科技前沿

基于组学的寄生蜂与寄主免疫的相互作用*

林 哲[1] 李建成[2] 路子云[2] 邹 振[1]**

(1. 中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101;
2. 河北省农林科学院植物保护研究所 农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室
河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心 保定 071000)

摘 要 寄生蜂作为天敌昆虫,在害虫生物防治中起着极其重要的作用。现代分子生物学和第二代测序技术的迅速发展,为筛选寄生蜂与寄主免疫互作的关键分子,阐明寄生蜂逃避或抑制寄主免疫系统攻击的机理提供了新的机遇。昆虫的天然免疫可分为细胞免疫和体液免疫,寄生蜂在与寄主长期的协同进化过程中,依靠毒液(venom)、多分 DNA 病毒(PDV)、类病毒颗粒(VLP)、畸形细胞(teratocyte)等手段,一方面调控寄主血细胞的增殖和分化,抑制细胞包囊反应,从而破坏寄主的细胞免疫系统;另一方面,通过抑制酚氧化酶原激活干扰寄主的体液免疫,从而逃避黑化反应的攻击。寄生蜂在发育过程中也有相应的免疫防御机制。本文从细胞免疫、体液黑化反应以及免疫信号通路等方面,综述了近年来利用组学手段在寄生蜂调控寄主免疫方面取得的最新进展,以期为阐明天然免疫的分子机制、探索害虫防治新方法提供借鉴。

关键词 寄生蜂,免疫抑制,体液免疫,细胞免疫,黑化反应

Immune aspects of interactions between parasitoid wasps and hosts

LIN Zhe[1] LI Jian-Cheng[2] LU Zi-Yun[2] ZOU Zhen[1]**

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Institute of Plant Protection of Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, IPM Center of Hebei Province; Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, P. R. China, Baoding 071000, China)

Abstract Parasitoid wasps, as natural enemies of agricultural pests, play important roles in biological pest control. To date, many studies have focused on identifying key molecules involved in parasitoid-host interactions. Insects have a potent innate immune system, comprising cellular immunity and humoral immunity. Parasitoid wasps have evolved ways to evade or suppress these host defenses with venom proteins, polydnavirus (PDV), virus-like particles (VLP), teratocytes and other virulent factors. The invasion of parasitoids reduces the total hemocyte count and suppresses hemocyte differentiation. Encapsulation, an important cellular immune response, can be inhibited by Rho family factors and calreticulin from parasitoid venom. Parasitoids evade host humoral immunity by interfering with Toll and IMD immune signaling pathways. Additionally, host melanization is strongly inhibited by virulent factors. Through this review of the current literature, we hope to provide new information on molecular aspects of parasitoid-host interactions, which may lead to novel approaches for pest management.

Key words parasitoid wasp, immune suppression, humoral immunity, cellular immunity, melanization

在自然界,随着漫长的生物演化,寄生与被寄生成为一种普遍的生物现象。根据化石分析结果,推测出 22 亿年前的地球上,最早的膜翅目(Hymenoptera)昆虫就已开始出现,又经过 6 亿年

* 资助项目:国家自然科学基金项目(31272367);国家重大科学研究计划(973 项目)(2014CB139400)。

**通讯作者,E-mail:zouzhen@ioz.ac.cn

收稿日期:2013-05-07,接受日期:2013-06-08

几丁质酶(EC.3.2.1.14)通过水解几丁质糖苷键以降解几丁质,在自然界中分布广泛,存在于脊椎动物、微生物、节肢动物甚至植物中(You *et al.*,2003)。昆虫几丁质酶属于糖基水解酶18家族,为内切酶(Arakane and Muthukrishnan,2010),存在于昆虫的中肠、蜕皮腺和一些昆虫的毒腺中,并具有多种功能,包括防御/免疫、消化和蜕皮(Genta *et al.*,2006;Zhu *et al.*,2008;李瑶和范晓军,2011)。在昆虫体内,几丁质与蛋白质联合形成了表皮外骨骼和中肠腔里的围食膜,昆虫蜕皮期间,旧角质层的一部分被几丁质酶消化,同时新的几丁质形成和堆积(Reynolds and Samuels,1996),抑制或增加几丁质酶的活性都可以影响几丁质的新陈代谢(樊东等,2005),因此可以尝试以昆虫几丁质酶为对象研究新型高效的生物杀虫剂以控制害虫。

事实上科研者已经对几丁质酶在生物防治方面的应用进行了探索。基因工程研究进展表明可以利用昆虫几丁质酶本身作为生物农药控制昆虫和真菌(Kramer and Muthukrishnan,1997)。表达烟草天蛾几丁质酶的番木瓜对红蜘蛛 *Tetranychus cinnbarinus* 有更大的耐受性,红蜘蛛损坏正常番木瓜叶片数是转基因叶片的4倍,田间试验也证实了转基因番木瓜增加了对红蜘蛛侵袭的抵抗(McCafferty *et al.*,2006)。此外,几丁质酶和其他蛋白如昆虫毒素可协同作用提高杀虫效果,几丁质酶和蝎毒素两种蛋白共表达的转基因植物相对于只表达一种蛋白的转基因植物具有更高的杀虫活性(Wang *et al.*,2005)。目前已经利用杆状病毒载体将相应的基因引入昆虫细胞系得到几种含几丁质酶基因的重组病毒和纯化的几丁质酶蛋白。喂养含几丁质酶的重组 AcMNPV 病毒剂量为1 μg/g 幼虫体重的饲料的家蚕 *Bombyx mori* 5龄幼虫的死亡率为100%(Rao *et al.*,2004)。注射纯几丁质酶的甘蓝夜蛾幼虫(番茄夜蛾)*Mamestra brassicae* 角质层厚度下降,口服几丁质酶在低剂量(2.5 μg 几丁质酶/g 昆虫)能提高幼虫的死亡率(Fitches *et al.*,2004)。这些说明几丁质酶确实可以影响昆虫正常生长发育,从而能达到防治害虫的目的。本文将舞毒蛾几丁质酶(*LdCht*)基因和苜蓿银纹夜蛾核型多角体(*AcPH*)基因分别重组到 Bacmid 中,在 Sf9 细胞中成功表达了舞毒蛾几丁质酶,并且重组病毒在细胞中实现组装和扩增,为后续在基因、蛋白水平上深入研究舞毒蛾几丁质酶的特性和开发新型、安全、高效的生物杀虫剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞杆状病毒表达系统 *E. coli* 菌株 DH10Bac、载体 pFastBac™ Dual 为美国 Invitrogen 公司产品、草地贪夜蛾细胞(Sf9)由山西省生物研究所提供,感受态 Trans1-T1 为北京全式金公司产品,质粒 Blunt-*LdCht*、野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒为本实验室保存。

1.1.2 工具酶及其他生化试剂 DNA 聚合酶 pfu 酶、dNTPs、Trans2K Plus DNA marker、ProteinRuler Ⅲ 购自北京全式金公司,四季青无支原体胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司,T4 连接酶及各种限制性内切核酸酶均购自 Fermentas 公司,Lipofectamine® 2000 Reagent 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,4 MU-$(GlcNAc)_3$ 和 TNM-FH 细胞培养基购自 SIGMA 公司,无内毒素大型质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司,1 mL Ni-NTA 预装柱购自上海生工生物工程股份有限公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,其他主要生化试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计 根据舞毒蛾几丁质酶基因开放阅读框序列和苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的多角体蛋白基因序列分别设计上下游引物及鉴定引物(表1),引物序列引入的酶切位点用下划线标出,其中下游引物 P2 还引入 6 × His 标签,用点式下划线标出。其中 P1、P2 用于扩增舞毒蛾几丁质酶基因,D1、D2 用于扩增 AcMNPV 的多角体基因,U1 用于鉴定转染是否成功。

1.2.2 克隆 *LdCht* 和 *AcPH* 基因 扩增舞毒蛾几丁质酶基因的开放读码框以质粒 Blunt-*LdCht* 为模板,引物使用 P1 和 P2,按常规方法进行 PCR 扩增。条件为:94℃ 预变性 1 min,94℃ 变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 105 s,32 个循环,72℃ 10 min。

将保存的野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒作为模板,引物用 D1 和 D2,按常规方法进行 PCR 扩增得到多角体蛋白基因。57℃退火 30 s,

进化出拟寄生昆虫(parasitoid insect)(Whitfield,1998)。在已发现的寄生性天敌昆虫中,寄生蜂(parasitoid wasp)所占比例超过 80%,这一类群主要集中在膜翅目细腰亚目的小蜂科(Chalcididae)、姬蜂科(Ichneumonidae)和茧蜂科(Braconidae)3 个科(Eggleton and Belshaw,1992)。寄生蜂将卵产在鳞翅目、鞘翅目、膜翅目和双翅目等昆虫的卵、幼虫、蛹的体表或体内,幼蜂以寄主作为食物营寄生生活,成虫羽化后营自由生活。在长期的寄生蜂与寄主的协同进化过程中,寄生蜂动用了生命体中许多基因元件通过复制,重组与变异形成了独特的自身免疫与对寄主免疫抑制的体系(朱家颖等,2008)。

寄生蜂对寄主的调节是多方面的:首先,寄生蜂能够迟滞寄主的生长发育、抑制变态、提高寄主血淋巴内营养成分(糖和脂)的浓度(Pruijssers *et al.*,2009);其次,寄生蜂也能改变寄主的行为以利于自身的成功寄生和后代繁衍,如扁头泥蜂 *Ampulex compressa* 将毒液注入寄主的中枢神经系统,寄主停止活动但并不死亡,且继续滋养寄生蜂后代(Libersat *et al.*,2009);最后,在寄生过程中寄生蜂必须抑制寄主免疫系统的攻击,保证寄生蜂卵或幼蜂在寄主体外或体内能够正常地完成寄生过程(Amaya *et al.*,2005)。寄生蜂依靠毒液(venom)、多分 DNA 病毒(Polydnavirus,PDV)、类病毒颗粒(virus like particle,VLP)、畸形细胞(teratocyte)等手段,一方面调控寄主血细胞的增殖和分化,抑制细胞包囊反应,从而破坏寄主的细胞免疫系统;另一方面,通过抑制酚氧化酶原激活干扰寄主的体液免疫,从而逃避黑化反应的攻击。寄生蜂在发育过程中也有相应的免疫防御机制。近年来,随着分子生物学和基因组技术飞速的发展,有关寄生蜂与寄主免疫的相互作用研究取得了很大突破,本文就最新关于寄生蜂调控寄主的免疫分子机制展开概述,并提出未来发展的对策。

1 基于组学研究的免疫互作关系

基于组学的寄生蜂与寄主免疫的互作分析,是当前昆虫免疫学研究的一个热点。最近已利用转录组学技术从基因的整体表达水平上,阐述寄主感染寄生蜂后所引起的自身免疫系统激活特征。如目前已分析了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 被天敌昆虫反颚茧蜂 *Asobara tabida* 寄生后(Wertheim *et al.*,2005)、小菜蛾 *Plutella xylostella* 被半闭弯尾姬蜂 *Diadegma semiclausum* 寄生后(Etebari *et al.*,2011)、菜粉蝶 *Pieris rapae* 被蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 寄生后(Fang *et al.*,2010)寄主免疫基因的差异表达。也有通过采用定向小范围直接筛选基因的方法,鉴定果蝇参与应对匙胸瘿蜂 *Leptopilina boulardi* 免疫反应的基因(Howell *et al.*,2012)。

在寄生过程中,对于寄生蜂来说,雌蜂的卵巢萼液(calyx fluid)、类病毒颗粒、蜂毒、多分 DNA 病毒和幼蜂的畸形细胞甚至幼蜂本身都是作用于寄生关系的重要生物因子(Pennacchio and Strand,2006)。随着丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*、吉氏金小蜂 *Nasonia giraulti* 和长角金小蜂 *Nasonia longicornis* 3 种金小蜂基因组测序工作的完成,对这些寄生因子的分析进入了功能基因组时代(Werren *et al.*,2010)。其中,毒液蛋白和 PDV 作为最主要的两类寄生因子。目前已通过基因组分析、检测基因差异表达和质谱分析从金小蜂中鉴定出接近 100 个毒液蛋白,用相似的方法从棉大卷蛾甲腹茧蜂 *Chelonus inanitus* 中鉴定出近 30 个毒液蛋白(Vincent *et al.*,2010;Werren *et al.*,2010),从而为进一步阐明这些毒液蛋白作用的功能提供了基础。

PDV 属于 Polydnaviridae(茧蜂科称为 Bracovirus,姬蜂科称为 Ichnovirus)(Strand and Burke,2012),是突破寄主免疫体系、调节生理生化的重要因素(Amaya *et al.*,2005)。目前已有多种寄生蜂 PDV 的基因组测序完成(如 NCBI 数据库有 5 种 PDV 全基因组序列)(Webb *et al.*,2006)。发现 PDV 是由十几个到几十个双链闭环超螺旋 DNA 片段组成,含有锚蛋白(ankyrin,Ank)和富半胱氨酸蛋白(cysteine-rich protein,Crp)等寄生因子。最近,还在菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* 的 PDV 基因组中发现了一个新的解旋酶(Pif1 helicase)基因,其具体的功能还有待鉴定(Chen *et al.*,2011)。毒液蛋白和 PDV 的表达产物在功能上是类似的,都可能是从具备正常生化功能的体蛋白演变而来。在许多寄生蜂和寄主系统中,毒液蛋白和 PDV 这种协同进化的关系体现在功能上彼此依存而且对抑制寄主免疫系统具有正向叠加效应(Asgari and Rivers,2011)。

2　寄生蜂对寄主细胞免疫的调控

昆虫拥有有效的天然免疫机制以应对外源胁迫生物(病原微生物,寄生虫和寄生蜂)的侵袭,构建这一防御体系主要包括体液免疫和细胞免疫。当寄生蜂将卵产入寄主血腔后,一旦入侵信号为寄主免疫模式识别蛋白所捕获,即面临着来自体液免疫(酚氧化酶原级联系统等)和细胞免疫(血细胞的包囊反应等)的攻击。鳞翅目昆虫中血细胞的类群被分为:浆血细胞(plasmatocyte)、粒细胞(granular cell)和类绛色细胞(oenocytoid),果蝇的血细胞命名稍有不同但功能对应:浆血细胞(plasmatocyte)、叶状细胞(lamellocyte)和晶细胞(crystal cell)。寄主血腔中的血细胞数目和分化机制在寄生蜂寄生后,会明显受到寄生蜂寄生因子的严格调控,同时还会诱导细胞的裂解和凋亡,破坏细胞骨架,降低细胞延展及附着能力,并能引起免疫相关基因表达水平的变化(Lanzrein *et al.*, 1998;Howell *et al.*,2012)。如果蝇 Collier 是脊椎动物早期 B 细胞因子(EBF)的同源基因,与叶状细胞分化有关;其突变体被寄生以后不会继续产生叶状细胞,证实其与细胞免疫相关联(Crozatier *et al.*, 2004)。又如,清道夫受体(scavenger receptor,SR)是一类跨膜蛋白受体,其在小菜蛾 *P. xylostella* 和黑腹果蝇 *D. melanogaster* 中寄生蜂寄生因子的作用下表达减少,显示其参与了寄主的天然免疫过程(Wertheim *et al.*, 2005; Etebari *et al.*,2012)。

血细胞参与免疫的作用主要有吞噬(phagocytosis)、集结(nodulation)和包囊(encapsulation)等方式。其中,针对寄生虫和寄生蜂卵等比较大的外源异物主要是包囊作用(Lavine and Strand,2002)。包囊作用动员血细胞在异物周围逐层附着形成一个囊鞘(capsule)结构。包囊作用伴随着黑化反应(酚氧化酶原 prophenoloxidase 的激活)和活性氧自由基的生成,最终导致陷在其中的寄生蜂卵和病原体失活。包囊反应中囊鞘结构即受到血细胞接触延展和粘附性能改变的影响,也被信号分子、粘附分子以及受体分子所调控。同细菌的作用方式类似,寄生蜂通过调控血细胞的延展和粘附能力,来抑制寄主的包囊反应。近年来,主要围绕属于小 G 蛋白超家族的 Rho 蛋白和钙网蛋白开展研究。已有研究表明,果蝇的 Rac2(Ras homologous GTPase)蛋白和细胞延展、集聚有关(Williams *et al.*, 2005);RhoGEF(Rho guanine nucleotide exchange factor)同 Rac2 相互作用,参与果蝇抗寄生蜂的细胞免疫反应(Sampson *et al.*, 2012)。最近研究发现,匙胸瘿蜂 *L. boulardi* 毒液中的一种 P4 蛋白能使寄主血细胞数目和特性发生改变,并抑制包囊反应;P4 蛋白包含有 RhoGAP(Ras homologous GTPase activating protein)结构域能够引起细胞粘附性质的改变,导致细胞骨架中的肌动蛋白纤丝重组(Labrosse *et al.*,2005),依赖 Rho GTPase 的寄主细胞免疫被抑制。钙网蛋白(Calreticulin)是内质网主要钙结合蛋白之一,并有凝集素结合和伴侣蛋白的性质。在寄生虫与宿主发生相互作用时,钙网蛋白会影响细胞延展和粘附作用(Ferreira *et al.*,2004)。如菜粉蝶微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula* 的毒液中的钙网蛋白抑制血细胞的延展,阻止了包囊反应(Zhang *et al.*,2006)。

3　寄生蜂对寄主黑化反应的调控

目前,对于寄生蜂调控寄主黑化反应的研究进展较快。黑化反应是一个复杂的级联放大反应,与黑化包囊(melanotic encapsulation)密切相关,在分子水平上表现为酚氧化酶原的激活(Cerenius *et al.*, 2008)。酚氧化酶原是黑色素(melanin)形成过程中的关键酶,在昆虫的血淋巴中的浓度较高,一旦被酚氧化酶原激活酶酶切后会生成有活性的酚氧化酶,将催化酪氨酸经过多巴、多巴醌、多巴色素、醌等一系列复杂的反应,最后生成黑色素。黑色素沉淀于外源胁迫物(寄生虫、细菌、病毒等)的表面,完成黑化反应(Zou *et al.*,2008)。在此过程中同时产生一些氧自由基活性中间物,对入侵的病原体也会产生一定的细胞毒性作用。

黑化反应级联系统包含若干种丝氨酸蛋白酶(serine protease),如酚氧化酶原激活酶等。这类丝氨酸蛋白酶在结构上非常保守,并且参与免疫、发育等多种生理过程(Zou *et al.*,2010)。其氨基端含有 Clip 结构域,羧基端带有一个完整的胰蛋白酶或者胰凝乳蛋白酶结构域(Kanost *et al.*, 2004)。丝氨酸蛋白酶以酶原的形式存在于血淋巴中,在外源胁迫物被免疫系统识别后,会将下游蛋白酶在特定的激活位点酶切激活,从而产生有

活性的蛋白酶对其下游蛋白酶或者酚氧化酶原进行相同方式的激活。该级联反应受丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin)的严格调控(Zou and Jiang, 2005)。因而能否激活酚氧化酶原级联系统生成酚氧化酶或提高酚氧化酶的活性,对维持昆虫的体液免疫功能非常重要。

寄生蜂对寄主黑化反应系统的调节分为对黑化反应基因转录水平的调控和黑化反应酶解激活的生化调控。

首先,寄生蜂通过调节与黑化反应相关基因的转录来抑制寄主血淋巴黑化反应激活。如在瘤姬蜂 *Pimpla hypochondriaca* 的毒囊中明确了酚氧化酶、酚氧化酶原抑制剂及毒性因子的存在(Parkinson and Weaver, 1999)。毒液酚氧化酶有信号肽,无保守的酶切激活位点,直接以活性形式留在毒囊中;而正常血细胞所分泌的酚氧化酶原,无信号肽,以酶原的形式保存在血淋巴中。最近的研究表明,云杉色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 酚氧化酶原基因的转录水平被姬蜂 *Tranosema rostrale* 的 PDV 抑制(Doucet *et al.*, 2008);寄主昆虫被寄生后,其黑化反应基因如酚氧化酶原、丝氨酸蛋白酶和酚氧化酶原激活酶的表达水平发生了显著的变化(Mahadav *et al.*, 2008; Wertheim *et al.*, 2005; Etebari *et al.*, 2011);进一步通过解析毒液和 PDV 中的多种寄生因子,发现它们能抑制黑化反应的激活(Kohler *et al.*, 2007)。如菜粉蝶微红盘绒茧蜂 *C. rubecula* 存在于毒液中的 Vn4.6 和 Vn50 均能抑制黑化反应的激活(Asgari *et al.*, 2003a)。其中,Vn50 蛋白为 50 ku 的丝氨酸蛋白酶类似物,具有与酚氧化酶原激活酶相似的结构域组成,但是催化三联体中的丝氨酸被取代为甘氨酸,因此不具备催化活性(Asgari *et al.*, 2003b)。体外表达的 Vn50 蛋白能抑制酚氧化酶原的活性。进一步研究发现,其与寄主体内的酚氧化酶原激活酶和酚氧化酶原结合导致黑化反应激活被抑制(Zhang *et al.*, 2004)。当果蝇过量表达 Vn50,也会导致血淋巴黑化反应的减弱同时降低了对球孢白僵菌的防御力(Thomas *et al.*, 2010)。尽管具体生化机理有待深入探讨,但现有证据从不同层面证明 Vn50 蛋白对于寄主黑化反应的负调控。

另一类寄生因子如毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 的 PDV 能表达 Egf1.0, Egf1.5 蛋白(Beck and Strand, 2007; Lu *et al.*, 2008)。其中,结合了 Egf1.0 的烟草天蛾的酚氧化酶原激活酶 PAP-1 和 PAP-3 失去了酶活力,不能继续酶解酚氧化酶原。这两个蛋白都含有富半胱氨酸元件,且都能通过对上游酚氧化酶原激活酶的抑制来实现对寄主黑化反应达到抑制的目的。在瘤姬蜂 *P. hypochondriaca* 的毒液中鉴定了 4 种富半胱氨酸毒液蛋白,序列上同已知蛋白酶抑制剂同源,同时并至少有一种能够抑制毒液酚氧化酶活性(Parkinson *et al.*, 2004)。此外在果蝇 *Drosophila yakuba* 的天敌昆虫匙胸瘿蜂 *L. boulardi* 的毒液中发现丝氨酸蛋白酶抑制剂 LpSPNy 蛋白,能特异性地阻断寄主幼虫的酚氧化酶原激活通路(Colinet *et al.*, 2009)。除此之外 Colinet 等(2011)还发现,在匙胸瘿蜂 *L. boulardi* 的毒液中发现超氧化物歧化酶(Cu, Zn superoxide dismutase) SOD1 和 SOD3 的转录本,SOD1 能够抑制酚氧化酶原的激活从而导致寄生蜂在果蝇体内的顺利发育。

4 寄生蜂对寄主免疫信号通路的干扰

除了黑化反应,昆虫的体液免疫还有两条主要的免疫信号传导通路(Toll, IMD)(Ferrandon *et al.*, 2007; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Zou *et al.*, 2011)。其中包括抗菌肽在内的免疫因子的转录表达主要由 Toll 和 IMD 途径控制。Toll 途径是主要应对真菌和革兰氏阳性菌的侵入,是一种持续的反应。上游的模式识别蛋白识别病原体后,通过一个与黑化反应上游类似的丝氨酸蛋白酶级联系统放大,最终引起细胞内抑制因子 Cactus 的磷酸化和降解,从而释放 NF-κB 转录因子 DIF 和 Dorsal 转移到细胞核内启动免疫因子的转录。IMD 途径是急性反应,主要同革兰氏阴性菌有关。IMD 途径的激活会导致另一个 NF-κB 转录因子 Relish 自身的抑制结构域被切割,进而 Rel-homology 结构域进入细胞核诱导抗菌肽表达。

一旦入侵信号被昆虫的模式识别蛋白识别后,昆虫体内的天然免疫反应被迅速激发继而产生效应分子以清除外源物。寄生蜂对于寄主体液免疫反应的破坏首先集中体现在对 Toll 途径上游模式识别蛋白的基因发生差异表达(Wertheim *et al.*, 2005)。C 型凝集素是一类含有糖识别结构域的钙依赖性糖结合蛋白,当菜粉蝶 *P. rapae* 在蝶蛹金小蜂 *P. puparum* 的寄生调控下,其体内的

凝集素降低(Fang *et al.*,2011)。寄生蜂卵进入寄主体内也会引起免疫效应分子比如抗菌肽基因的过量表达(Wertheim *et al.*,2005)。如毁侧沟茧蜂 *M. demolitor* 的 PDV 的产物 Ank-H4 和 N5 蛋白包含 IκB 结构域由 Ankyrin 重复序列组成但缺少磷酸化和泛素化位点(Thoetkiattikul *et al.*,2005);H4 和 N5 能够直接和昆虫 NF-κB 因子 DIF,Dorsal 和 Relish 的同二聚体相结合,显著降低抗菌肽的表达从而抑制 Toll 和 IMD 途径的免疫激活功能(Bitra *et al.*,2011)。含 IκB 结构域的同源基因在其他寄生蜂的 PDV 中也有发现并具备相似功能,说明 PDV 对于寄主免疫信号传导机制调控作用的机理有共性(Falabella *et al.*, 2007; Magkrioti *et al.*,2011)。小菜蛾绒茧蜂 *Cotesia plutellae* PDV 的 IκB 基因的表达能够降低菜蛾 *P. xylostella* 对杆状病毒的抵抗力(Bae and Kim,2009)。

5　寄生蜂自身免疫系统的激活和进化

寄生蜂在寄生过程中要对抗寄主免疫系统的攻击,同时羽化后的成虫要面对复杂的自然环境。目前关于寄生蜂的研究主要集中在寄生蜂寄生后如何抑制寄主的免疫系统,在幼蜂发育过程中,寄生蜂必须维持一定的免疫能力,保证其在寄主体内或体表正常发育。如扁头泥蜂 *A. compressa* 幼虫能分泌混合的抗菌物使其在肮脏生存环境中生长的寄主美洲大蠊体内保持健康生长(Herzner *et al.*,2013),但这对于寄主免疫力的影响还有待研究。

在意大利蜜蜂的基因组中发现其免疫分子大约只有其他物种的三分之一(Evans *et al.*,2006; Zou *et al.*,2007),而丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 的测序计划完成后(Werren *et al.*,2010),科学家发现了 400 多种可能的免疫分子,初步证明寄生蜂拥有完备的免疫系统(Tian *et al.*,2010;Brucker *et al.*,2012)。在已知的毒液蛋白中存在大量在序列上与免疫基因相似的分子,其中包括丝氨酸蛋白酶、酚氧化酶原和丝氨酸蛋白酶抑制剂。这些分子在进化上和功能上和已知免疫分子的关系是未来值得关注的问题。

6　展望

寄生蜂是治理许多农林生态系统害虫可利用的天敌资源,在生物防治中起着重要的作用。在害虫对杀虫剂产生抗性加剧的形势下,寄生蜂在传统的生物防治中所起到的作用得到充分的认可(陈学新,2010;李建成等,2010)。因此,深入研究寄生蜂对寄生免疫和生理生化调控的分子机理将会对更好的利用天敌昆虫控制农业害虫提供理论基础。

基于组学的寄生蜂与寄主免疫的相互作用分析是当前昆虫免疫学发展的一个研究前沿。目前研究越来越集中于模式生物体系,尤其以黑腹果蝇 *D. melanogaster* 和匙胸瘿蜂 *L. boulardi* 以及反颚茧蜂 *A. tabida* 相互作用的研究近年来十分活跃,涉及细胞和体液免疫的各个层面,并产生新的领域,如果蝇在面临寄生蜂攻击的时候,在产卵时会产生趋利避害的行为(Kacsoh *et al.*,2013),从而有可能发展昆虫行为免疫学领域(Dukas, 2008);又如,在金小蜂基因组测序完成后,寄生蜂和寄主相互作用的研究已经进入后基因组时代。

目前有关寄生蜂与寄主免疫相互作用的生化和分子调控机制探索越来越系统和深入,这些研究同以前相比前进了一大步,未来的研究将更加关注以下三个方面:第一,目前对于毒液和 PDV 的研究,仅仅揭示了少数基因的分子机制,更多的只停留在细胞和形态描述的水平上。未来将更多的利用功能基因组学和蛋白质组学等手段对此加以系统性的研究。第二,由于寄生蜂的种类繁多并且进化关系复杂,存在着种间竞争,而寄主的免疫体系又各有不同。尽管目前已经有了协同防治的实践,但还没有总结出一个统一的分子机制能够对害虫进行广谱的防治。因此,有必要利用分子生物学技术揭示特定寄生因子和寄主免疫系统的对应关系。第三,寄生蜂自身应对外源生物胁迫因子的免疫力对于其在生态系统中稳定维持至关重要,但是目前该领域还是空白。下一步研究的重点将是深入解析寄生蜂的免疫途径并且通过比较基因组学分析其与其它模式昆虫的保守程度和差异性;同时揭示免疫基因特别是黑化反应基因与寄生因子在进化和功能上的关系。显然,随着寄生蜂和寄主相互作用研究的不断深入和加强,这些问题将不断被揭示和阐释,这不仅将为开辟害虫生物防治新途径提供理论基础,而且将会对寄生蜂在生物防治的实践起到指导作用。

参考文献(References)

Amaya KE, Asgari S, Jung R, Hongskula M, Beckage NE, 2005. Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. *J. Insect Physiol.*, 51(5):505 – 512.

Asgari S, Rivers DB, 2011. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 56:313 – 335.

Asgari S, Zareie R, Zhang G, Schmidt O, 2003a. Isolation and characterization of a novel venom protein from an endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 53(2):92 – 100.

Asgari S, Zhang G, Zareie R, Schmidt O, 2003b. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(10):1017 – 1024.

Bae S, Kim Y, 2009. IkB genes encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 102(1):79 – 87.

Beck MH, Strand MR, 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *PNAS*, 104(49):19267 – 19272.

Bitra K, Zhang S, Strand MR, 2011. Transcriptomic profiling of Microplitis demolitor bracovirus reveals host, tissue and stage-specific patterns of activity. *J. Gen. Virol.*, 92(Pt 9):2060 – 2071.

Brucker RM, Funkhouser LJ, Setia S, Pauly R, Bordenstein SR, 2012. Insect Innate Immunity Database (IIID): an annotation tool for identifying immune genes in insect genomes. *PLoS ONE*, 7(9):e45125.

Cerenius L, Lee BL, Soderhall K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, 29(6):263 – 271.

Chen YF, Gao F, Ye XQ, Wei SJ, Shi M, Zheng HJ, Chen XX, 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology*, 414(1):42 – 50.

Colinet D, Cazes D, Belghazi M, Gatti JL, Poirie M, 2011. Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *J. Biol. Chem.*, 286(46):40110 – 40121.

Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen JM, Poirie M, 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila phenoloxidase* cascade. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(5):681 – 689.

Crozatier M, Ubeda JM, Vincent A, Meister M, 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol.*, 2(8): E196.

Doucet D, Beliveau C, Dowling A, Simard J, Feng Q, Krell PJ, Cusson M, 2008. Prophenoloxidases 1 and 2 from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: molecular cloning and assessment of transcriptional regulation by a polydnavirus. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 67(4):188 – 201.

Dukas R, 2008. Evolutionary biology of insect learning. *Annu. Rev. Entomol.*, 53:145 – 160.

Eggleton P, Belshaw R, 1992. Insect parasitoids-an evolutionary overview. *Philos. T Roy. Soc. B*, 337 (1279):1 – 20.

Etebari K, Hussain M, Asgari S, 2012. Suppression of scavenger receptors transcription by parasitoid factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 38(4):517 – 524.

Etebari K, Palfreyman RW, Schlipalius D, Nielsen LK, Glatz RV, Asgari S, 2011. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. *BMC Genom.*, 12:446.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5):645 – 656.

Falabella P, Varricchio P, Provost B, Espagne E, Ferrarese R, Grimaldi A, de Eguileor M, Fimiani G, Ursini MV, Malva C, Drezen JM, Pennacchio F, 2007. Characterization of the IkappaB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt1):92 – 104.

Fang Q, Wang F, Gatehouse JA, Gatehouse AM, Chen XX, Hu C, Ye GY, 2011. Venom of parasitoid, *Pteromalus puparum*, suppresses host, *Pieris rapae*, immune promotion by decreasing host C-type lectin gene expression. *PLoS ONE*, 6(10):e26888.

Fang Q, Wang L, Zhu J, Li Y, Song Q, Stanley DW, Akhtar ZR, Ye G, 2010. Expression of immune-response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from an endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *BMC Genom.*, 11: 484.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA, 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev.*

Immunol., 7(11):862 – 874.

Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramirez G, Schwaeble W, Ferreira A, 2004. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol. Immunol.*, 40(17):1279 – 1291.

Herzner G, Schlecht A, Dollhofer V, Parzefall C, Harrar K, Kreuzer A, Pilsl L, Ruther J, 2013. Larvae of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* sanitize their host, the American cockroach, with a blend of antimicrobials. *PNAS*, 110(4):1369 – 1374.

Howell L, Sampson CJ, Xavier MJ, Bolukbasi E, Heck MM, Williams MJ, 2012. A directed miniscreen for genes involved in the *Drosophila* anti-parasitoid immune response. *Immunogenetics*, 64(2):155 – 161.

Kacsoh BZ, Lynch ZR, Mortimer NT, Schlenke TA, 2013. Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*, 339(6122):947 – 950.

Kanost MR, Jiang H, Yu XQ, 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.*, 198:97 – 105.

Kohler LJ, Carton Y, Mastore M, Nappi AJ, 2007. Parasite suppression of the oxidations of eumelanin precursors in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 66(2):64 – 75.

Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, Grangeia A, Huguet E, Drezen JM, Poirie M, 2005. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(2):93 – 103.

Lanzrein B, Pfister-Wilhelm R, Wyler T, Trenczek T, Stettler P, 1998. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.*, 44(9):817 – 831.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10):1295 – 1309.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25:697 – 743.

Libersat F, Delago A, Gal R, 2009. Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. *Annu. Rev. Entomol.*, 54:189 – 207.

Lu Z, Beck MH, Strand MR, 2010. Egf1.5 is a second phenoloxidase cascade inhibitor encoded by *Microplitis demolitor* bracovirus. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(7):497 – 505.

Lu Z, Beck MH, Wang Y, Jiang H, Strand MR, 2008. The viral protein Egf1.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 283(31):21325 – 21333.

Magkrioti C, Iatrou K, Labropoulou V, 2011. Differential inhibition of BmRelish1-dependent transcription in lepidopteran cells by bracovirus ankyrin-repeat proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(12):993 – 1002.

Mahadav A, Gerling D, Gottlieb Y, Czosnek H, Ghanim M, 2008. Parasitization by the wasp *Eretmocerus mundus* induces transcription of genes related to immune response and symbiotic bacteria proliferation in the whitefly *Bemisia tabaci*. *BMC Gen.*, 9:342.

Parkinson NM, Conyers C, Keen J, MacNicoll A, Smith I, Audsley N, Weaver R, 2004. Towards a comprehensive view of the primary structure of venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(6):565 – 571.

Parkinson NM, Weaver RJ, 1999. Noxious components of venom from the pupa-specific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. *J. Invertebr. Pathol.*, 73(1):74 – 83.

Pennacchio F, Strand MR, 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 51:233 – 258.

Pruijssers AJ, Falabella P, Eum JH, Pennacchio F, Brown MR, Strand MR, 2009. Infection by a symbiotic polydnavirus induces wasting and inhibits metamorphosis of the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Exp. Biol.*, 212(18):2998 – 3006.

Sampson CJ, Valanne S, Fauvarque MO, Hultmark D, Ramet M, Williams MJ, 2012. The RhoGEF Zizimin-related acts in the *Drosophila* cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Dev. Comp. Immunol.*, 38(1):160 – 168.

Strand MR, Burke GR, 2012. Polydnaviruses as symbionts and gene delivery systems. *PLoS Pathog.*, 8(7):e1002757.

Thoetkiattikul H, Beck MH, Strand MR, 2005. Inhibitor kappa B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF-kappa B activation and suppress the insect immune response. *PNAS*, 102(32):11426 – 11431.

Thomas P, Yamada R, Johnson KN, Asgari S, 2010. Ectopic expression of an endoparasitic wasp venom protein in *Drosophila melanogaster* affects immune function, larval development and oviposition. *Insect Mol. Biol.*, 19(4):473 – 480.

Tian CH, Gao B, Fang Q, Ye GY, Zhu SY, 2010. Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. *BMC Genomics*, 11:187.

Vincent B, Kaeslin M, Roth T, Heller M, Poulain J, Cousserans F, Schaller J, Poirie M, Lanzrein B, Drezen JM, Moreau SJ, 2010. The venom composition of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* resolved by combined expressed sequence tags analysis and proteomic approach. *BMC Gen.*, 11:693.

Webb BA, Strand MR, Dickey SE, Beck MH, Hilgarth RS, Barney WE, Kadash K, Kroemer JA, Lindstrom KG, Rattanadechakul W, Shelby KS, Thoetkiattikul H, Turnbull MW, Witherell RA, 2006. Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology*, 347(1):160 – 174.

Werren JH, Richards S, Desjardins CA, Niehuis O, Gadau J, Colbourne JK, The Nasonia Genome Working Group, 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 327(5963):343 – 348.

Wertheim B, Kraaijeveld AR, Schuster E, Blanc E, Hopkins M, Pletcher SD, Strand MR, Partridge L, Godfray HC, 2005. Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. *Gen. Biol.*, 6(11):R94.

Whitfield JB, 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 43:129 – 151.

Williams MJ, Ando I, Hultmark D, 2005. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells*, 10(8):813 – 823.

Zhang G, Lu ZQ, Jiang H, Asgari S, 2004. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(5):477 – 483.

Zhang G, Schmidt O, Asgari S, 2006. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(9):756 – 764.

Zou Z, Evans JD, Lu Z, Zhao P, Williams M, Sumathipala N, Hetru C, Hultmark D, Jiang H, 2007. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Gen. Biol.*, 8(8):R177.

Zou Z, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *J. Biol. Chem.*, 280(14):14341 – 14348.

Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, Bian G, Kokoza V, Raikhel AS, 2008. Mosquito RUNX4 in the immune regulation of PPO gene expression and its effect on avian malaria parasite infection. *PNAS*, 105(47):18454 – 18459.

Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, Kokoza V, Raikhel AS, 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 32(1):41 – 53.

Zou Z, Souza-Neto J, Xi Z, Kokoza V, Shin SW, Dimopoulos G, Raikhel A, 2011. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. *PLoS Pathog.*, 7(11):e1002394.

陈学新, 2010. 21 世纪我国害虫生物防治研究的进展、问题与展望. 昆虫知识, 47(4):615 – 625.

李建成, 路子云, 屈振刚, 刘文旭, 2010. 中红侧沟茧蜂研究及应用进展. 河北农业科学, 14(8):4 – 11.

朱家颖, 叶恭银, 胡萃, 2008. 寄生蜂调控寄主分子机制的研究进展. 植物保护学报, 35(6):563 – 568.