. Open release of male mosquitoes infected with a *wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(11): e1797.
- [65] Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, et al. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) - *Wolbachia pipiensis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the *wPip* strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) [J]. J Med Entomol, 2010, 47(2): 179–187.