



蚊媒传染病的遗传控制和共生控制*

崔春来^{1,2**} 陈晶晶^{1,2**} 王四宝^{2***}

(1. 中国科学院大学, 北京 100049; 2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要 蚊虫是疟疾和登革热等多种疾病的传播媒介, 媒介控制是阻断虫媒传染病的重要措施。当前对媒介的控制主要依赖于化学杀虫剂, 但蚊虫已对杀虫剂产生了普遍抗性, 加上疟原虫等耐药性问题的出现和抗疟疫苗的缺乏, 急需发展新的方法和策略用于蚊媒传染病的防控。蚊子中肠是疟原虫等病原体在蚊虫体内发育的最大屏障, 是阻断疾病传播的理想靶点。基于转基因蚊的遗传控制和转基因共生菌的共生控制是降低媒介效能和阻断疾病传播的两个有前景的新策略。遗传控制是直接以媒介昆虫作为遗传操作对象, 通过表达抗病效应分子来阻断疾病的传播; 转基因共生菌防治则是以共生微生物作为遗传改造的对象, 在宿主体内表达抗病效应分子以达到阻断疾病传播的目的。本文对这些新防治方法的现状及应用进展进行综述, 并讨论遗传控制和共生控制在蚊媒传染病防治的实际应用中面临的问题。

关键词 蚊虫, 媒介传染病, 遗传修饰, 共生微生物, 阻断传播

Genetic control and paratransgenesis of mosquito-borne diseases

CUI Chun-Lai^{1,2**} CHEN Jing-Jing^{1,2**} WANG Si-Bao^{2***}

(1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Key Laboratory of Insect Development and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract Mosquitoes are vectors of major infectious diseases such as malaria, dengue fever, etc. Mosquito control is the key to block the spread of the diseases. Continuous emergence of mosquito insecticide resistance and parasite drug resistance, combined with the lack of an effective malaria vaccine severely limits our ability to contain this intolerable burden. New weapons to fight the diseases are urgently needed. Successful development of the disease pathogens in vector mosquito is requirement for transmission to occur. In the mosquito, only a small proportion of the pathogens (malaria parasite, etc.) survive in the midgut lumen. Thus, the severe bottleneck in the mosquito makes midgut a prime target for blocking transmission of the diseases. Mosquito transgenesis and paratransgenesis have been considered as the two promising novel control strategies that aim at interrupting transmission of the diseases. Mosquito transgenesis is direct genetic modification of the mosquito itself for production of anti-mosquito or anti-pathogen effector molecules. Conversely, paratransgenesis involves the genetic engineering of mosquito symbionts for delivery of the effector molecules in mosquito. Here we summarize the progress of both genetic manipulation strategies for control of the mosquito-borne diseases, and also discuss challenges for the translation of laboratory findings to practical applications.

Key words mosquito, vector-borne disease, genetic engineering, symbiotic microbes, blocking transmission

蚊媒传染病是以蚊虫为媒介进行传播的自 然疫源性疾, 主要包括疟疾、登革热、流行性

* 资助项目 Supported projects: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB11010500); 国家自然科学基金 (31472044); 上海市浦江人才科研计划项目 (14PJ1410200)

**第一作者 First author, E-mail: clcui@sibs.ac.cn; jjchen@sibs.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: sbwang@sibs.ac.cn

收稿日期 Received: 2015-08-28, 接受日期 Accepted: 2015-09-06

乙型脑炎、西尼罗热、丝虫病、黄热病等, 每年罹患蚊媒传染病的病例就达 7 亿多。疟疾是这些蚊媒传染病中致死率最高的疾病之一, 全世界每年约有 3~5 亿人感染疟疾, 死亡人数近百万, 与艾滋病和结核病并称全球三大公共卫生疾病 (Vitoria *et al.*, 2009)。蚊虫作为疾病传播的重要媒介, 是蚊媒传染病控制的重点。目前对蚊虫的控制主要依赖于化学杀虫剂, 但随着杀虫剂大量和不合理的使用, 导致蚊虫对杀虫剂的抗性在全球迅速蔓延, 严重阻碍蚊媒传染病的防治和消除 (Hemingway *et al.*, 2002; Awolola *et al.*, 2005)。同时, 疟原虫耐药性问题的出现和抗疟疫苗的缺乏, 种种问题令已取得的脆弱成果岌岌可危。因此, 迫切需要发展新的方法和策略用于蚊媒传染病的防控 (Trape *et al.*, 2011; Lefevre *et al.*, 2013)。随着分子生物学和基因工程技术的发展以及对肠道微生物的日益了解, 为蚊媒传染病的控制提供了新的思路。其中, 基于控制媒介种群数量和降低媒介传播效能的转基因蚊与转基因共生菌防治方法已经成为人们研究的热点之一 (Catteruccia *et al.*, 2000; Grossman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Wang and Jacobs-Lorena, 2013)。本文对这些新防治方法的现状及应用进展进行综述, 并讨论遗传控制和共生控制在蚊媒传染病防治的实际应用中需要解决的问题。

1 遗传控制

蚊媒传染病的遗传控制是通过释放经物理、化学或遗传修饰等手段获得的不育雄蚊或转基因蚊虫与自然种群交配后导致雌性不育、后代蚊虫发育异常或媒介效能降低, 减少媒介蚊虫数量或抑制病原在媒介昆虫体内的发育, 达到阻断疾病的传播。遗传调控具有靶标专一、种类特异和环境友好等特点, 已在蚊虫和蚊媒传染病的控制中显示出诱人的应用前景。基于种群控制的作用方式, 遗传控制的策略可分为种群抑制 (Population suppression) 和种群替代 (Population replacement) 两种。

1.1 种群抑制

种群抑制的目的与使用化学杀虫剂相似, 即

减少某一区域内或某一目标种群中蚊虫的数量。常用的方法有基于物理或化学手段处理的传统昆虫不育技术 (Sterile insect technology, SIT)

(Knippling, 1959; Benedict and Robinson, 2003) 和基于遗传修饰携带致死基因或抗病效应分子的昆虫转基因技术 (Release of insects with a dominant lethal, RIDL) (Thomas *et al.*, 2000; Alphey, 2002)。

1.1.1 昆虫不育技术 昆虫不育技术是最早将遗传学原理引入害虫种群遗传控制的技术, 其首先通过电离辐射或其他方式处理导致雄性昆虫不育, 然后释放大量不育雄蚊到自然环境中与野生雌性交配, 产下的卵因不能发育导致蚊虫后代的减少 (Knippling, 1955)。传统的电离辐射处理会同时损伤昆虫的生殖细胞和体细胞, 使得不育昆虫的生存能力和交配竞争力下降, 严重影响其适合度。蚊虫辐射不育技术的研究始于 20 世纪 50 年代初, 并于 70 年代进行了较大规模的防治试验, 但传统的 SIT 技术在蚊虫种群控制中效果不明显, 难以进行大规模应用。

随着蚊虫分子生物学和转基因技术的发展, 通过遗传手段培育不育蚊虫或抗病蚊虫已成为研究的热点。Thailayil 等 (2011) 通过向冈比亚按蚊胚胎中注射双链 RNA 干扰 *zpg* (Zero population growth) 基因, 获得不产精子但具有正常副性腺的转基因不育雄蚊, 该雄蚊能够与野生型雌蚊正常交配, 交配后的雌蚊也表现出与经历正常交配的雌蚊相同的行为学改变, 如终生不再交配, 交配过的雌蚊在嗜血后可产生大量未经受精的卵。因此, 该方法具有抑制种群数量的潜力。

1.1.2 释放携带显性致死基因的昆虫 释放携带显性致死基因昆虫 (Release of insects with a dominant lethal, RIDL) 的方法由 Thomas 等 (2000) 首次提出与传统的昆虫不育技术不同, RIDL 是通过转基因技术将显性致死因子整合到昆虫染色体上, 致死因子的表达受到四环素调控系统的控制 (Tetracycline, Tet)。该系统由四环素抑制性调控激活因子 (Tetracycline-repressible transcriptional activator, tTA)、四环素耐药操纵子的操纵基因序列 (tetO) 和 tetO 下游

显性致死基因组成。当四环素存在时, tTA 与四环素结合, 而不与 tetO 结合, 致死基因不启动, 携带致死基因的昆虫能够正常存活。当四环素缺乏时, tTA 与 tetO 结合启动致死基因的表达, 导致昆虫死亡。人工饲养时可通过添加四环素来抑制致死基因的表达, 当释放携带显性致死因子的蚊虫与野外蚊虫交配后, 由于缺乏四环素导致致死因子在后代中表达, 造成后代种群数量减少 (Alphey, 2002)。一种延迟型 RIDL 品系在埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)中构建成功, 通过释放该品系的雄性埃及伊蚊的现场试验也取得较好的效果 (Phuc *et al.*, 2007)。携带显性致死因子 OX513A 的转基因纯合雄性埃及伊蚊与野生雌蚊交配后, OX513A 在幼虫晚期或蛹早期表达, 导致后代在发育至成蚊之前死亡。由于 OX513A 转基因雄蚊在飞行能力、取食能力和交配能力上与野生蚊虫没有差异, 因此通过持续释放 OX513A 转基因雄蚊, 就可以显著降低靶标蚊虫 (Lacroix *et al.*, 2012; Massonnet-Bruneel *et al.*, 2013)。但在实际应用时, 该方法需要释放大量的蚊虫方能达到减少种群数量的目的, 防治成本较高, 在实际应用中受到一定的限制。

雌蚊是疾病传播的真正媒介, 雌蚊的控制是阻断疾病传播的关键。为此, 科学家研究出一种专一杀死雌虫的方法, 称为携带雌性特异性显性致死基因系统 (Release of insects carrying a female-specific dominant lethal genetic system, fsRIDL)。释放的转基因雄蚊与野外雌虫交配后, 产生的雌性子代由于携带雌性特异表达的显性致死基因而死亡, 雌性显性致死因子就可以通过存活下来的雄虫扩散到野外种群中 (Fu *et al.*, 2007; Alphey *et al.*, 2010)。Fu 等 (2010) 发现在埃及伊蚊的间接飞行肌中 *Actin-4* 基因表达量在雌蚊中远高于雄蚊, 这是由于该基因启动子区转录产物在两性间的不同剪切方式导致雄蚊转录产物的 5'端非翻译区比雌蚊多 244 个核苷酸; 结合 *Actin-4* 基因的剪切特性和基于可受四环素抑制的反式激活子 (tTA) 的 “tet-off” 基因表达系统构建了 *AcAct4-tTA* 载体 (OX3545、OX3604), 通过显微注射胚胎所获得转基因蚊

中仅雌蚊在特定时间和特异组织中表达 tTA, 而雄蚊几乎不表达 tTA; 在转基因蚊系 OX3604C 中, 当用不含四环素饲料喂养时, 出现雌性特异的无翅表型 (99%~100%), 雄蚊中仅有约 3.2% 无翅, 而当饲料中含四环素时, 仅 0.3% 雌蚊表现为无翅, 由于无翅雌蚊无法完成吸血、交配和产卵等过程, 因此可视为是致死表型。由此可推测, 在自然环境中因缺乏四环素, 释放转基因雄蚊与野生型雌蚊交配后产生的后代雌蚊因无翅而“致死”, 因此这种方法具有抑制种群数量的潜力。与传统的 SIT 相比, fsRIDL 系统特异针对雌虫, 释放前无须对雌雄进行分离, 可直接将转基因蚊卵释放于孳生地, 从而减少饲养成本。

近年来, 科学家也研究出其它条件性种群抑制的方法。Windbichler 等 (2007) 发现在冈比亚按蚊的 Sua 4.0 细胞系中归巢核酸内切酶 I-PpoI 特异性地识别并剪切核糖体 rDNA 重复序列, 导致核仁破碎以及细胞死亡。通过向冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)胚胎中注射含有 I-PpoI 基因的转化载体获得表达 I-PpoI 的转基因蚊, 杂合转基因雄蚊的精巢在精子发生时表达 I-PpoI, I-PpoI 能识别 X 染色体上多拷贝 rDNA 位点, 导致形成精子时对 Y 染色体具有偏好性, 转基因雄蚊产生的精子中约 88% 为含 Y 染色体的精子。由于所有的精子中都含有归巢核酸内切酶 I-PpoI, 致使精子与正常卵子结合时 I-PpoI 可破坏来自卵子的 X 染色体。因此, 当转基因雄蚊与野生型雌蚊交配时所产胚胎均发生胚胎早期死亡; 而当转基因雌蚊与野生型雄蚊交配时, 后代的雌雄比例和存活率与野生型无异。在实验室蚊笼实验中, 转基因雄蚊与野生型雄蚊交配竞争力无明显差异, 说明这种遗传修饰不影响雄蚊交配能力。因此, 在一定区域内, 通过释放这种遗传修饰雄蚊来抑制种群数量是可行的 (Windbichler *et al.*, 2008)。

SIT 和 RIDL 均需长期、多次的对目标种群进行干预, 一旦干预措施停止, 野生型种群数量将迅速反弹, 其效应也将停止。此外, SIT 和 RIDL 都是针对某一特定种群进行设计的, 对某个小面积区域内单一种群可能会有理想的控制

效果,但在复合媒介地区应用时将受到限制。一个地区往往存在多种或不同亚种的媒介蚊虫,如果一种蚊虫的种群暂时被抑制,其空置的生态位很快就会被其他种类或亚种的蚊虫占居,导致疟疾媒介的种群密度不能长期被抑制,这也是种群抑制策略一直没有大范围成功应用案例的主要原因之一。

1.2 种群替代

由于种群抑制策略在蚊虫的长期防治中效果有限,为此科学家提出种群替代的策略。与种群抑制策略的目的不同,种群替代是通过转基因方法将抗病效应因子导入蚊虫体内以期获得不易感病的蚊虫,然后使用这种蚊虫去替换野生型易感种群,通过降低蚊体携带病原体的能力来控制蚊虫的媒介效能,以达到抑制疾病传播的目的 (Ito *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004)。Kidwell 和 Ribeiro (1992) 首次提出了培育抗疟冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的设想,即将抗疟基因导入冈比亚按蚊,通过释放转基因雄蚊与野生雌蚊交配,使抗疟基因在自然种群中逐渐遗传扩散,转基因的抗疟蚊群逐步替代自然易感蚊群,从而达到抑制疟疾传播的目的。种群替代策略的核心要素主要包括两个:一是毒杀或抑制病原体发育的抗病效应分子,二是效应分子在目标蚊群中遗传扩散的驱动系统 (Genetic drive)。

抗病效应分子在提高蚊虫抗病原感染的同时,不应影响蚊虫的适合度。目前研究较多的种群遗传替代策略是围绕传疟媒介按蚊开展的,依照抗疟效应分子的作用机制可以将其大致分为以下四类。

1) 毒杀疟原虫。包括昆虫先天免疫系统抗菌肽分子,如防御素 (Kokoza *et al.*, 2010)、gambicin (Vizioli *et al.*, 2001) 和天蚕素 (Kim *et al.*, 2004),以及能裂解疟原虫但对宿主无影响的外源多肽,如蝎毒活性肽 (Conde *et al.*, 2000),血管紧张素 II (Maciel *et al.*, 2008),爪蟾抗菌肽 (Gwadz *et al.*, 1989),以及人工合成的抗疟裂解肽 Shiva-1 和 Shiva-3 (Possani *et al.*, 1998)。

2) 与疟原虫互作并阻断其发育。疟原虫烯醇化酶-血纤维蛋白溶酶原相互作用多肽 EPIP,能够通过抑制血纤维蛋白溶酶原与动合子表面结合来抑制疟原虫侵入按蚊中肠 (Ghosh *et al.*, 2011);表达的单链单克隆抗体 (scFvs) 通过与动合子、子孢子表面蛋白或分泌蛋白结合阻断疟原虫发育或入侵中肠,如 scFv 4B7 能与恶性疟原虫动合子表面蛋白 Pfs25 结合,2A10 能与恶性疟原虫环子孢子蛋白结合 (Powell *et al.*, 1999; Isaacs *et al.*, 2011),抗 Pbs21 单链抗体能与伯氏疟原虫动合子表面主要蛋白 Pbs21 结合 (Yoshida *et al.*, 2001),scFv 1C3 可与恶性疟原虫分泌的几丁质酶 1 结合 (Isaacs *et al.*, 2011)。

3) 与蚊虫中肠或唾液腺上皮细胞互作。包括一个由 12 个氨基酸组成的多肽 SM1,其通过结合按蚊中肠和唾液腺上皮细胞上的相关受体阻止动合子和子孢子的入侵 (Ghosh *et al.*, 2001);mPLA2 是一个磷脂酶 A2 突变体,其可能通过改变中肠上皮细胞膜的性质来抑制动合子入侵 (Zieler *et al.*, 2001)。围食膜 (Peritrophic membrane, PM) 是由中肠上皮细胞分泌的一层无细胞结构的半透膜,主要由几丁质和蛋白质组成,在按蚊吸血后快速合成以包围整个血餐,阻止病原菌与中肠上皮细胞的接触。动合子首先需要穿透围食膜才能入侵中肠上皮细胞 (Shao *et al.*, 2001),几丁质酶前肽能抑制几丁质酶活性从而阻止动合子穿透围食膜 (Bhatnagar *et al.*, 2003)。

4) 调节蚊虫免疫系统。多个实验室已通过转基因手段过表达按蚊免疫相关基因来增强按蚊的抗疟能力。Akt 是胰岛素信号通路的关键组分,过表达 Akt 能够增强斯氏按蚊抵抗疟原虫的侵染 (Corby-Harris *et al.*, 2010)。通过转基因过表达斯氏按蚊 IMD 通路中的转录因子 Rel2,能够增强按蚊抵抗疟原虫和细菌感染的能力 (Dong *et al.*, 2011)。

这些研究成果共同验证了通过对媒介按蚊的基因修饰来抑制疟原虫传播的可行性。但要将这些研究成果推向实际应用,最关键的问题是如何有效地将抗疟效应基因引入野生按蚊群体,这

就要求必须赋予转基因按蚊以一定的竞争优势来替代野生按蚊种群。因此, 种群替代策略需要一种能使目的基因在自然种群中主动扩散的驱动系统 (Genetic drive)。目前比较有前景的技术包括母体效应显性胚胎发育停滞 (Maternal-effect dominant embryonic arrest, MEDEA) 和归巢核酸内切酶基因 (Homing endonuclease gene, HEG) 系统。MEDEA 最早发现于农业害虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst, 携带 MEDEA 基因的亲代所产生的子代中, 不携带 MEDEA 元件的子代会诱发致命性母体效应而导致胚胎死亡, 从而使携带 MEDEA 的子代表现出更高的分离比。MEDEA 系统在果蝇的研究中显示出较好的可行性, 但目前此技术在按蚊中还未尝试, 而且果蝇实验结论显示要达到种群替代效果需要释放比例高达 25% 的转基因个体, 这也将阻碍野外的广泛应用 (Chen *et al.*, 2007)。另一种新报道的技术是 HEG 驱动系统 (Deredec *et al.*, 2011; Windbichler *et al.*, 2011), HEG 编码一种限制性内切酶, 其目标序列通常在基因组中只出现一次, HEG 本身序列插在此目标序列中间, 因此含 HEG 的染色体不会被识别, 只有不含 HEG 的染色体中的目标序列才会被识别而切断, 断裂的染色体又通过同源染色体重组机制使用 HEG 本身序列作为模板去修复染色体。因此, 携带 HEG 的个体经减数分裂后将此等位基因传递给后代的比例会超过孟德尔遗传定律所预测的 50%。在实验中, HEG 在转基因冈比亚按蚊的后代中迅速扩散 (Windbichler *et al.*, 2011)。但在实际应用方面, 目前只有少数品种按蚊可以进行遗传操作。此外, 还要考虑到按蚊易形成种群隔离而影响基因传递效率。

2 共生控制

微生物和昆虫间存在广泛的非致病共生关系, 宿主昆虫为共生菌提供稳定的生境和营养, 共生菌则在昆虫食物消化、营养合成、促进生长发育、生殖调控、提高免疫防御和抗感染过程中扮演重要角色。隐翅虫中的内共生菌可以合成用来防御天敌的化学毒素, 豌豆蚜通过体内共生菌

Buchnera aphidicola 来帮助合成和补充其食物中所缺乏的必需氨基酸等营养物质。蚊虫在长期的进化过程中, 也与体内共生菌建立了密切的共生关系 (Alonso *et al.*, 2011)。成蚊喜产卵于富含细菌的水体中, 水体细菌不仅成为蚊子幼虫的重要食物来源之一, 也在按蚊、伊蚊和库蚊幼虫的食物代谢和营养合成中起重要作用。若在无菌条件下饲养, 幼蚊就无法正常发育。近些年来, 随着现代分子生物学研究方法和技术手段的不断发展和应用, 关于昆虫体内共生菌的研究有了长足的进展, 基于转基因共生菌的虫媒传染病防治得到广泛的关注。

2.1 蚊虫共生菌及其它相关微生物

随着肠道微生物的研究方法和高通量测序技术的不断进步, 按蚊、伊蚊和库蚊等蚊种体内的肠道微生物相继被鉴定出来。其中革兰氏阴性变形菌门和肠杆菌在按蚊体内占绝对优势 (Straif *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011), 伊蚊、热带库蚊中芽孢杆菌特别是蜡状芽孢杆菌占绝对优势 (Luxanani *et al.*, 2001)。在实验室饲养的成蚊体内细菌种群结构与野生按蚊体内相似, 这说明按蚊种群选择性地建立自身菌群结构。一种非致病性细菌, 成团泛生菌被报导是不同蚊子体内的优势共生细菌, 在植物表面和花朵中经常会发现这种细菌的存在 (Andrews and Harris, 2000; Pusey, 2002), 这说明花蜜可能是野生蚊群体内微生物的来源之一, 这为向野生蚊群中引入转基因成团泛菌提供了好的思路和方法。

按蚊吸血 24 h 后, 以革兰氏阴性细菌为主的肠道微生物种群数量会成百上千倍地增殖, 这些细菌不仅会与疟原虫发生营养竞争, 还可以发挥物理屏障作用或产生各种酶、毒素等直接抑制疟原虫的发育; 也可通过激活与疟原虫具有交互作用的按蚊免疫反应, 或改变按蚊的生理代谢从而间接影响疟原虫的发育。如果用抗生素清除肠道细菌, 处理的按蚊会更容易受疟原虫感染 (Dong *et al.*, 2009)。有报道称, 从冈比亚野生按蚊体内分离到一株肠杆菌 Esp_Z, 与感染疟原虫的血液混合饲喂按蚊后, 能显著抑制恶性疟

原虫对按蚊的感染 (Cirimotich *et al.*, 2011)。但最近的研究显示冈比亚按蚊中肠内肠杆菌的丰度与疟原虫感染却显正相关性, 表明某些肠杆菌对恶性疟原虫的自然感染可能起到正面作用 (Boissiere *et al.*, 2012)。

一种 *Asaia* 属细菌 (*Asaia* sp.) 能稳定共生于实验室饲养的斯氏按蚊、野生冈比亚按蚊和埃及伊蚊体内, 并在按蚊中肠、卵巢、雄性生殖腺、唾液腺等多种组织中发现了这种细菌 (Favia *et al.*, 2007)。最近研究发现按蚊感染伯氏疟原虫后, *Asaia* sp. 能发挥免疫调控作用激活按蚊抗菌肽的表达而自身不受抑制, 在疟原虫感染蚊虫的各个发育阶段均能检测到 *Asaia* sp. 的存在 (Capone *et al.*, 2013)。更重要的是 *Asaia* sp. 不仅能从雌性成蚊到下代幼虫的垂直传播, 还能通过雌雄按蚊交配进行水平传播 (Damiani *et al.*, 2008), 这种多种途径传播的特性对于向野外蚊群引入携带抗疟基因的工程菌极为有利, 但在该菌中分泌表达外源蛋白比较困难。

细胞内共生菌沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 能感染多种昆虫及其他节肢动物和线虫, 并能抑制多种病原体的感染和传播。多种蚊子在感染沃尔巴克氏体后, 能够抑制病原体的感染 (Kambris *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010)。在自然条件下, 还未发现沃尔巴克氏体感染按蚊的现象。最近密歇根州立大学奚志勇课题组通过胚胎显微注射技术, 成功地将沃尔巴克氏体引入斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 体内, 并能提高按蚊抗疟能力 (Bian *et al.*, 2013)。研究还显示沃尔巴克氏体感染按蚊后, 能激活按蚊免疫系统, 从而显著抑制疟原虫卵囊形成 (Hughes *et al.*, 2011)。

沃尔巴克氏体经母系遗传, 通过在宿主体内产生细胞质不亲和、孤雌生殖、雌性化及杀雄等多种生殖调控作用, 其中细胞质不亲和作用 (Cytoplasmic incompatibility, CI) 使感染的雌性个体具有很大的生殖优势, 能够使 *Wolbachia* 在宿主种群中迅速扩张, 使种群中受感染昆虫的数量比例增加。当其他母系遗传的转基因微生物与 *Wolbachia* 共转化媒介昆虫时就可以显著增加转化微生物在种群中的频率。这种机制在 *Aedes*

aegypti, *Ae. albopictus*, 和 *Culex quinquefasciatus* 中都有发现 (Sinkins and Gould, 2006)。这说明 *Wolbachia* 内生菌可以作为转化微生物如浓核病毒在蚊媒种群中传播的一个强大的驱动系统。在果蝇中发现的能缩短宿主寿命的 *Wolbachia* 即 wMelPop 已经开始在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 中进行研究应用。近来, 研究者又从白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 中分离到一株类似菌株 wAlbB, 它不仅能促进转基因共生菌在蚊群中的传播, 还能有效地抑制病原体在蚊体内发育 (Bian *et al.*, 2013)。宿主寿命的缩短会显著性地降低媒介传播效能, 因而将缩短宿主生存时间和降低宿主媒介传播能力的这两种方法结合起来将有效地降低媒介传播效能。

多种酵母如 *Candida*, *Pichia caribbica* 和 *Wickerhamomyces anomalus* 也被证实能在蚊虫肠道内共生。其中 *W. anomalus* 在蚊虫发育的各个阶段都有发现, 在冈比亚按蚊和斯氏按蚊的生殖系统中也有共生 (Ricci *et al.*, 2011a, 2011b)。

此外, 病毒也被报道能感染蚊虫。浓核病毒是线性单链病毒, 能在冈比亚按蚊和埃及伊蚊高效表达异源蛋白并进行垂直传播, 感染埃及伊蚊后可以定殖到脂肪体、肌肉和神经 (Ward *et al.*, 2001), 表明浓核病毒是外源基因在蚊虫中表达的一个合适载体。

“共生菌介导的保护”是一种已经通过生态模型预测, 并越来越多地在昆虫的自然种群中观察到的现象。随着蚊媒肠道共生菌和其它相关微生物的相继发现及其与宿主昆虫相互作用机理的了解, 将有助于我们探索利用共生控制策略防治蚊媒传染病。

真菌是昆虫的主要病原体, 自然界中 60% 以上昆虫疾病是由真菌感染引起的。真菌杀虫剂具有类似化学农药触杀特性, 可直接通过穿透体壁致死昆虫。近来大量研究表明, 以球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 为代表的杀蚊真菌在成蚊的生物防治和阻断疟疾、登革热等疾病传播中具有十分广阔的应用前景 (Blanford *et al.*, 2005; Scholte *et al.*,

2005 ; Wang and Leger, 2007 ; Fan *et al.*, 2012)。

2.2 转基因共生菌防治

转基因共生菌防治是遗传改造共生微生物使其在宿主昆虫体内表达效应分子来抑制病原体的发育, 从而切断疾病传播。转基因共生菌防治作为控制虫媒疾病的一种新手段, 已在蚊媒传染病特别是疟疾控制上展示巨大的应用前景

(Abraham and Jacobs-Lorena, 2004 ; Drexler *et al.*, 2008)。按蚊吸血后, 肠道微生物数量会成百上千倍地增殖, 其所表达的重组抗疟蛋白也会相应的增加, 为利用转基因共生菌表达抗疟效应分子来抑制疟原虫发育提供了可靠的依据。转基因共生菌防治要高效地发挥作用, 需要具备以下条件: 首先, 候选共生菌要易于人工培养并能进行遗传改良; 此外, 遗传改良的微生物在宿主体内要能稳定共生并能分泌表达抗病效应分子; 最后, 转基因共生菌在宿主种群中能够有效扩散。

利用转基因共生菌抑制媒介昆虫体内病原体发育的方法最初报道于锥虫病的研究。美洲锥虫病是由嗜血锥蝽 *Rhodnius prolixus* 携带的锥虫属寄生虫引起的一种人兽共患的寄生虫病, 嗜血锥蝽在整个发育过程中以脊椎动物的血为食。*Rhodococcus rhodnii* 是锥蝽体内一种专性革兰氏阳性共生菌, 它能够为宿主提供维生素等重要的营养物质从而弥补宿主完全基于嗜血生存的局限。经遗传工程改造使其表达毒杀克氏锥虫的抗菌肽天蚕素 cecropin A, 能显著缩短克氏锥虫在宿主体内的存活时间 (Durvasula *et al.*, 1997)。此外, 转基因共生菌在锥蝽自然种群传播的试验也证明了转基因共生菌防治作为媒介控制手段的可行性 (Hurwitz *et al.*, 2011)。

利用转基因共生菌控制疟疾的方法首先是在大肠杆菌中重组表达单链免疫毒素得到验证, 随后 SM1 肽段二聚体和磷脂酶 A 也相继在大肠杆菌中被表达, 这些转基因细菌均降低了斯氏按蚊中肠内疟原虫卵囊数量 (Riehle *et al.*, 2007)。但是, 由于实验用大肠杆菌不是蚊子的共生菌, 在蚊子中肠内寄居时间很短, 吸血 3 d 后几乎被排出体外。同时, 由于以上重组抗疟分子在细菌

内形成包涵体或粘附在细菌体表, 限制了这些效应分子的扩散, 导致抗疟效果不太理想。最近, 通过遗传改造按蚊体内一种常见共生细菌——成团泛菌, 并利用大肠杆菌溶血素分泌系统 (HlyA) 成功对多种效应分子进行了高效分泌表达。与对照组相比, 表达 Scorpine 或 (EPIP) 4 的转基因细菌对恶性疟原虫或伯氏疟原虫的卵囊抑制率高达 98% 以上 (Wang *et al.*, 2012)。研究还表明这些转基因共生菌对自身和按蚊的生长发育没有影响。此外, 具有不同抗疟作用机制的效应分子的使用也将极大地降低疟原虫抗性的产生 (Wang *et al.*, 2012)。从大劣按蚊幼虫肠道中分离的一种革兰氏阴性细菌河生肠杆菌 *E. amnigenus* 能够重新定殖于幼虫肠道, 在 *E. amnigenus* 中高表达 cryIVB 基因和 *B. sphaericus* 的毒素基因对 *Ae. aegypti* 和 *Anopheles dirus* 的幼虫产生显著致死效应。此外, 重组质粒在无选择压力的情况下可以在 *E. amnigenus* 中稳定存在高达 23 代之久 (Khampang *et al.*, 1999)。

遗传改造的共生病毒也被证实能有效地影响疟原虫在蚊体内的感染。研究表明, 重组辛德毕斯病毒表达的 scFv 对疟原虫在 *Ae. aegypti* 唾液腺中的感染抑制率高达 96.8% (de Lara Capurro *et al.*, 2000)。但由于辛德毕斯病毒会感染很多其它昆虫和脊椎动物, 因此其在应用上受到限制。

遗传改造的昆虫病原真菌在防治虫媒传染病的研究中也取得了良好的进展。杀蚊绿僵菌通过穿透蚊虫表皮进入血腔, 疟原虫的子孢子须进入血腔后经由血淋巴循环系统入侵唾液腺, 这为利用转基因病原真菌在蚊虫血腔内抑制疟原虫提供了很好的切入点。研究表明, 在转基因绿僵菌中表达的 PfNPNA-1、[SM1]₈ 或 Scorpine 等抗疟效应分子能够显著降低蚊虫唾液腺中疟原虫子孢子的数量 (Fang *et al.*, 2011)。这一研究表明, 转基因绿僵菌将在蚊媒传染病的控制中展现广阔的应用前景。

3 展望

基于杀虫剂的媒介控制策略如杀虫剂浸泡蚊帐及其他种群抑制策略 (SIT 和 RIDL) 都会

造成生态空位的出现,一旦停止使用杀虫剂或蚊子产生抗药性后,蚊子数量就会反弹到最初的水平。利用转基因蚊和转基因共生菌表达抗疟效应分子干扰疟原虫发育是种群替代的有效途径,这两种方法在长期控制效果上具有比种群抑制更大的优势。虽然许多技术问题已经得到解决,但转基因昆虫和转基因共生菌防治在大面积应用之前还有许多问题需要解决。一个突出的问题就是如何有效地将抗病效应基因引入到野生蚊群中。另一个需要考虑的问题是释放转基因生物所涉及的监督管理、伦理道德及公众接受能力等。虽然转基因生物的应用是个受到关注的话题,但对于疾病防治来说,其最终决议需要权衡利弊和风险的比重,一旦这些问题得到综合考虑,其拯救生命的重大意义必然对其实施应用起到一定的推动作用。

需要指出的是,转基因昆虫和转基因共生菌在疾病控制中也不是一个万能的方法,但它们可以作为现有或未来防治措施的重要补充。因此,遗传控制和共生控制与化学杀虫剂等方法相互兼容的。此外,效应蛋白的多样性也使得这些方法不仅适用于疟疾控制,也能应用于其它蚊媒传染病的控制,如登革热和黄热病等。

参考文献 (References)

- Abraham EG, Jacobs-Lorena M, 2004. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 667–671.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodriguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M, 2011. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.*, 8(1): e1000406.
- Alphey L, 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1243–1247.
- Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL, 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10(3): 295–311.
- Andrews JH, Harris RF, 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38: 145–180.
- Awolola TS, Oyewole IO, Amajoh CN, Idowu ET, Ajayi MB, Oduola A, Manafa OU, Ibrahim K, Koekemoer LL, Coetzee M, 2005. Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria. *Acta Trop.*, 95(3): 204–209.
- Benedict MQ, Robinson AS, 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8): 349–355.
- Bhatnagar RK, Arora N, Sachidanand S, Shahabuddin M, Keister D, Chauhan VS, 2003. Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304(4): 783–787.
- Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, Xu Y, Dimopoulos G, Xi Z, 2013. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science*, 340(6133): 748–751.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z, 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.*, 6(4): e1000833.
- Blanford S, Chan BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB, 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science*, 308(5728): 1638–1641.
- Boissiere A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I, 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.*, 8(5): e1002742.
- Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, Crotti E, Epis S, Angeletti M, Valzano M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Mandrioli M, Favia G, 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors*, 6(1): 182.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A, 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature*, 405(6789): 959–962.
- Chen CH, Huang H, Ward CM, Su JT, Schaeffer LV, Guo M, Hay BA, 2007. A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. *Science*, 316(5824): 597–600.
- Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G, 2011. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles*

- gambiae*. *Science*, 332(6031): 855–858.
- Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD, 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *Febs. Letters*, 471(2/3): 165–168.
- Corby-Harris V, Drexler A, Watkins de Jong L, Antonova Y, Pakpour N, Ziegler R, Ramberg F, Lewis EE, Brown JM, Luckhart S, Riehle MA, 2010. Correction: Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS Pathog*, 6(7): e1001003.
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Esposito F, Bandi C, Daffonchio D, Favia G, 2008. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Curr. Biol.*, 18(23): R1087–R1088.
- de Lara Capurro M, Coleman J, Beerntsen BT, Myles KM, Olson KE, Rocha E, Krettli AU, James AA, 2000. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(4): 427–433.
- Deredec A, Godfray HCJ, Burt A, 2011. Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43): E874–E880.
- Dong Y, Das S, Cirimotich C, Souza-Neto JA, McLean KJ, Dimopoulos G, 2011. Engineered anopheles immunity to *Plasmodium* infection. *PLoS Pathog*, 7(12): e1002458.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G, 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*, 5(5): e1000423.
- Drexler AL, Vodovotz Y, Luckhart S, 2008. *Plasmodium* development in the mosquito: biology bottlenecks and opportunities for mathematical modeling. *Trends Parasitol.*, 24(8): 333–336.
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB, 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(7): 3274–3278.
- Fan Y, Borovsky D, Hawkins C, Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, 2012. Exploiting host molecules to augment mycoinsecticide virulence. *Nat. Biotechnol.*, 30(1): 35–37.
- Fang W, Vega-Rodriguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A, St Leger RJ, 2011. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science*, 331(6020): 1074–1077.
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scuppa P, Pasqualini L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Bandi C, Sacchi L, Daffonchio D, 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(21): 9047–9051.
- Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L, 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nat. Biotechnol.*, 25(3): 353–357.
- Fu G, Lees RS, Nimmo D, Aw D, Jin L, Gray P, Berendonk TU, White-Cooper H, Scaife S, Kim PH, Marinotti O, Jasinskiene N, James AA, Alphey L, 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(10): 4550–4554.
- Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M, 2011. *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(41): 17153–17158.
- Ghosh AK, Ribolla PE, Jacobs-Lorena M, 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(23): 13278–13281.
- Grossman GL, Rafferty CS, Clayton JR, Stevens TK, Mukabayire O, Benedict MQ, 2001. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol. Biol.*, 10(6): 597–604.
- Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, Maloy WL, Zasloff M, Miller LH, 1989. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infect. Immun.*, 57(9): 2628–2633.
- Hemingway J, Field L, Vontas J, 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, 298(5591): 96–97.
- Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL, 2011. Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 7(5): e1002043.
- Hurwitz I, Fieck A, Read A, Hillesland H, Klein N, Kang A, Durvasula R, 2011. Paratransgenic control of vector borne diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 7(9): 1334–1344.
- Isaacs AT, Li F, Jasinskiene N, Chen X, Nirmala X, Marinotti O, Vinetz JM, James AA, 2011. Engineered resistance to *Plasmodium falciparum* development in transgenic *Anopheles stephensi*. *PLoS Pathog*, 7(4): e1002017.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M, 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417(6887): 452–455.

- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP, 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326(5949): 134–136.
- Khampang P, Chungjatupornchai W, Luxananil P, Panyim S, 1999. Efficient expression of mosquito-larvicidal proteins in a gram-negative bacterium capable of recolonization in the guts of *Anopheles dirus* larva. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51(1): 79–84.
- Kidwell MG, Ribeiro JMC, 1992. Can transposable elements be used to drive disease refractoriness genes into vector populations. *Parasitology Today*, 8(10): 325–329.
- Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, O'Brochta DA, 2004. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.*, 41(3): 447–455.
- Knipling EF, 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.*, 48(4): 459–462.
- Knipling EF, 1959. Sterile-male method of population control: successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. *Science*, 130(3380): 902–904.
- Kokoza V, Ahmed A, Woon Shin S, Okafor N, Zou Z, Raikhel AS, 2010. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(18): 8111–8116.
- Lacroix R, McKemey AR, Raduan N, Kwee Wee L, Hong Ming W, Guat Ney T, Rahidah AAS, Salman S, Subramaniam S, Nordin O, Hanum ATN, Angamuthu C, Marlina Mansor S, Lees RS, Naish N, Scaife S, Gray P, Labbe G, Beech C, Nimmo D, Alphey L, Vasan SS, Han Lim L, Wasi AN, Murad S, 2012. Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*, 7(8): e42771.
- Lefevre T, Vantaux A, Dabire KR, Mouline K, Cohuet A, 2013. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog*, 9(6): e1003365.
- Luxananil P, Atomi H, Panyim S, Imanaka T, 2001. Isolation of bacterial strains colonizable in mosquito larval guts as novel host cells for mosquito control. *J. Biosci. Bioeng.*, 92(4): 342–345.
- Maciel C, de Oliveira Junior VX, Fázio MA, Nacif-Pimenta R, Miranda A, Pimenta PFP, Capurro ML, 2008. Anti-*Plasmodium* activity of angiotensin II and related synthetic peptides. *PLoS ONE*, 3(9): e3296.
- Massonnet-Bruneel B, Corre-Catelin N, Lacroix R, Lees RS, Hoang KP, Nimmo D, Alphey L, Reiter P, 2013. Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS ONE*, 8(5): e62711.
- Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, Fu GL, Condon KC, Scaife S, Donnelly CA, Coleman PG, White-Cooper H, Alphey L, 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *Bmc Biology*, 5: 11.
- Possani LD, Zurita M, Delepierre M, Hernandez FH, Rodriguez MH, 1998. From noxiustoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Toxicon*, 36(11): 1683–1692.
- Powell JR, Petrarca V, della Torre A, Caccone A, Coluzzi M, 1999. Population structure, speciation, and introgression in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia*, 41(1/3): 101–113.
- Pusey PL, 2002. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Disease*, 86(6): 639–644.
- Ricci I, Damiani C, Scuppa P, Mosca M, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Capone A, Gonella E, Ballarini P, Chouaia B, Sagnon N, Esposito F, Alma A, Mandrioli M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G, 2011a. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Environ. Microbiol.*, 13(4): 911–921.
- Ricci I, Mosca M, Valzano M, Damiani C, Scuppa P, Rossi P, Crotti E, Cappelli A, Ulissi U, Capone A, Esposito F, Alma A, Mandrioli M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G, 2011b. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1): 43–50.
- Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M, 2007. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *Int. J. Parasitol.*, 37(6): 595–603.
- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BG, 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308(5728): 1641–1642.
- Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M, 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem. Physiol.*, 47(2): 119–125.
- Sinkins SP, Gould F, 2006. Gene drive systems for insect disease vectors. *Nature Reviews Genetics*, 7(6): 427–435.
- Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, Toure

- YT, Beier JC, 1998. Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J. Med. Entomol.*, 35(3): 222–226.
- Thailayil J, Magnusson K, Godfray HC, Crisanti A, Catteruccia F, 2011. Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(33): 13677–13681.
- Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS, 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462): 2474–2476.
- Trape JF, Tall A, Diagne N, Ndiath O, Ly AB, Faye J, Dieye-Ba F, Roucher C, Bouganali C, Badiane A, Sarr FD, Mazenot C, Touré-Baldé A, Raoult D, Druilhe P, Mercereau-Puijalon O, Rogier C, Sokhna C, 2011. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(12): 925–932.
- Vitoria M, Granich R, Gilks CF, Gunneberg C, Hosseini M, Were W, Raviglione M, De Cock KM, 2009. The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: current status and future perspectives. *Am. J. Clin. Pathol.*, 131(6): 844–848.
- Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Muller HM, Dimopoulos G, 2001. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(22): 12630–12635.
- Wang C, St Leger RJ, 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nat. Biotechnol.*, 25(12): 1455–1456.
- Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M, 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(31): 12734–12739.
- Wang S, Jacobs-Lorena M, 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquito. *Trends in Biotechnology*, 31(3): 185–193.
- Wang Y, Gilbreath TM, 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J, 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS ONE*, 6(9): e24767.
- Ward TW, Jenkins MS, Afanasiev BN, Edwards M, Duda BA, Suchman E, Jacobs-Lorena M, Beaty BJ, Carlson JO, 2001. *Aedes aegypti* transducing densovirus pathogenesis and expression in *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* larvae. *Insect Mol. Biol.*, 10(5): 397–405.
- Windbichler N, Menichelli M, Papathanos PA, Thyme SB, Li H, Ulge UY, Hovde BT, Baker D, Monnat RJ, Burt A, Crisanti A, 2011. A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. *Nature*, 473(7346): 212–215.
- Windbichler N, Papathanos PA, Catteruccia F, Ranson H, Burt A, Crisanti A, 2007. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. *Nucleic Acids Res.*, 35(17): 5922–5933.
- Windbichler N, Papathanos PA, Crisanti A, 2008. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*, 4(12): e1000291.
- Yoshida S, Ioka D, Matsuoka H, Endo H, Ishii A, 2001. Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 113(1): 89–96.
- Zieler H, Keister DB, Dvorak JA, Ribeiro JM, 2001. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J. Exp. Biol.*, 204(Pt 23): 4157–4167.