口服感染因子: 杆状病毒编码的一种复杂而进化保守的入侵机器

汪习^{1,2}, 刘晓萍^{1,2}, George Alliwa Makalliwa^{1,2}, 李江¹, 王华林¹, 胡志红¹, 王曼丽^{1*}

1. 中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: wangml@wh.iov.cn

收稿日期: 2017-05-20; 接受日期: 2017-06-25; 网络版发表日期: 2017-09-15

中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB11030400)、国家自然科学基金(批准号: 31130058, 31621061)、中国科学院前沿科学重点研究项目(批准号: QYZDJ-SSW-SMC021)和病毒学国家重点实验室病毒学重点前沿科学项目(批准号: klv-2016-03)资助

摘要 杆状病毒是一类特异性感染节肢动物的大DNA病毒, 其感染宿主包括鳞翅目、膜翅目和双翅目的昆虫。在自然界中, 包涵体来源型病毒(ODVs)通过对中肠上皮细胞的感染来起始杆状病毒的初始感染, 这个过程依赖于一类被命名为口服感染因子(PIFs)的ODV囊膜蛋白。有意思的是, 在其他无脊椎动物大DNA病毒中也能发现PIFs同源蛋白, 这意味着口服感染是这些病毒所共有的一种古老而进化上保守的入侵机制。本文综述了各个PIF蛋白的功能研究进展、PIF复合物的发现, 并讨论了无脊椎动物DNA病毒中PIFs的演化关系。最后展望了未来关于口服感染分子机制的研究方向。

关键词 杆状病毒, 口服感染, PIF复合物, 入侵机制, 无脊椎动物病毒

杆状病毒是一类专一性感染昆虫的大DNA病毒。杆状病毒科包含4个属: 即 α -杆状病毒属(感染鳞翅目昆虫的核型多角体病毒)、 β -杆状病毒属(感染鳞翅目昆虫的颗粒体病毒)、 γ -杆状病毒属(感染膜翅目昆虫的核型多角体病毒)和 δ -杆状病毒属(感染双翅目昆虫的核型多角体病毒)。在一个典型的杆状病毒生活史中, 会产生两种不同形态的子代病毒粒子: 即出芽型病毒(budded virus, BV)和包涵体来源型病毒(occlusion-derived virus, ODV)。ODV被包埋在包涵体(occlusion bodies, OBs)中, 从而保护病毒粒子免受外界环境的降解。在自然情况下, 当OBs被昆虫幼虫

摄食后, 在中肠碱性条件下裂解释放出ODV, ODV进入并感染中肠上皮细胞, 这个过程被称为初始感染(primary infection)或者口服感染(*per os* infection或oral infection)。被ODV感染的中肠细胞产生并释放BV而感染昆虫的其他组织, 导致虫体的二次感染(secondary infection)或系统感染(systemic infection)^[1]。

ODV成功触发初始感染很大程度上依赖于一类ODV特有的囊膜蛋白——口服感染因子(*per os* infectivity factors, PIFs)。迄今为止, 报道至少有9种PIFs, 包括P74(PIF0)^[2,3], PIF1^[4], PIF2^[5], PIF3^[6], PIF4^[7], PIF5^[8], PIF6^[9], PIF7(AC110)^[10]和VP91^[11,12]。除了VP91以外, 任

引用格式: 汪习, 刘晓萍, George Alliwa Makalliwa, 等. 口服感染因子: 杆状病毒编码的一种复杂而进化保守的入侵机器. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 917-927, doi: 10.1360/N052017-00165

英文版见: Wang X, Liu X P, Makalliwa G A, et al. *Per os* infectivity factors: a complicated and evolutionarily conserved entry machinery of baculovirus. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 806-815, doi: 10.1007/s11427-017-9127-1

何一个PIF的缺失都会导致口服感染完全丧失, 而不影响感染性BV的产生. 这9个PIFs(P74, PIF1~7和VP91)在目前所有测序的杆状病毒中保守存在. 非常有趣的是, 在其他感染无脊椎动物的大DNA病毒中也可以找到一些PIFs的同源物, 例如, 对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[13]、唾液腺肥大病毒(salivary gland hypertrophy virus, SGHV)^[14]、裸病毒(nudivirus)^[13,15]以及蜜蜂丝状病毒(Apismellifera filamentous virus, AmFV)^[16]. 这些无脊椎动物病毒属于不同的病毒科, 它们的基因组大小以及含量各不相同, 表明口服感染是这些无脊椎动物病毒中存在的一种古老并且进化上保守的病毒入侵机制. 阐释口服感染机制将很大程度上促进广谱性和环境友好型生物农药的发展, 这有利于保护农民的健康以及环境免受化学农药的污染^[17].

最近研究显示, 大部分PIFs在ODV表面形成一个大的蛋白复合物(PIF complex), 这表明各PIF蛋白可能协同介导ODV入侵昆虫中肠上皮细胞的过程, 且提示口服感染是一个非常复杂和专一的病毒入侵机制. 该

综述总结了单个PIF蛋白和PIF复合物的研究进展, 以及讨论了无脊椎动物大DNA病毒的PIFs在进化上的关系.

1 各个口服感染因子的研究进展

PIFs是一类在分子量与氨基酸序列上有着显著差异的ODV囊膜蛋白, 但它们却拥有一些相似的特征. 在PIFs的N端或C端发现有内核膜分选基序(inner nuclear membrane sorting motif, INM-SM)(图1). 这种分选基序是一段由约18个氨基酸组成的疏水性跨膜(transmembrane, TM)结构, 其后还有1个或多个带正电荷的氨基酸. INM-SM在PIFs从胞质转运到内核膜及ODV囊膜这一过程中发挥重要作用^[18]. 此外, 大多数的PIFs都含有保守的半胱氨酸(图1). 这些半胱氨酸可能发挥的作用是形成分子内或分子间二硫键, 从而利于PIFs间的互作进而形成PIF复合物或协助单个PIF折叠形成正确构象. 在2014年, Zhang等人^[19]曾发表关于PIFs的综述, 现在本课题组进一步全面总结关于各个

图1 杆状病毒PIFs的结构示意图

依据杆状病毒PIF同源物的氨基酸序列比对结果绘制了PIF的结构示意图. 蛋白N-末端和C-末端如图所示, 跨膜区用蓝色标识, 保守的半胱氨酸以红色竖线表示, 在AcMNPV中的位置上方标注. PIF6, PIF7和AC108没有保守的半胱氨酸

PIF的功能与结构的进展,这包括增加了对SF58(AC108)的介绍,尽管它在口服感染过程中发挥的功能在两篇报道中阐述的不一致。

1.1 P74(PIF0)

1989年首次报道,敲除苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)中*p74*基因的一部分(编码P74蛋白188~645 aa)后,病毒丧失了通过口服感染方式感染宿主昆虫的能力,但并不影响病毒在细胞系中的复制^[3]。因此,P74是第一个被发现的口服感染因子蛋白,之后被命名为PIF0。*p74*基因是杆状病毒38个核心基因之一,编码一个大小为74 kD且特异性分布于ODV囊膜上的蛋白。P74蛋白通过其C端的跨膜区锚定在ODV囊膜上,其N端暴露在ODV表面(图1和2A)^[2]。P74蛋白N端的6个半胱氨酸在所有杆状病毒P74同源物中高度保守(图1)。在对AcMNPV的研究中发现,P74先后经历两步的剪切事件:第一步剪切发生在ODV从OB中释放的过程中,由OB中包裹的宿主内源性蛋白酶完成剪切,剪切位点推测是在P74蛋白的中间区域^[20]。第二步剪切发生在虫体的中肠,可能由一种未知的来源于中肠上皮细胞的类胰蛋白酶作用产生^[1]。突变分析表明,第196位和199位的精氨酸可能是第二步剪切的作用位点。当把这两处同时突变为谷氨酰胺后,突变体与野生型病毒相比其半数致死剂量(median lethal dose, LD₅₀)提高至少100倍。因此,第二步剪切对于口服感染来说似乎是非常关键^[1]。第一步剪切对于P74功能的发挥是否是必需目前仍不清楚。

关于P74在ODV入侵中肠细胞的作用也有一些相关研究。R18标记的ODV荧光淬灭实验表明,P74参与ODV与宿主中肠细胞吸附的这一过程中^[21]。将ODV用EGFP标记,结合于中肠上皮细胞进行实时荧光追踪,也发现P74对于介导ODV对细胞的结合过程是必需的^[22]。Pull-down实验发现中肠上皮的刷状缘囊膜泡(brush border membrane vesicle, BBMV)中两个大小分别为30和35 kD的蛋白与P74有相互作用^[23,24]。然而迄今为止,ODV入侵中肠上皮细胞的受体仍不清楚。把P74展示到BV囊膜表面,并不能使BV获得口服感染能力,提示P74单独不能成功介导口服感染过程^[25]。将截去C端跨膜区(仅表达1~580 aa)的P74可溶形式的突变体可以拯救*p74*基因缺失的ODV的口服感染能力,这

提示P74的N端对其发挥作用起到了重要作用^[26],有可能是通过N端和其他囊膜蛋白互作从而正确定位到ODV囊膜上。

1.2 PIF1

在2002年,PIF1首先在草地夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*, SpliNPV)中被报道^[4]。一种缺失一段4.5 kb的片段且丧失ODV口服感染活性的突变型病毒被分离得到,进一步实验证明,该片段中的ORF7(*ac119*的同源物)与观察到的这种表型相关。转录分析表明,SpliNPV *pif1*在感染后12 h(h.p.i.)可以检测到转录本,其启动子位于ATG上游的13个核苷酸处^[27]。PIF1约为60 kD,N端具有一个TM结构域和分散在蛋白N端的16个保守的半胱氨酸(图1)。PIF1蛋白的表达量非常低^[27]。PIF1过表达的重组病毒虽然杀伤速度有所提升,但相比野生型病毒,其OB的产量显著减少,并且导致了半数致死浓度(LC₅₀)值比野生型病毒高出10倍^[28]。因此,低丰度的PIF1蛋白对于介导口服感染来说已经足够。PIF1与P74类似,可能介导ODV与中肠细胞的特异性结合^[6]。荧光示踪实验表明,缺失PIF1的ODV仍然能够与柱状细胞结合,然而随后的内化过程受阻^[22]。

1.3 PIF2

对甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus*, SeMNPV)的全基因组诱变筛选鉴定到了*pif2*^[5]。PIF2约为44 kD,与PIF1类似,PIF2同样具有一个N-末端TM结构域和12个保守的半胱氨酸(图1)。棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa amigera nucleopolyhedrovirus*, HearNPV)的PIF2(HA132)同样被证明参与口服感染。*pif2(ha132)*的转录本可以在24 h.p.i.检测到,36 h.p.i.能够检测到蛋白表达^[29]。与PIF1类似,R18荧光标记的ODV体内感染实验表明PIF2可能参与ODV与中肠细胞的结合^[6];而另一项研究表明,缺失*pif2*的EGFP标记的ODVs能够结合中肠细胞,但不能进入这些细胞^[22]。

1.4 PIF3

1997年,通过筛选家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)突变体文库,*bm95(ac115*的同源物)首次被鉴定参与口服感染^[30]。

直到2005年, 在AcMNPV PIFs的功能研究中正式提出了*pif3(ac115)*. PIF3的分子量(~23 kD)小于上述3种先前鉴定的PIFs. PIF3包含N-末端TM结构域和12个保守的半胱氨酸(图1). 然而, TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)的拓扑结构预测表明, PIF3位于ODV囊膜的內表面. 时相分析表明, HearNPV的*pif3*的转录本可以在12 h.p.i检测到, 蛋白表达可以在36 h.p.i检测到^[31]. AcMNPV PIF3的N末端21 aa疏水序列被证明是INM-SM, 是口服感染所必需的^[31]. 与P74, PIF1和PIF2不同, PIF3可能不会在ODV对中肠细胞的特异性结合或者膜融合过程中发挥作用. 推测它可能参与口服感染早期的某一关键事件^[6]. HearNPV PIF3的突变分析显示, 某些保守的半胱氨酸(C162和C185)对于PIF3整合到ODV囊膜和ODV的口服感染性至关重要^[32]. 使用一种能够破坏围食膜(peritrophic membrane, PM)的荧光增白剂(calcofluor

white)进行生物测定. 结果表明, PIF3, P74, PIF1和PIF2均没有靶向PM, 最有可能在初始感染的过程中直接靶向上皮细胞^[33].

1.5 PIF4

Fang等人^[7]2009年研究表明, 缺失*ac96*的AcMNPV不能感染中肠上皮细胞, 由此鉴定出*pif4*. PIF4的大小约为20 kD, 在N-端有一个TM结构域, 含有2个保守的半胱氨酸(图1). 与PIF3相似, PIF4也预测位于ODV囊膜内侧(图2A). 与其他PIFs仅定位于ODV囊膜这一特征不同, PIF4在BV和ODV的囊膜组分中都可被检测到. 与此对应, 在感染细胞中PIF4均匀分布于细胞质和细胞核中, 而其他PIFs在感染晚期通常定位于细胞核内的环带(ring zone, RZ)区^[7,34]. 尽管PIF4也存在于BV中, 其缺失并没有影响BV的增殖.

图2 ODV表面上的PIF复合物和感染细胞中PIF复合物的形成推测模式图

A: ODV表面的PIF复合物组成模式图. PIF的拓扑朝向由TMHMM Server v. 2.0预测. 因为PIF5不是复合物中的组分, 在图中离复合物较远以示区分; B: 在感染细胞中, 核衣壳在病毒发生基质中(viral stroma, VS)形成后, 一部分核衣壳从核内输出到胞质, 并进一步出芽形成BV(图中左侧), 剩下的核衣壳留在核内包装成ODV(图中中部). 在病毒感染晚期, PIF蛋白表达后整合到内质网, 在其他病毒蛋白和宿主核输入蛋白的帮助下PIFs由核孔运输到核内膜(步骤①). PIF蛋白或以单体形式(红色虚线所示)或以复合物的形式(蓝色虚线所示)运输到核内. 病毒诱导的微囊泡(MV)从核内膜出芽(步骤②), 核衣壳吸附到微囊泡(MV)上准备ODV的包膜(步骤③). ODV最终在内核膜附近的环带区形成(步骤④). 成熟的ODV包埋进多角体(OB)中(步骤⑤)

1.6 PIF5(ODV-E56)

1996年, ODV-E56被发现是一个ODV的囊膜蛋白, 大小为40 kD, C-末端有一个TM结构域和4个保守的半胱氨酸(图1), AcMNPV的ODV-E56在36 h.p.i.检测到表达, 与感染细胞核内的微囊泡(microvesicles, MVs)有共定位^[35]. 当用*polyhedrin*启动子延迟并过表达ODV-E56时, 发现ODV的成熟受阻, 这表示ODV-E56可能在ODV的成熟和包埋过程中起关键作用^[36]. 2011年, ODV-E56被发现具有口服感染功能并命名为PIF5^[8]. AcMNPV和BmNPV中缺失*pif5*, 都会明显影响ODV的口服感染力, 但不影响ODV的形态和成熟^[8,18]. 与其他PIF不同, 在感染的细胞和ODV病毒粒子中, PIF5的丰度较高. 据报道, PIF5与中肠BBMV的一些蛋白有相互作用, 但其在ODV入侵时的结合与融合过程中可能并不起作用^[8].

1.7 PIF6

PIF6(*ac68*)是最近才被发现的PIF蛋白^[9], 大小约16 kD, C-末端有一个TM跨膜结构域, 与其他PIFs不同, PIF6中没有保守的半胱氨酸(图1). *ac68*在3 h.p.i.即可以检测到转录本, 但蛋白却在36 h.p.i.才被检测到. 早期研究表明, AC68或BM56(AC68在BmNPV的同源物)在口服感染中是非必需的, 虽然在生测实验中缺失病毒的半数致死时间(median lethal time, LT₅₀)延长^[37,38]. BM56也被报道在ODV的成熟过程中起作用^[38]. 然而, 在这些早期的研究中, 因为*ac68*或*bm56*的ORF内部含有另一个关键基因*lef3*的启动子, 在构建*pif6*的缺失病毒时仍保留了N端大部分区域. 直到2012年Nie等人^[9]通过完全缺失的方法证明*ac68*是口服感染中的必需基因, 并将此蛋白命名为PIF6. 尽管早期的研究存在方法学上的缺陷, 但也表明PIF6的N端在口服感染中起到重要作用^[37,38].

1.8 PIF7

*ac110*是最近发现的一个*pif*基因, 缺失*ac110*并没有影响BV的产生和OB的形成. 与其他的PIF一样, 敲除*ac110*的病毒完全丧失了口服感染力, 然而血腔注射却可有效地使幼虫致死. 用白色荧光增白剂并没有拯救敲除了*ac110*的病毒的口服感染能力. 这些结果表明, *ac110*是一个新的PIF蛋白, PIF7^[10]. PIF7(约

7 kD)是目前发现的最小的PIF蛋白, 包含N-末端的TM结构域, 没有保守的半胱氨酸(图1). 曾有报道指出, *ac110*只是在 α 和 β 属的杆状病毒中存在^[39]. 然而, 最近的研究报道发现, *pif7*在 γ 和 δ 杆状病毒亦有同源基因存在, 是杆状病毒第38个核心基因^[11]. 表1中, 在 γ 杆状病毒NeleNPV (Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus)中*ac110*同源基因用*orf66a*表示(核苷酸(nucleotide, nt) 60203~60382), 可能因为这个基因太小, 之前该基因未被注释.

1.9 PIF8(VP91)

*vp91*是杆状病毒核心基因之一, 最初是作为衣壳蛋白在OpMNPV(*Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus)中被发现^[40]. 随后对AcMNPV和CunNPV (*Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus, 1个 δ 属杆状病毒)的质谱分析鉴定出VP91是一个ODV结构蛋白^[41,42]. 据报道, 在HearNPV中, VP91是特异性分布于ODV的囊膜蛋白^[43]. *vp91*全长基因的敲除会使感染性BV无法正常产生, 以及核衣壳无法装配^[12,44]. 仅缺失AcMNPV VP91 N端的几丁质结合功能域, 可以拯救BV的产生, 并且子代BV对幼虫血腔注射可以达到和野生型AcMNPV一样高效的致死率, 但是其子代ODV的口服感染能力会严重下降^[12]. VP91是PIF复合物的组成部分, 且其对于PIF复合物的装配是必需的^[45]. 此外, 其包含的一个富含半胱氨酸的锌指结构域对于PIF复合物的正确形成也是必需的^[11]. VP91全长蛋白分子量约96 kD, N端含有13个保守的半胱氨酸. 在其N末端具有一个由23 aa组成的TM结构域, 被证明是一个有功能的INM-SM^[12]. 之前发现, VP91在核衣壳装配中也发挥功能, 这似乎不符合口服感染因子的定义, 因此一直无法认为该蛋白是一个PIF蛋白. 直到最近, 有报道显示*vp91*对核衣壳装配负责的是其基因序列中所包含的一个保守顺式作用元件(称为NAE (nucleocapsid assembly-essential element)), 而并非其所编码产生的蛋白质^[46]. 至此, VP91才被命名为口服感染因子PIF8^[11].

1.10 SF58(AC108)

在一株口服感染缺陷的草地贪夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus, SfMNPV)的全基因组测序结果中发现, 该株病毒的sf58

表 1 无脊椎动物大DNA病毒中的PIFs的分布^{a)}

PIF	杆状病毒							裸病毒			蜜蜂病毒		AmFV	唾液腺肥 大病毒	线头病毒
	Ac	Bm	Ha	Se	Cp	Nele	Cuni	Gb	Hz	To	Cc	Ci		MdSGHV	WSSV
PIF0 (P74)	138	115 (91)	20 (52)	131 (55)	60 (42)	47 (39)	74 (34)	45 (19)	106 (21)	45 (23)	CAR31575 (19)	CAR40192 (19)	77 (20)	39 (13)	36 (15)
PIF1	119	97 (85)	111 (45)	36 (45)	75 (35)	76 (30)	29 (29)	52 (17)	82 (16)	69 (15)	NA	CAR40193 (19)	59 (17)	29 (13)	71 (13)
PIF2	22	13 (94)	132 (59)	35 (57)	48 (50)	52 (44)	38 (48)	66 (24)	26 (23)	7 (22)	NA	CAR40194 (19)	100 (17)	89 (14)	12 (15)
PIF3	115	95 (92)	98 (38)	50 (45)	35 (39)	66 (29)	46 (28)	3 (19)	53 (17)	13 (20)	CAR31576 (17)	NA	88 (21)	106 (13)	107 (9)
PIF4	96	79 (93)	85 (46)	69 (50)	89 (33)	5 (27)	90 (26)	87 (17)	39 (22)	119 (19)	CAR31579 (19)	CAR40196 (16)	157 (17)	40 (12)	—
VP91	83	69 (93)	76 (42)	77 (43)	101 (18)	82 (22)	35 (22)	2 (15)	89 (10)	16 (14)	NA	CAR40191 (17)	26/79 (16)	—	—
PIF5	148	124 (83)	15 (49)	6 (47)	18 (45)	23 (34)	102 (23)	5 (17)	62 (13)	96 (14)	CAR31577 (11)	CAR40195 (11)	—	—	—
PIF6	68	56 (92)	64 (39)	90 (41)	114 (28)	38 (17)	58 (19)	55 (10)	64 (12)	56 (10)	CAR82241 (7)	NA	—	—	—
PIF7	110	92a (89)	93 (37)	60 (42)	53 (28)	66a (24)	70 (6)	—	—	—	—	—	—	—	—
SF58 homolog	108	91 (95)	95 (37)	58 (39)	56 (16)	68 (22)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) 表中列出了无脊椎动物病毒的PIF同源蛋白的ORF号(蜜蜂病毒中, 展示对应的检索号), 括号内是相应蛋白与AcMNPV的PIFs氨基酸相似度. 病毒名称缩写和序列检索号(部分信息见图3)为: Bm, BmNPV, NC_001962; Se, SeMNPV, NC_002169; Ac, AcMNPV; Ha, HearNPV; Cp, CpGV; Nele, NeleNPV; Cuni, CuniNPV; Gb, GbNV; Hz, HzNV; To, ToNV; Cc, CcBV; Ci, CiBV. “NA”, 目前未能获取所对应的基因序列; “—”, 在全基因组中未鉴定到

基因存在显著变异^[47]. 进一步研究发现, *sf58*的敲除造成病毒丧失口服感染能力, 但是幼虫血腔注射仍能致死, 因此SF58被认为是一个新的PIF^[48]. 然而, BmNPV中*sf58*的同源基因*bm19*编码的蛋白尽管鉴定为ODV囊膜的组分, 且在一定程度上可以影响ODV的毒力, 但它并非为口服感染所必需^[48]. 在AcMNPV中, SF58的同源蛋白AC108与PIF复合物相关^[45]. SF58及其同源蛋白是分子量比较小的囊膜蛋白(AC108约12 kD), 在接近中部的位点具有一个TM结构域(图1). 与PIF6及PIF7类似, SF58及其同源蛋白同样缺少保守的半胱氨酸(图1). 不同于*pif0-8*的高度保守性, *sf58*及其同源基因仅存在于 α , β , γ 属的杆状病毒中, 而在 δ 属中没有找到^[39]. SF58究竟是否是第10个PIF蛋白, 即PIF9, 仍需要更多的证据.

2 PIF复合物的形成

目前所知绝大多数病毒只需一种或两种囊膜蛋白就足够介导病毒吸附和膜融合, 进而完成病毒入侵过程. 然而某些大DNA病毒, 例如, 痘病毒和疱疹病毒, 其入侵和感染时则依赖于多个蛋白组成的复合物^[49-51]. 随着越来越多的杆状病毒ODV囊膜蛋白被发现与口服感染密切相关, 探寻这些PIF蛋白是否存在相互作用并一起协同介导ODV入侵中肠上皮细胞的过程中是一个很有意义的科学问题.

在2010年, Peng等人^[52]通过蛋白质交联和蛋白部分变性技术, 在ODV囊膜上首次检测到了一个由PIF1, PIF2和PIF3, 但不含P74的稳定蛋白复合体(命名为PIF复合物, >170 kD). 此外, 缺失任何上述3个PIFs中的任意一个(不包含P74), 均无法形成PIF复合物. 虽然P74不是PIF复合体的核心组分, 但免疫共沉淀实验(co-immunoprecipitation, Co-IP)显示其与复合体存在松散的结合^[52]. 通过Blue-Native PAGE和Co-IP实验, Peng等人^[45]进一步证明了PIF复合物大约有500 kD, 还包含了额外的PIF蛋白(PIF4和VP91). 而另外两个ODV囊膜蛋白PIF5和ODV-E25则不参与复合物的形成^[45]. 在同一篇报道中, 通过Co-IP实验和质谱分析发现, P74, PIF2, PIF3, PIF4, PIF6, VP91, AC108和AC5(一种ODV特异蛋白)都与PIF1结合^[45]. 然而PIF6, AC108和AC5是否是复合物的真正组分以及上述蛋白是否是PIF复合体的全部成员, 还需进一步探寻.

已知如果敲除某些*pif*基因之后会导致PIF复合物消失^[34,52], 说明PIF复合物的形成依靠各个PIF之间的相互作用. 考虑到蛋白质-蛋白质相互作用的基础^[53], 用不同技术来分析PIF之间的相互作用. 利用酵母双杂交技术(yeast two-hybridization, Y2H)对棉铃虫核型多角体病毒的ODV结构蛋白进行分析, 结果揭示了PIF2-PIF3, PIF3-PIF5以及PIF3-PIF3的相互作用^[54]. 双分子荧光蛋白互补(bimolecular fluorescence protein complementation, BiFC)及Co-IP实验证实了在感染细胞中, BmNPV的PIF4与PIF1, PIF2及PIF3有相互作用^[55]. 此外, 如上所述, PIF1与其他PIF都有广泛的相互作用^[45]. 最近, 有报道尝试着将HearNPV的PIF0-3替换为其他病毒的同源物, 生物测定结果显示, 除了斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV)的PIF3替换的病毒还保留部分口服感染能力, 大部分重组病毒都丧失了口服感染能力^[56]. 此结果暗示PIF之间的相互作用可能是高度特异的. 多数PIFs都富含半胱氨酸, 因此PIF复合物组分之间的相互作用可能是通过形成分子间二硫键, 当然其他形式的分子间作用力也可能存在. 最近有报道, 运用了Y2H及BiFC技术来详细分析PIFs之间的相互作用, 验证了6种直接相互作用, 包括PIF1-PIF2, PIF1-PIF3, PIF1-PIF4, PIF2-PIF3, PIF3-PIF4以及VP91-PIF1^[57]. 基于各个PIF的大小和拓扑结构预测、PIF复合物的组成成分及各组分之间的相互作用, 提出了ODV囊膜蛋白PIF复合物的模型(图2A). 在模式图中仍包括了PIF6, AC108和AC5, 尽管这些蛋白是否为复合物的成员还需要更多证据支持. 在这些PIFs之中, P74, PIF1及PIF2可能与ODV入侵中肠细胞的特异性结合过程有关^[6,21,22], PIF1和PIF2可能是PIF复合物的核心组分^[52]. 然而, 复合物中的各个PIF在口服感染过程中的具体作用仍旧未知.

PIFs在细胞质内合成以后, 必需被运输进入细胞核以装配形成ODV. 大多数的ODV囊膜蛋白都含有能分选入核的INM-SM序列. 该序列的功能在多数ODV囊膜蛋白都得到了证实, 例如, ODV-E66^[58], ODV-E25^[59], AC76^[60], PIF3^[31]和VP91^[12]. 在细胞内质网中, 宿主的核输入蛋白importin α -16会结合于病毒蛋白的INM-SM, 然后通过核孔将其转运到内核膜(图2B, 步骤①). 接着, 这些INM-SM蛋白会被整合到病毒诱导的核内膜来源的微囊泡(MV)(图2B, 步骤②)^[58,61]. 这些微囊泡

是ODV囊膜的前体^[18]。在核环带区的周围,核衣壳附着在这些微囊泡上(图2B,步骤③),完成ODV的包装(图2B,步骤④)。成熟的ODV接下来会包埋进到包涵体中(图2B,步骤⑤)。然而,PIF复合物在何处形成、是如何形成有待于解答。在这里,假设了这些PIF运输的两种可能的路径:在复合物装配之前,每个PIF单体就被转运到了核内(图2B,红色虚线剪头);或是PIF复合物在细胞质内形成,随后再被转运入核(图2B,蓝色虚线剪头)。

3 其他无脊椎动物病毒中的PIF同源物及其可能的进化途径

口服感染因子并非杆状病毒所特有,事实上很多无脊椎动物病毒中都有PIF同源蛋白。例如,能在许多甲壳类动物中引起白斑综合征的虾白斑综合征病毒(隶属线头病毒科)中有P74, PIF1-3的同源物^[13],能引起双翅目昆虫出现明显的唾液腺肥大症状的唾液腺肥大病毒中有P74, PIF1-4的同源物^[14,62],感染蜜蜂的大DNA病毒蜜蜂丝状病毒(目前未分类)中有P74, PIF1-4, VP91的同源物^[16],还有感染鞘翅目、双翅目和鳞翅目昆虫的裸病毒(隶属裸病毒科)中有P74, PIF1-6, VP91的同源物^[13,15]。通过质谱分析,在茧蜂病毒的结构蛋白中也发现了P74, PIF1-6, VP91的同源物。茧蜂病毒属于多分DNA病毒科,感染寄生蜂,可能起源于裸病毒^[63]。上述这些病毒除了茧蜂病毒,它们的传播均不同程度上通过口服感染(茧蜂病毒的传播是靠寄生蜂排卵到鳞翅目幼虫时的穿刺,将卵和病毒一起注射到虫体^[64])。PIFs的广泛分布意味着PIF介导的口服感染机制是这些无脊椎动物病毒所共有的。

昆虫是地球上很古老的栖息物种^[65,66]。它们可能起源于四亿七千九百万年前(479 Mya),蓬勃发展于泥盆纪(407 Mya)到密西西比纪(345 Mya)。有报道显示,几种昆虫DNA病毒和其宿主的共进化可以追溯到三亿年前^[67]。为了探寻这些包含PIF的无脊椎DNA病毒的系统发生关系,基于13个共有基因构建了系统发生树(图3),这13个共有基因包括: *DNA polymerase*, *helicase*, *helicase-2*, *p74*, *pif1*, *pif2*, *pif3*, *pif4*, *pif5*, *vp91*, *lef-8*, *lef-4* 和 *p33*。系统发生树显示, WSSV和杆状病毒的亲缘关系最远,而这两病毒的宿主亲缘关系也最远^[65]。根据Thézé等人^[67]的预测,唾液腺肥大病毒、蜜蜂丝状病

图3 PIFs在无脊椎动物大DNA病毒中的分布和进化关系
依据13个共有基因的蛋白序列相串联构建了最大似然树(ML tree)。在各病毒科中PIF的分布展示在左侧。从PIF4到PIF8,新出现的PIF以下画线和方框标识。病毒缩写和序列检索号分别是: AcMNPV, NC_001623; HearNPV, NC_002654; CpGV, *Cydia pomonella* granulovirus, NC_002816; NeleNPV, NC_005906; CuniNPV, NC_003084; OrNV, *Oryctes rhinoceros nudivir*, NC_011588; GbNV, *Gryllus bimaculatus nudivir*, NC_009240; HzNV, *Helicoverpa zea nudivir-2*, NC_004156; PmNV, *Penaeus monodon NV*, NC_024692; ToNV, *Tipula oleracea NV*, NC_026242; CcBV, *Cotesia congregata bracovirus*; CiBV, *Chelonus inanitus bracovirus*; GpSGHV, *Glossina pallidipes salivary gland hypertrophy virus*, NC_010356; MdSGHV, *Musca domestica salivary gland hypertrophy virus*, NC_010671; WSSV, NC_003225; AmFV, NC_027925

毒、裸病毒和杆状病毒的起源时间分别是280, 270, 220以及175 Mya。进化树中从虾白斑综合征病毒到裸病毒,这些病毒和杆状病毒的亲缘关系越来越远,也暗合了这些病毒的起源时间(图3)。有意思的是,PIF蛋白的种类随着进化而逐渐增多(图3)。例如,早期出现的虾白斑综合征病毒有4种PIF蛋白(PIF0~3);随后的唾液腺肥大病毒新出现了PIF4(下画线);蜜蜂丝状病毒中新出现了VP91(下画线);裸病毒和茧蜂病毒新出现了PIF5和PIF6(下画线),杆状病毒中新增了PIF5, PIF6, PIF7(下画线),并且更晚一些进化出来的

α , β 和 γ 属杆状病毒新增了SF58同源物(AC108)(下划线). 表1中展示了这些无脊椎动物DNA病毒PIF同源物的ORF序号及它们和AcMNPV的PIF蛋白氨基酸相似度. 这暗示着口服感染机制在病毒与宿主长期共进化的过程中逐渐演化得越来越精细而高效. 在这些PIF蛋白中, P74, PIF1~3似乎是核心成员, 一方面它们更早出现, 另一方面有报道称它们是PIF复合物的核心组分^[52].

4 总结与展望

口服感染是很多无脊椎动物病毒入侵宿主的第一步, 也决定着宿主域和病毒毒力. 迄今为止, PIF同源物在5种不同科的无脊椎动物大DNA病毒(*Baculoviridae*, *Nudiviridae*, *Polydnaviridae*, *Hytrosaviridae*,

Nimaviridae)中有分布. 这些病毒和其宿主共进化至少超过3亿年, 意味着由PIF介导的口服感染机制是这些无脊椎动物大DNA病毒拥有的一种古老而经典的入侵机制. 过去20年中, 对PIF和PIF复合物的解析方面取得了很大进展, 然而还有很多重要的问题亟待解答. 这些问题包括: (i) PIF复合物的完整组成是什么, 复合物的结构如何? (ii) PIF复合物是怎么形成的, 在肠道感染中又是如何被激活的? (iii) 与PIF互作的宿主因子是什么? (iv) 与杆状病毒类似, PIF复合物在其他无脊椎动物病毒也存在吗? (v) 不参与PIF复合物组成的PIF, 如PIF5, 在口服感染中又起什么作用呢? 这些问题的解答无疑将会让研究者们更好地理解口服感染机制, 而且为这些无脊椎病毒作为杀虫剂的遗传改良提供宝贵的理论基础.

参考文献

- Slack J M, Lawrence S D, Krell P J, et al. Trypsin cleavage of the baculovirus occlusion-derived virus attachment protein P74 is prerequisite in per os infection. *J Gene Virol*, 2008, 89: 2388–2397
- Faulkner P, Kuzio J, Williams G V, et al. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J Gen Virol*, 1997, 78: 3091–3100
- Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 1989, 173: 759–763
- Ferber M L, Croizier G, Croizier L, et al. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 2002, 83: 3013–3022
- Pijlman G P, Pruijssers A J P, Vlak J M. Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *J Gene Virol*, 2003, 84: 2041–2049
- Ohkawa T, Washburn J O, Sitapara R, et al. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *J Virol*, 2005, 79: 15258–15264
- Fang M, Nie Y, Harris S, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a per os infectivity factor (*pif-4*). *J Virol*, 2009, 83: 12569–12578
- Sparks W O, Harrison R L, Bonning B C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology*, 2011, 409: 69–76
- Nie Y, Fang M, Erlandson M A, et al. Analysis of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair *lef3* and *ac68* reveals that AC68 is a per os infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication. *J Virol*, 2012, 86: 3985–3994
- Liu J, Zhu L, Zhang S, et al. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac110 gene encodes a new per os infectivity factor. *Virus Res*, 2016, 221: 30–37
- Javed M A, Biswas S, Willis L G, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus AC83 is a per os infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes. *J Virol*, 2017, 91: e02115-16
- Zhu S, Wang W, Wang Y, et al. The baculovirus core gene *ac83* is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2013, 87: 10573–10586
- Wang Y, Bininda-Emonds O R P, van Oers M M, et al. The genome of *Oryctes rhinoceros* nudivirus provides novel insight into the evolution of nuclear arthropod-specific large circular double-stranded DNA viruses. *Virus Genes*, 2011, 42: 444–456
- Garcia-Maruniak A, Abd-Alla A M M, Salem T Z, et al. Two viruses that cause salivary gland hypertrophy in *Glossina pallidipes* and *Musca domestica* are related and form a distinct phylogenetic clade. *J Gene Virol*, 2009, 90: 334–346

- 15 Bézier A, Thézé J, Gavory F, et al. The genome of the nucleopolyhedrosis-causing virus from *Tipula oleracea* sheds new light on the nudiviridae family. *J Virol*, 2015, 89: 3008–3025
- 16 Gauthier L, Cornman S, Hartmann U, et al. The *Apis mellifera* filamentous virus genome. *Viruses*, 2015, 7: 3798–3815
- 17 Huang J K, Hu R F, Qiao F B, et al. Impact of insect-resistant GM rice on pesticide use and farmers' health in China. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 466–471
- 18 Braunagel S C, Summers M D. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Curr Drug Targets*, 2007, 8: 1084–1095
- 19 Zhang J, Shen Y, Wu X. A minireview on per os infectivity factors of insect baculovirus. *Sci Sericult*, 2014, 40: 0730–0736
- 20 Peng K, van Lent J W M, Vlak J M, et al. *In situ* cleavage of baculovirus occlusion-derived virus receptor binding protein P74 in the peroral infectivity complex. *J Virol*, 2011, 85: 10710–10718
- 21 Haas-Stapleton E J, Washburn J O, Volkman L E. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *J Virol*, 2004, 78: 6786–6791
- 22 Mu J, van Lent J W M, Smagghe G, et al. Live imaging of baculovirus infection of midgut epithelium cells: a functional assay of per os infectivity factors. *J Gene Virol*, 2014, 95: 2531–2539
- 23 Yao L, Zhou W, Xu H, et al. The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Res*, 2004, 104: 111–121
- 24 Zhou W, Yao L, Xu H, et al. The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. *Virus Genes*, 2005, 30: 139–150
- 25 Alfonso V, López M G, Carrillo E, et al. Surface display of *AcMNPV* occlusion-derived P74 does not enhance oral infectivity of budded viruses. *Intervirology*, 2012, 55: 247–251
- 26 Slack J M, Lawrence S D, Krell P J, et al. A soluble form of P74 can act as a per os infectivity factor to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gene Virol*, 2010, 91: 915–918
- 27 Gutiérrez S, Kikhno I, López Ferber M. Transcription and promoter analysis of *pif*, an essential but low-expressed baculovirus gene. *J Gene Virol*, 2004, 85: 331–341
- 28 Simón O, Williams T, Cerutti M, et al. Expression of a peroral infection factor determines pathogenicity and population structure in an insect virus. *PLoS ONE*, 2013, 8: e78834
- 29 Fang M, Nie Y, Wang Q, et al. Open reading frame 132 of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus encodes a functional per os infectivity factor (PIF-2). *J Gene Virol*, 2006, 87: 2563–2569
- 30 Ohkawa T. Identification and characterization of genes of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) involved in viral pathogenesis. Doctoral Dissertation. Sacramento: University of California-Davis, 1997
- 31 Li X, Song J, Jiang T, et al. The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Arch Virol*, 2007, 152: 1851–1858
- 32 Song J, Wang M, Huang H, et al. Functional studies of per os infectivity factor 3 of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *J Gene Virol*, 2012, 93: 374–382
- 33 Song J, Wang R, Deng F, et al. Functional studies of per os infectivity factors of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gene Virol*, 2008, 89: 2331–2338
- 34 Huang H, Wang M, Deng F, et al. ORF85 of *HearNPV* encodes the per os infectivity factor 4 (PIF4) and is essential for the formation of the PIF complex. *Virology*, 2012, 427: 217–223
- 35 Braunagel S C, Elton D M, Ma H, et al. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology*, 1996, 217: 97–110
- 36 Xiang X, Chen L, Guo A, et al. The *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) ODV-E56 envelope protein is also a per os infectivity factor. *Virus Res*, 2011, 155: 69–75
- 37 Li G, Wang J, Deng R, et al. Characterization of *AcMNPV* with a deletion of *ac68* gene. *Virus Genes*, 2008, 37: 119–127
- 38 Xu H J, Yang Z N, Zhao J F, et al. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *J Gene Virol*, 2008, 89: 1212–1219
- 39 Garavaglia M J, Miele S A B, Iserte J A, et al. The *ac53*, *ac78*, *ac101*, and *ac103* genes are newly discovered core genes in the family *Baculoviridae*. *J Virol*, 2012, 86: 12069–12079
- 40 Russell R L Q, Rohrmann G F. Characterization of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* Baculovirus. *Virology*, 1997, 233: 210–223
- 41 Braunagel S C, Russell W K, Rosas-Acosta G, et al. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa*

- californica nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9797–9802
- 42 Perera O, Green T B, Stevens S M, et al. Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions. *J Virol*, 2007, 81: 4585–4590
- 43 Hou D, Zhang L, Deng F, et al. Comparative Proteomics reveal fundamental structural and functional differences between the two progeny phenotypes of a baculovirus. *J Virol*, 2013, 87: 829–839
- 44 Xiang X, Shen Y, Yang R, et al. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BmP95 plays an essential role in budded virus production and nucleocapsid assembly. *J Gene Virol*, 2013, 94: 1669–1679
- 45 Peng K, van Lent J W M, Boeren S, et al. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. *J Virol*, 2012, 86: 4981–4988
- 46 Huang Z, Pan M, Zhu S, et al. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac83* gene contains a *cis*-acting element that is essential for nucleocapsid assembly. *J Virol*, 2017, 91: e02110-16
- 47 Simón O, Palma L, Williams T, et al. Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. *J Invertebr Pathol*, 2012, 109: 117–126
- 48 Tang Q, Li G, Yao Q, et al. Bm91 is an envelope component of ODV but is dispensable for the propagation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Invertebr Pathol*, 2013, 113: 70–77
- 49 Campadelli-Fiume G, Menotti L, Avitabile E, et al. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. *Curr Opin Virol*, 2012, 2: 28–36
- 50 Senkevich T G, Ojeda S, Townsley A, et al. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18572–18577
- 51 Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18153–18158
- 52 Peng K, van Oers M M, Hu Z, et al. Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *J Virol*, 2010, 84: 9497–9504
- 53 Gao Y. Facts of research on protein-protein interactions. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 313–314
- 54 Peng K, Wu M, Deng F, et al. Identification of protein-protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *J Gene Virol*, 2010, 91: 659–670
- 55 Dong Z Q, Zhang J, Chen X M, et al. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF79 is a per os infectivity factor associated with the PIF complex. *Virus Res*, 2014, 184: 62–70
- 56 Song J, Wang X, Hou D, et al. The host specificities of baculovirus per os infectivity factors. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0159862
- 57 Zheng Q, Shen Y, Kon X, et al. Protein-protein interactions of the baculovirus per os infectivity factors (PIFs) in the PIF complex. *PLoS One*, 2016, 11: e0159862
- 58 Braunagel S C, Williamson S T, Saksena S, et al. Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: facilitated trafficking to the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 8372–8377
- 59 Hong T, Summers M D, Braunagel S C. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 4050–4055
- 60 Wei D, Wang Y, Zhang X, et al. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus Ac76: a dimeric type II integral membrane protein that contains an inner nuclear membrane-sorting motif. *J Virol*, 2014, 88: 1090–1103
- 61 Saksena S, Summers M D, Burks J K, et al. Importin- α -16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 500–508
- 62 Jehle J A, Abd-Alla A M, Wang Y. Phylogeny and evolution of hytrosaviridae. *J Invertebr Pathol*, 2013, 112 Suppl: S62–S67
- 63 Bézier A, Annaheim M, Herbinière J, et al. Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, 2009, 323: 926–930
- 64 Burke G R, Strand M R. Polydnaviruses of parasitic wasps: domestication of viruses to act as gene delivery vectors. *Insects*, 2012, 3: 91–119
- 65 Misof B, Liu S, Meusemann K, et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 2014, 346: 763–767
- 66 Mora C, Tittensor D P, Adl S, et al. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol*, 2011, 9: e1001127
- 67 Thézé J, Bézier A, Periquet G, et al. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 15931–15935