

对硫磷处理下果蝇细胞应激基因的高通量分析*

李娜** 陈梓 刘为 迟庆萍 胡俊丽 程罗根***

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210023)

摘要 【目的】通过对硫磷处理黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (William)的 S2 细胞, 研究果蝇细胞在有机磷杀虫剂作用下应激基因的表达及其表达量的变化。为进一步分析昆虫应激反应及分子毒理提供研究依据。【方法】利用 CCK-8 试剂盒和细胞计数板检测不同浓度对硫磷处理下细胞的毒性及细胞存活率, 应用基因表达谱(RNA-Seq)和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测用药处理后细胞内基因的差异表达及表达量的变化。【结果】在 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对硫磷浓度处理下细胞活力与其他浓度相比呈现一定程度的增强, 选用 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对硫磷处理的细胞做高通量基因表达谱分析显示: 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对硫磷处理细胞后扩增表达的基因有 481 个, 差异显著表达的基因有 52 个, 包括氧化应激基因、解毒基因和免疫相关基因的扩增或差异表达。qRT-PCR 验证基因表达谱中一部分差异显著基因的表达变化与表达谱变化趋势一致。【结论】对基因的差异表达和细胞毒性检测进行了研究, 为对硫磷新的作用靶标和抗性机制研究奠定了基础。

关键词 对硫磷, 细胞毒性, 基因表达谱, qRT-PCR, 果蝇细胞

RNA-Seq (quantitative) analysis of the stress gene in *Drosophila* cells treated with parathion

LI Na** CHEN Zi LIU Wei CHI Qing-Ping HU Jun-Li CHENG Luo-Gen***

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract [Objectives] To investigate stress gene expression, and quantitative changes in the expression of this gene, in *Drosophila* S2 cells treated with parathion, and provide a basis for further analysis of insect stress reactions and molecular toxicology. [Methods] The cytotoxicity and cell survival rate of *Drosophila* S2 cells were tested using CC-8 reagents and a cell count plate. Application of RNA-Seq and qRT-PCR to detect differentially expressed genes and quantitative changes in gene expression. [Results] Cells exposed to 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ parathion had high survival rates. Analysis of changes in gene expression with RNA-Seq revealed that 481 genes were up-regulated and that 52 displayed significant changes. These included oxidative stress genes, detoxification genes and immune related genes. [Conclusion] Identifying genes that are differentially expressed in response to cytotoxicity lays the foundation for analyzing the acting targets of parathion and the mechanism underlying resistance to this pesticide.

Key words parathion, cytotoxicity, RNA-Seq, qRT-PCR, *Drosophila*'s cells

化学防治是农业害虫防治的主要方法, 有机磷农药在杀虫剂中占据重要的地位, 是世界上生产和使用较多的农药品种之一, 是控制农作物害虫和病媒昆虫的重要手段 (Mulbry *et al.*, 1986; Zhong *et al.*, 2001)。杀虫剂因长期不合理使用

会使害虫产生抗药性, 有研究报道, 使用菊酯类杀虫剂 3~5 年后家蝇的抗药性会高达 2 265 倍。害虫抗性的产生可能导致严重的后果, 如媒介昆虫产生抗性会使登革热、疟疾等传染病蔓延; 农业害虫的抗药性会导致农作物减产, 农药残留污

* 资助项目 Supported projects: 江苏省高校优势学科 (生物学) 建设工程项目

**第一作者 First author, E-mail: 15996211296@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: chengluogen@njnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-11-25, 接受日期 Accepted: 2015-01-14

染环境,危及人畜健康。有机磷农药的广泛使用使很多昆虫对其产生抗药性,如毒死蜱、甲基对硫磷、马拉硫磷、敌敌畏、乙酰甲胺磷等有机磷杀虫剂在美国(Yu, 1993)、上海(唐振华等, 1992)、长沙(向延平和王小平, 2001)等多地对不同昆虫分别产生了不同程度的抗药性,弄清害虫产生抗药性的作用机理是有效防治害虫产生抗药性的关键。通过基因组水平和蛋白质组水平两个方面进行杀虫剂作用机理的研究能够比较全面地阐述杀虫剂的作用机理,也有可能发现新的作用机理和靶标。虽然已有很多研究报道过害虫对有机磷类杀虫剂的作用机理,但是害虫对有机磷类杀虫剂的应激作用机理尚未见文献报道,本研究在基因水平上初步研究有机磷杀虫剂的应急作用机理,我们以对硫磷为代表药剂,以果蝇细胞作为模式细胞,采用 CCK-8 试剂盒和免疫荧光反应进行细胞计数检测不同浓度对硫磷处理下细胞的毒性,利用高通量分析和 qRT-PCR 技术,分析细胞在对硫磷应激作用下基因表达水平的变化以及对硫磷对细胞毒性作用,初步筛选与对硫磷应激相关基因,为进一步研究有机磷类杀虫剂的作用机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 对硫磷(上海农药研究所);无血清昆虫细胞培养基 SH30278.02(Thermo 生物公司);CCK-8 试剂盒(Dojindo 公司);TRIZOL 试剂(Invitrogen 公司);PrimeScript[®] RT reagent Kit、rTaq 酶、载体、核酸 Marker、cDNA 合成试剂盒均购自 TaKaRa 公司(日本);PCR 产物纯化试剂和质粒抽提试剂盒购自 Axygen(美国);引物由上海生工股份有限公司代为合成,DAPI 染色液购自碧云天生物技术,其他未特别注明均为分析纯试剂和常规耗材,细胞继代培养和冻存复苏按常规方法进行。

1.1.2 细胞 果蝇 S2 细胞由东南大学生命科学研究院惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用无血清昆虫细胞培养基 SH30278.02 培养果蝇细胞,每隔 3~4 d 换一次培养基,于 28 °C 无 CO₂ 细胞培养箱中培养细胞。

1.2.2 对硫磷处理果蝇细胞 对硫磷由甲醇稀释至不同浓度(0、5、10、15、25、35、45、55、65、75、85、95 μg/mL)处理 96 孔板中处于对数期的细胞,每个浓度设置 3 个复孔,每孔 100 μL 细胞悬液加对硫磷 5 μL,另设空白对照组(只有 100 μL 培养基)和溶剂甲醇处理组各 3 个复孔。加药后将细胞重新放回细胞培养箱,培养 48 h 观察。

1.2.3 倒置显微镜下观察细胞形态变化及细胞凋亡 通过倒置显微镜观察对硫磷处理 48 h 后细胞的形态特征变化,利用 DAPI 荧光染液和台盼蓝染液对正常细胞及对硫磷处理细胞进行染色后计数分析。

1.2.4 细胞活力检测 利用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力,按照说明书上的要求进行操作,将处理的 96 孔板细胞在 28 °C 无 CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,4 h 后测定细胞存活率。按照下列公式计算不同浓度下的细胞存活率,筛选对硫磷应激浓度:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{[A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})]} \times 100;$$

A(加药):具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度;

A(空白):具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度;

A(0 加药):具有细胞和 CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度。

1.2.5 基因表达谱分析及实时荧光定量验证 将对硫磷处理的细胞及正常细胞分别提取总 RNA,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA。反转录成 cDNA,经过磁珠纯化、末端修复、3'末端加碱基 A、加测序接头后,进行 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作。构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 进行质量和产量检测,文库质控合格后使用 Illumina HiSeq[™] 2000 进行

测序(由深圳华大基因技术有限公司完成)。通过测序结果筛选与应激、解毒相关的基因。将表达量有显著差异的基因进行 qRT-PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 倒置显微镜下观察对硫磷处理细胞后的形态变化及细胞凋亡

显微镜下(目镜 10×, 物镜 20×)观察正常细胞和对硫磷处理后细胞形态的变化及经台盼蓝染色后进行细胞观察和计数,死细胞或破损的细胞会被染成蓝色,而正常细胞则不会被染色(图 1)。通过 DAPI 荧光染液染色后,在荧光显

微镜下观察细胞凋亡情况,凋亡的细胞细胞核荧光亮度是活细胞的 20 倍左右。正常的生长状态良好的细胞长势一致,大部分处于贴壁状态。对硫磷处理果蝇 S2 细胞 48 h,低浓度组(5、10 和 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)细胞形态与正常 S2 细胞相比无明显变化,但细胞密度较低;高浓度(95 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理时细胞发生明显的形态特征的改变,细胞增殖缓慢,贴壁细胞明显减少,能够贴壁的细胞多有变大现象,多数细胞飘浮。台盼蓝和 DAPI 染色剂对正常细胞、35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对硫磷处理细胞进行染色,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与正常细胞无明显差异,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞显著凋亡,说明 35

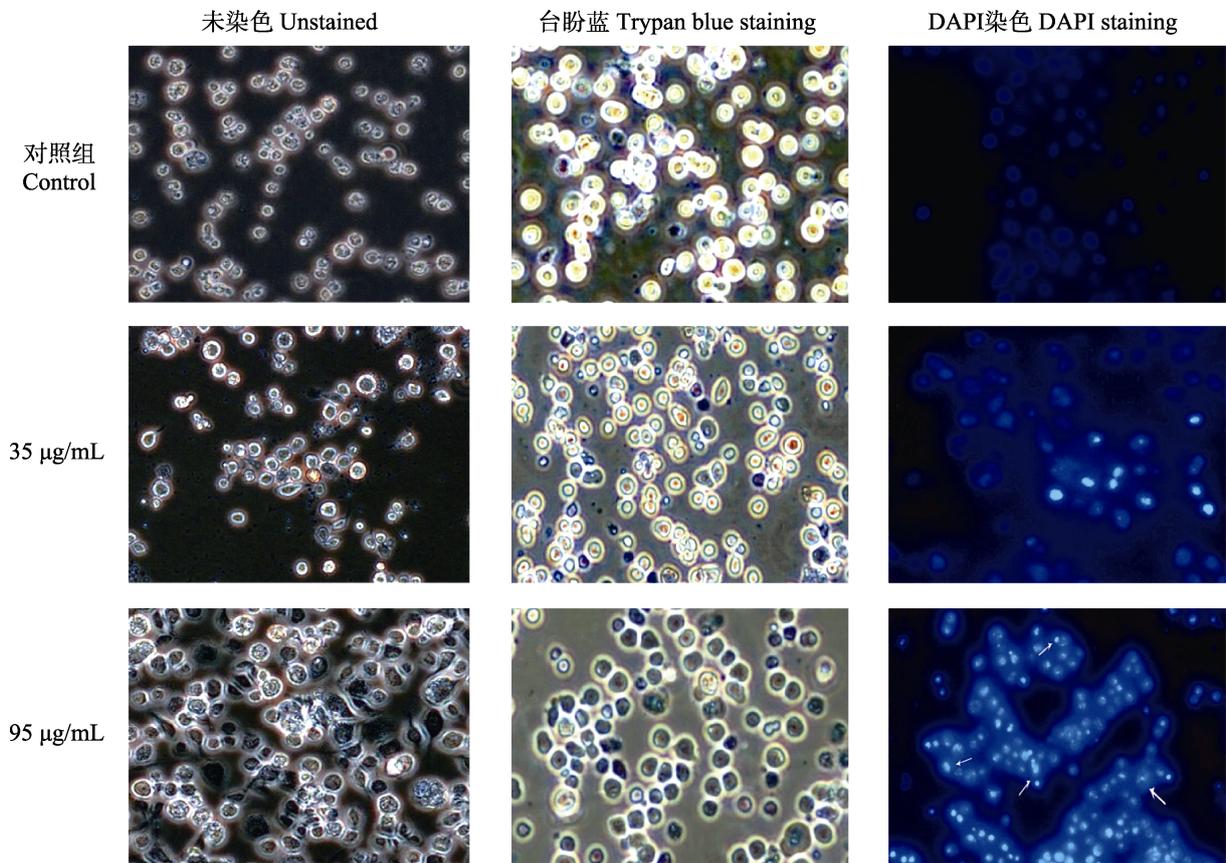


图 1 倒置显微镜下正常 S2 细胞和对硫磷处理细胞的形态变化及细胞凋亡

Fig. 1 Morphological changes and apoptosis in S2 cells induced by parathion, observed by inverted phase contrast microscope

倒置显微镜下正常细胞:表面光滑的圆形小球,台盼蓝不染色,DAPI 染色均匀;高浓度对硫磷处理细胞:表面皱缩,整体变大,死细胞被台盼蓝染成蓝色,且 DAPI 将死细胞的细胞核染的比正常细胞更亮。

Normal cells under inverted microscope: smooth surface of the round ball, Trypan blue don't dye, DAPI uniform dyeing; Parathion processing cells: surface shrinkage, overall, dead cells stained by Trypan blue, and the nucleus dye more bright by DAPI.

$\mu\text{g/mL}$ 浓度对硫磷处理细胞后应激反应强, 细胞凋亡少; 高浓度的对硫磷会破坏细胞结构, 导致细胞死亡。

2.2 细胞存活率的测定及筛选

通过细胞计数及 CCK-8 试剂盒的测定测得在不同浓度对硫磷处理下黑腹果蝇细胞的存活率, 其存活状况呈现如图 2。通过多次实验筛选出一系列浓度处理后细胞活力相对较高的浓度为 $35 \mu\text{g/mL}$, 在此浓度下细胞活力较其他浓度强, 按 CCK-8 试剂盒的测定则说明细胞毒性在此浓度下最弱, 则 $35 \mu\text{g/mL}$ 对硫磷处理细胞应激基因发挥了应激作用, 结合免疫荧光细胞凋亡计数结果, 所以选用 $35 \mu\text{g/mL}$ 对硫磷处理细胞做高通量基因表达分析。

2.3 基因表达谱检测与分析

基因表达谱检测 $35 \mu\text{g/mL}$ 对硫磷处理的细胞与正常细胞及只有溶剂甲醇处理细胞基因表达的变化, 以下所说的处理组即为对硫磷处理细胞的基因表达, 对照组则为溶剂甲醇处理和正常细胞的共同表达且表达相同的基因。对照组与处理组相比, 扩增表达的基因有 481 个, 差异显著表达的基因有 52 个, 包括氧化应激反应、解毒

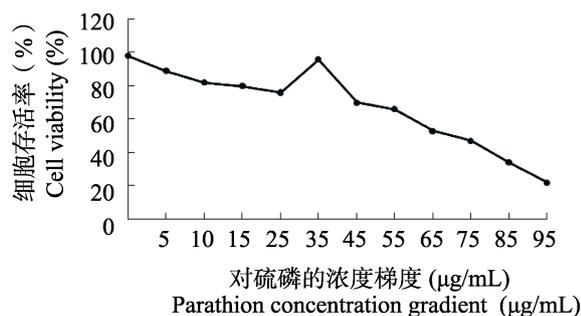


图 2 CCK-8 试剂盒检测细胞毒性变化

Fig. 2 Cytotoxicity assay using CCK-8 kit

CCK-8 试剂盒检测一系列浓度下细胞毒性的变化, 筛选出细胞具有强活力的浓度为 $35 \mu\text{g/mL}$, 在此浓度下, 细胞存活率高, 细胞毒性低。

Using CCK 8 concentration of the kits series of the change of cytotoxicity, the concentration of the selected cells have strong resistance to $35 \mu\text{g/mL}$, under the concentration, the cell viability is higher, so cytotoxicity is low.

反应和免疫相关等基因的差异表达。差异表达的基因中 36 个表达上调 16 个表达下调。包括细胞色素 P450 的两个基因 *Cyp6a8* 和 *Cyp4e1* 分别有 3.34 倍和 2.04 倍的上调表达, 一种气味结合蛋白 *Obp99a* 表达上调 2.5 倍, 以及转运蛋白基因 MFS3 和基因 CG5321 表达也上调了 2.5 倍以上。NADP(H) 类: ND3、ND4、ND5、ND6 和 ND4L 表达量出现了 2~3.11 倍不同程度的下调; ATP 合成酶类, 细胞色素 b 基因表达下调也在 2 倍以上。基因 *Cyp4ad1*、*Cyp-4d8* 和 *Cyp313a4* 扩增表达; GST 类基因中有 GSTE6 和 GSTE7 基因扩增表达。同时许多氧化还原酶类的脱氢酶也出现了不同程度的差异表达。以上基因根据泊松分布模型统计学分析均有显著差异。

2.4 实时荧光定量检测差异基因表达

$35 \mu\text{g/mL}$ 对硫磷处理细胞与正常细胞提取总 RNA, 将 RNA 反转录成 cDNA 进行实时荧光定量检测, 从 36 个表达上调的基因中选出 4 个表达上调 2 倍以上的基因 Cytochrome P450-6a8 (*Cyp6a8*), Major Facilitator Superfamily Transporter 3 (MFS3), Odorant-binding protein 99a (*Obp99a*) 和 CG5321; 16 个表达下调基因中选出 4 个表达下调 2 倍以上的基因 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4), NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3), ATP synthase F0 subunit 6 (ATP6) 和 Cytochrome b (CYTB) 做 qRT-PCR (表 1), 验证表达谱数据的可靠性, 也为了进一步验证基因的表达量变化。以下实验结果均为 3 次生物学重复实验, 实验数据根据 T 检验统计学分析计算差异倍数。qRT-PCR 结果如图 3。qRT-PCR 所检验 8 个基因的差异表达与基因表达谱检测结果变化趋势一致, 验证了基因表达谱的可靠性, 推测以上差异显著表达的 8 个基因与果蝇对对硫磷的应激作用相关。

2.5 实时荧光定量测定对硫磷用量、*Cyp6a8* 基因表达水平和细胞毒性

由于基因表达谱分析与 qRT-PCR 均测得 *Cyp6a8* 基因的表达有显著差异, 所以选用

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序
Table 1 Primer sequences used for real-time quantitative RT-PCR

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
CytochromeP450-6a8 (<i>Cyp6a8</i>)	Sense, <i>Cyp6a8</i> Anti-sense, <i>Cyp6a8</i>	AGAAGACCGACAAGCAC CCAGTCAGGGGGTAGAA
Major Facilitator Superfamily Transporter 3(MFS3)	Sense, MFS3 Anti-sense, MFS3	ACAAGAAGTCCTACACAT CACCATAACCGTCACAGTC
Odorant-bindingprotein 99a(<i>Obp99a</i>)	Sense, <i>Obp99a</i> Anti-sense, <i>Obp99a</i>	ACAAGAAGTCCTACACA ACCATAACCGTCACAGTC
CG5321	Sense, CG5321 Anti-sense, CG5321	TGGAAGGTGGTGCCAAGAA AAGGGGAGCGAGGCAGTTAG
NADH dehydrogenase subunit4(ND4)	Sense, ND4 Anti-sense, ND4	GTTGGAGGAGCTGCTATA GTTTATGTTCTTCTGGGTTA
NADH dehydrogenase subunit3(ND3)	Sense, ND3 Anti-sense, ND3	ATCCAAAATCTTCATCTC TTCATGGTATAATCCAAT
ATP synthase F0 subunit 6 (ATP6)	Sense, ATP6 Anti-sense, ATP6	ATTTGCTCATTTAGTTCC AAGATCCTGTATTTCTCA
Cytochrome b(CYTB)	Sense, CYTB Anti-sense, CYTB	CGAGGAATTTATTACGGT GTGGCATTATCAACAGCA

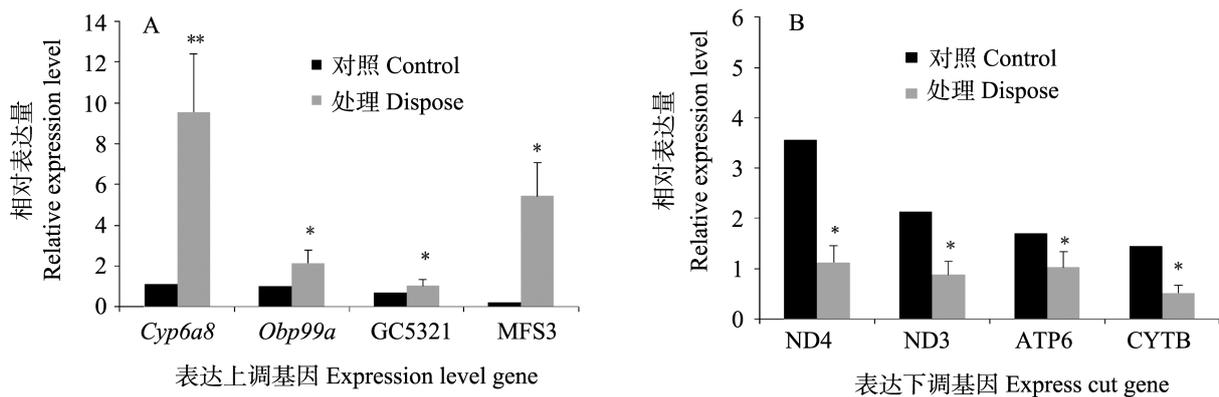


图 3 实时荧光定量 (qRT-PCR) 验证 mRNA 水平基因差异表达

Fig. 3 qRT-PCR analysis differential expression ratio of selected targetsgenes form RNA level

选取差异表达的 8 个基因 *Cyp6a8*, *Obp99a*, CG5321, MFS3, ND4, ND6, ATP6 和 CYPB, 通过实时荧光定量验证在 35 ppm 对硫磷处理下基因的表达量变化。图中数据为平均值 \pm 标准误; 星号表示处理组与对照组相比有显著差异 (Turkey 检验, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$); 选取 18S rRNA 为内参标准基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。下图同。
qRT-PCR validation differential expression ratio of selected targets *Cyp6a8*, *Obp99a*, CG5321, MFS3, ND4, ND6, ATP6 and CYPB under 35 ppm treatment its express change of the quantity. Data in the figure are mean \pm SE. The asterisk indicates significant difference exits between control and processing ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$, Turkey's test). The relative expression level of four genes are determined by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and 18S rRNA is selected as the housekeeping gene. The same below.

Cyp6a8 基因检测细胞在一系列对硫磷浓度下的细胞活力, 验证 CCK-8 筛选浓度的可靠性及 *Cyp6a8* 基因与细胞毒性的相关性。根据已经报道的 *Cyp6a8* 基因序列设计引物 (序列同上), qRT-PCR 分析不同剂量对硫磷处理细胞中

Cyp6a8 基因的表达水平 (图 4), 结果表明, 不同剂量对硫磷处理, 细胞中 *Cyp6a8* 基因的表达水平有明显差异, 其结果与 CCK-8 筛选的细胞活力浓度相一致。各浓度对硫磷刺激细胞后 *Cyp6a8* 基因表达量均增加, 在 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时基因

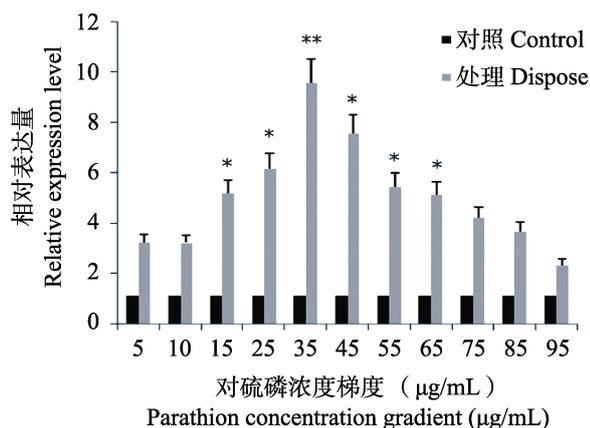


图4 不同浓度对硫磷处理细胞后 *Cyp6a8* 的表达量
Fig. 4 Different concentrations of parathion cells after the expression of *Cyp6a8* expression

一系列浓度梯度检测差异基因 *Cyp6a8* 的表达量在 35 µg/mL 上调较其他浓度极显著变化。

A series of concentrations check under 35 µg/mL parathion stress *Cyp6a8* gene expression in increase than other concentration changed.

表达极显著,这与细胞在此浓度下的存活率呈线性相关,说明产生应激反应,可能该基因参与了解毒反应。

3 讨论

本研究通过观察细胞的形态变化,免疫荧光细胞凋亡分析,细胞毒性检测以及基因表达谱分析,检测对硫磷诱导下细胞的基因表达变化。研究表明,对硫磷对果蝇细胞有较明显的增殖抑制作用,细胞形态、骨架结构发生明显变化,使细胞的贴壁能力降低。细胞是构成生物体的基本单位,对硫磷对细胞的形态结构抑制作用可能是影响害虫生长发育的原因之一,从而影响其正常的生命活动。

在果蝇中,一些基因形成一套自动调整解毒和代谢的途径,包括 P450 基因、GST 基因、UGT 基因和跨膜转运蛋白基因的表达变化 (Claridge, 2001; Daborn *et al.*, 2002, 2007)。本研究通过基因表达谱分析,发现 P450、GST、*Obp99a*、MFS3、NADP (H)、ATP 合成酶等基因在对硫磷胁迫后表达水平发生了明显变化。

细胞色素 P450 单加氧酶参与昆虫正常生长

所需的各种外激素和性激素的合成,细胞色素 P450 酶在有毒环境中可降解有毒物质,使其失活 (Saner *et al.*, 1996)。谷胱甘肽转移酶类在解毒中发挥重要作用,参与内源性和异型生物化合物胞内运输并参与氧化应激。谷胱甘肽转移酶解毒代谢是通过促进杀虫剂还原脱氯化氢或通过共轭反应使其降解成水溶性代谢物,使其更容易排出 (Enayati *et al.*, 2005)。神经元是嗅觉的功能性组织,由 Odorant-binding (*Obp*) 介导细胞蛋白质分泌, *Obp99a* 是表达模式和转录控制元件 (Hekmat-Scafe *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Kula-Eversole *et al.*, 2010; Rebeiz *et al.*, 2011), *Obp99a* 嗅觉蛋白基因表达与苯甲醛反应的变化有关 (Wang *et al.*, 2010)。CG5321 基因表达可调控肉碱合成、参与赖氨酸通路、新陈代谢、氨基酸代谢等生物反应,并参与调解免疫应答 (Palanker *et al.*, 2009; Vermeulen *et al.*, 2013)。NADH 类参与代谢途径、泛醌氧化还原、线粒体反应体系等,与 ATP 合成酶均参与氧化磷酸化反应,与细胞能量代谢密切相关。

MFS 转运蛋白是多肽跨膜转运蛋白,运输物质包括碳水化合物和氨基酸,也负责有机阴离子谷氨酸、邻苯二甲酸、磷酸等的转运 (Bergwitz *et al.*, 2012), MFS 的表达有些还调解抗生素表达。MFS 转运蛋白参与转运磷酸,而磷酸 [HPO_4^{2-} 和 H_2PO_4^-] 在细胞中是必需的,参与合成 DNA 和膜脂、生成高能磷酸、胞内信号转导等 (Bevington *et al.*, 1992), MFS 转运蛋白对体内磷酸盐平衡起关键作用 (Bringhurst and Leder, 2006), 这一系列的反应都需要 MFS 蛋白的参与。本研究用对硫磷处理细胞后,以上代谢与转运基因都发生了显著变化,这些基因参与的生理生化反应、应激反应可能与解毒相关。

杀虫剂抗性昆虫会高表达一系列的解毒基因,表明抗药性与解毒基因表达之间具有相关性。例如, *Cyp6g1* 的过表达足以提供对 DDT 的抗性,而 *Cyp12a4* 的过表达导致对鲁芬奴隆 (Lufenuron) 的抗性 (Daborn *et al.*, 2002; Bogwitz *et al.*, 2005)。代谢酶由许多酶超家族

组成, 包括谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (GCL)、环氧化物水解酶 (EH)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (UGT)、磺基转移酶 (SULT)、NADPH:醌还原酶 1 (NQO1)、DDT-脱氯化氢酶等, 催化活性的解毒代谢产物转换或共轭成更亲水和稳定的产物 (Talalay, 1989)。

本研究通过采用 DGE 新技术, 从对硫磷应激果蝇细胞中检测出 481 个基因的表达水平发生了变化。选择其中部分基因进行了 qRT-PCR 验证, 发现基因表达水平、药剂用量和细胞毒性之间存在明确的对应关系。初步确定一些基因的应激表达, 及其在应激反应中的表达量, 推测其与解毒、抗性相关, 为深入研究有机磷类杀虫剂的作用机理和抗性新靶标的筛选奠定了研究基础。但这些差异表达基因的解毒作用机理以及与抗药性的关系尚需进一步研究。

参考文献 (References)

- Bergwitz C, Rasmussen MD, DeRobertis C, Wee MJ, Sinha S, Chen HH, Perrimon N, 2012. Roles of major facilitator superfamily transporters in phosphate response in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7(2): e31730.
- Bevington A, Kemp GJ, Graham R, Russell G, 1992. Phosphate-sensitive enzymes: possible molecular basis for cellular disorders of phosphate metabolism. *Clin. Chem. Enzym. Comms.*, 44(4): 235–257.
- Bogwitz MR, Chung H, Magoc L, Rigby S, Wong W, O'Keefe M, Daborn PJ, 2005. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36): 12807–12812.
- Bringhurst FR, Leder BZ, 2006. Regulation of calcium and phosphate homeostasis//De Groot LJ, Jameson JL (eds.). *Endocrinology*. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 805–843.
- Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N, Young MW, 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron*, 32(4): 657–671.
- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, Batterham P, 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(5): 512–519.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Wilson TG, 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590): 2253–2256.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1): 3–8.
- Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12(9): 1357–1369.
- Kula-Eversole E, Nagoshi E, Shang Y, Rodriguez J, Allada R, Rosbash M, 2010. Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30): 13497–13502.
- Mulbry WW, Karns JS, Kearney PC, Nelson JO, McDaniel CS, Wild JR, 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5): 926–930.
- Palanker L, Tennessen JM, Lam G, Thummel CS, 2009. *Drosophila* HNF4 regulates lipid mobilization and β -Oxidation. *Cell Metabolism*, 9(3): 228–239.
- Rebeiz M, Jikomes N, Kasner VA, Carroll SB, 2011. Evolutionary origin of a novel gene expression pattern through co-option of the latent activities of existing regulatory sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25): 10036–10043.
- Saner C, Weibel B, Würgler FE, Sengstag C, 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(1): 46–58.
- Talalay P, 1989. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.*, 28: 237–250.
- Tang ZH, Zhou CL, Wu SC, Zheng HZ, Shen HL, Gu YZ, 1992. The drug-fast of *Plutella xylostella* (L.) and the function of synergist in Shanghai area. *Journal of Plant Protection*, 19(2): 179–185. [唐振华, 周成理, 吴世昌, 郑惠中, 沈惠良, 顾言真, 1992. 上海地区小菜蛾的抗药性及增效剂的作用. *植物保护学报*, 19(2): 179–185.]

Vermeulen CJ, Sørensen P, Kirilova GK, Loeschcke V, 2013. Transcriptomic analysis of inbreeding depression in cold-sensitive *Drosophila melanogaster* shows upregulation of the immune response. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(9): 1890–1902.

Wang P, Lyman RF, Mackay TF, Anholt RR, 2010. Natural variation in odorant recognition among odorant-binding proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 184(3): 759–767.

Wang P, Lyman RF, Shabalina SA, Mackay TF, Anholt RR, 2007. Association of polymorphisms in odorant-binding protein genes with variation in olfactory response to benzaldehyde in *Drosophila*. *Genetics*, 177(3): 1655–1665.

Xiang YP, Wang XP, 2001. Sensitivity and synergist of function and cross resistance of *Plutella xylostella* (L.) to Avermectin in the Changsha area. *Plant Protection*, 27(3): 21–23.[向延平, 王小平, 2001. 长沙地区小菜蛾对阿维菌素的敏感性、交互抗性及增剂的作用. *植物保护*, 27(3): 21–23.]

Yu SJ, 1993. Inheritance of insecticide resistance and microsomal oxidases in the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Journal of Economic Entomology*, 86(3): 680–683.

Zhong LC, Shun PL, Guo PF, 2001. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4922–4925.



甘薯蚁象 *Cylas formicarlus* (F.)

甘薯蚁象隶属于鞘翅目 Coleoptera 锥象科 Brentidae，是危害甘薯的重要害虫，成虫和幼虫均危害甘薯，而以幼虫在薯块内取食危害最为严重，常造成甘薯产量损失达 20%以上。成虫体长 5~8 mm，体形类似蚂蚁，所以也叫甘薯蚁象。前胸、触角末节和足桔红色，身体其余部门为蓝黑色有金属光泽。头部延伸成喙，触角 10 节；前胸长为宽的 2 倍，基部 1/3 处缢缩成颈状；腹部长卵形，鞘翅隆起，表面具小刻点。甘薯小象主要以成虫、幼虫和蛹等在储藏薯块中越冬，成虫也可在田间土缝、杂草中越冬。该虫国外分布在北美洲、澳洲、亚洲和非洲，我国的广东、广西、海南、云南、福建、台湾、浙江、江西、湖南、贵州等省区均有分布，是许多地区甘薯的主要害虫。

(张润志 中国科学院动物研究所)