

杀虫药剂毒理专栏

五种鳞翅目害虫中抗药性相关基因的 转录组学分析*

刘莹** 王娜 张赞 李飞***

(南京农业大学植物保护学院 南京 210095)

摘 要 随着测序技术的发展,昆虫转录组数据不断积累,在昆虫学研究中的应用也越来越广泛。在害虫抗药性的研究中,转录组数据分析也是重要的最新研究手段。本文通过对5种鳞翅目害虫转录组的生物信息学分析,鉴定出13种与抗药性相关的基因,发现细胞色素P450基因序列数量最多,共887条。另外,谷胱甘肽S-转移酶、鱼尼丁受体、氨肽酶N、糖基转移酶相关的基因序列多于100条。同时,对这5种鳞翅目昆虫中部分Bt受体相关的基因做了多序列比对和进化分析。分析认为,从多物种、多基因的角度提出对农药抗性的系统性研究,是害虫抗性研究的发展趋势。

关键词 转录组, 抗药性基因, Bt受体, 系统分析

Application of transcriptome in insect resistance research

LIU Ying** WANG Na ZHANG Zan LI Fei***

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract With the development of sequencing technology, the number of known insect transcriptome sequences has increased and transcriptome data has become more useful in entomology, including research on insect resistance. Here, we describe thirteen types of gene related to insecticide resistance in five Lepidopteran insects. In total, 887 P450 gene sequences have been found. The numbers of Glutathione S-transferase, ryanodine, aminopeptidase N and glycosyltransferase genes alone exceed 100. Multiple sequence alignment and evolutionary analysis of Bt receptor genes has been conducted. We suggest that systematic analysis of multiple genes in single, or multiple, species will become possible in resistance research and that this will be a promising direction for future research.

Key words transcriptome, Bt receptor, resistance gene, systematic analysis

随着杀虫剂的大量使用,昆虫对农药产生了不同程度的抗性,导致田间防治的困难,成为生产中急需解决的重要问题。已有研究表明,昆虫对杀虫剂产生抗性主要与代谢增强和靶标变构有关。而由代谢增强导致的代谢抗性具有广谱性,与昆虫对杀虫剂交互抗性的形成密切相关。同时,代谢抗性在昆虫低水平或极低水平抗性形成中起主要作用(Ma *et al.*, 2010)。

目前,害虫产生杀虫剂抗性的主要机制有:1)

代谢抗性:害虫体内解毒代谢酶的活性增强,提高了降解杀虫剂的能力。与抗性相关的解毒代谢酶基因一般涉及酯酶、谷胱甘肽S-转移酶及多功能氧化酶等;2)靶标抗性:编码杀虫剂靶标蛋白的基因结构发生改变,使靶标蛋白对杀虫剂的敏感性降低,如kdr抗性、乙酰胆碱酯酶基因突变导致对有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性等(French-Constant *et al.*, 2004; Puinean *et al.*, 2010)。例如,目前已发现有60种以上的昆虫对

* 资助项目:国家自然科学基金(31171843)。

** E-mail: 2011102133@njau.edu.cn

*** 通讯作者, E-mail: lifei@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-29, 接受日期: 2012-03-06

有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性是由于编码乙酰胆碱酯酶的基因突变造成的 (Oakeshott *et al.*, 2005)。一般认为,表皮抗性和行为抗性并不是主要的抗性机制。

从理论上来说,害虫对杀虫剂产生抗性是必然的趋势。而抗药性研究的重要目的是延缓抗性的形成,在轮换农药使用时避免交互抗性。通常,目前的研究思路为测定室内毒力、代谢酶活力及基因表达丰度,克隆杀虫剂靶标基因,进行害虫抗药性遗传研究及杀虫剂抗性机理研究,为抗药性监测与治理提供一定的理论依据。这一研究思路从生测水平,生化水平和分子生物学分别测定了抗性倍数、酶活力和基因表达水平变化或突变等,是比较全面完善的。但是,害虫的抗性水平是代谢抗性和靶标抗性的综合表型。而在上述研究方案中,受限于序列获得的困难,往往只研究某一个或几个基因,并将代谢抗性和靶标抗性割裂开来分析。组学技术的出现使研究人员有可能对所有抗性相关的基因开展系统的分析。本文以 5 种鳞翅目害虫的转录组分析入手,介绍组学技术在害虫抗药性中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 测序与组装

5 种鳞翅目昆虫二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas*、甜菜夜蛾 *Laphygma exigua*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 转录组的测序由深圳华大基因公司完成。实验室利用 Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) 进行重新组装和注释分析。转录组数据另文发表。

1.2 序列搜索

1) 将 5 种鳞翅目昆虫转录组测序结果用 NCBI 中的本地 Blast 与 Swissport 蛋白数据库比对,期望值设置为 0.00001,得到注释基因。2) 在转录组中搜索与羧酸酯酶、细胞色素 P450、谷胱甘肽 S-转移酶、乙酰胆碱酯酶、乙酰胆碱受体、钠离子通道、 γ -氨基丁酸、鱼尼丁受体和 Bt 毒素受体碱性磷酸酶、氨肽酶 N、钙粘蛋白、糖脂、糖基转移酶相关的基因。并提取序列。

1.3 进化分析

采用 MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) 序列分析软件中的 ClustalW (Kohli and Bachhawat, 2003) 程序对 Bt 受体相关的基因序列进行比对。用 MEGA5 中的邻位相连法构建分子进化树,并采用 Bootstrap test 对进化树中节点的置信值进行评估,从而确定进化树各分支的可靠性,Bootstrap 值设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 解毒代谢酶相关基因

用 Swissport 数据库注释的序列中搜索二化螟、三化螟、稻纵卷叶螟、小菜蛾、甜菜夜蛾中找到的解毒代谢酶相关基因(表 1)。结果显示,在这 5 种鳞翅目昆虫中细胞色素 P450 的基因数目远远多于羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶基因,这与细胞色素 P450 酶在昆虫物质代谢过程中极其重要的地位有关。这些解毒代谢基因的扩增往往会影响到害虫对杀虫剂的抗性。虽然基因数目增多与表达量没有必然的关系,但基因数目增多为代谢酶的解毒能力增强提供了可能,使害虫更容易产生抗药性。

表 1 5 种鳞翅目昆虫转录组中解毒代谢酶相关基因的数目统计
Table 1 Statistic of metabolic detoxification genes in five Lepidoptera insect

	羧酸酯酶 Carboxylesterase	多功能氧化酶 Cytochrome P450	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase
稻纵卷叶螟 <i>C. medinalis</i>	10	208	33
二化螟 <i>C. suppressalis</i>	11	95	15
三化螟 <i>S. incertulas</i>	7	195	28
甜菜夜蛾 <i>L. exigua</i>	17	219	49
小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	7	170	22
总数 Total	52	887	147

2.2 杀虫剂靶标基因

表 2 统计了这 5 种鳞翅目昆虫转录组中的杀虫剂靶标基因数目。昆虫对农药产生抗性与这些靶标基因的突变有重要的关系。从表 2 可以发现,乙酰胆碱酯酶在稻纵卷叶螟中多达 23 条序

列,在小菜蛾也有 20 条序列。但目前的研究普遍认同昆虫中只有 2 个乙酰胆碱酯酶基因,这主要是因为转录组测序的质量不高导致无法拼接出基因全长造成的。由于序列组装的问题,有可能导致某个基因被拼接成多个序列片段。

表 2 5 种鳞翅目昆虫转录组中杀虫剂靶标基因的数目统计
Table 2 Statistic of pesticide target genes in five Lepidoptera insects

	乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase	乙酰胆碱受体 Acetylcholine	钠离子通道 Sodium channel	Γ-氨基丁酸受体 Gamma-aminobutyric acid	鱼尼丁受体 Ryanodine
稻纵卷叶螟 <i>C. medinalis</i>	23	20	10	17	39
二化螟 <i>C. suppressalis</i>	9	8	6	5	19
三化螟 <i>S. incertulas</i>	13	14	4	8	19
甜菜夜蛾 <i>L. exigua</i>	9	11	4	4	9
小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	20	10	5	6	23
总数 Total	74	63	29	40	109

2.3 Bt 受体相关基因

Bt 受体相关基因是当前的研究重点和热点。利用转录组数据,对碱性磷酸酶、氨肽酶 N、钙粘蛋白、糖脂类、糖基转移酶进行搜索和分析,结果见表 3。通过对碱性磷酸酶、氨肽酶 N、钙粘蛋白、

糖脂类、糖基转移酶的数目统计可以看出,在这 5 种鳞翅目昆虫体内都存在有这 5 类 Bt 受体相关的基因,并且糖基转移酶的数目较多,其次是氨肽酶 N、碱性磷酸酶等,而钙粘蛋白和糖脂类的基因数量较少。

表 3 5 种鳞翅目昆虫转录组中 Bt 受体相关基因的数目统计
Table 3 Statistic of Bt receptor genes in five Lepidoptera insects

	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	氨肽酶 Aminopeptidase N	钙粘蛋白 Cadherin	糖脂类 Glycolipid	糖基转移酶 Glycosyltransferase
稻纵卷叶螟 <i>C. medinalis</i>	22	32	16	4	61
二化螟 <i>C. suppressalis</i>	13	16	7	1	30
三化螟 <i>S. incertulas</i>	21	13	8	2	17
甜菜夜蛾 <i>L. exigua</i>	7	32	14	1	28
小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	15	15	13	3	39
总数 Total	78	108	58	11	175

2.4 Bt 受体相关基因的进化分析

分别挑选 5 个物种中各种 Bt 受体相关基因最长的序列 2~3 条,用 MAGE5 软件构建 NJ 进化树(图 1),图 1 中显示的数字表示该分支在用 Bootstrap 方法进行评估时的重复次数。对碱性磷酸酶的进化分析如图 1 中 A 所示,稻纵卷叶螟和三化螟的基因分属于 2 个大的分支,另外 3 个物种的基因则在这两大分支中都有分布。甜菜夜蛾序列 1 和 3、稻纵卷叶螟序列 1 和 2 在同种昆虫中保守度最高。在图 1(B)中,这 5 种昆虫的氨肽酶 N 基因也分为两大分支,三化螟的 1 序列在第二分支中单独形成一支。5 种鳞翅目昆虫转录组中

钙粘蛋白相关基因的进化关系如图 1 中 C。在二化螟中选取的 3 条钙粘蛋白基因序列之间的进化关系较近。而在图 1(D)中,糖基转移酶相关基因在这 5 种昆虫的进化关系大致可分为两大类,二化螟的序列 3 在第一大类中单独形成一支,可能另外 11 条序列是由二化螟序列 3 进化而来的。在这 5 种昆虫中,与糖脂酶相关的基因较少,因此只选取了 9 条序列做分子进化分析(图 1:E)。只有在小菜蛾中选取的 2 条序列位于同一大分支上,其他物种中的该基因序列则散布在两大分支内。其中小菜蛾的糖脂类基因序列 2 在第一大分支中独立形成一支。

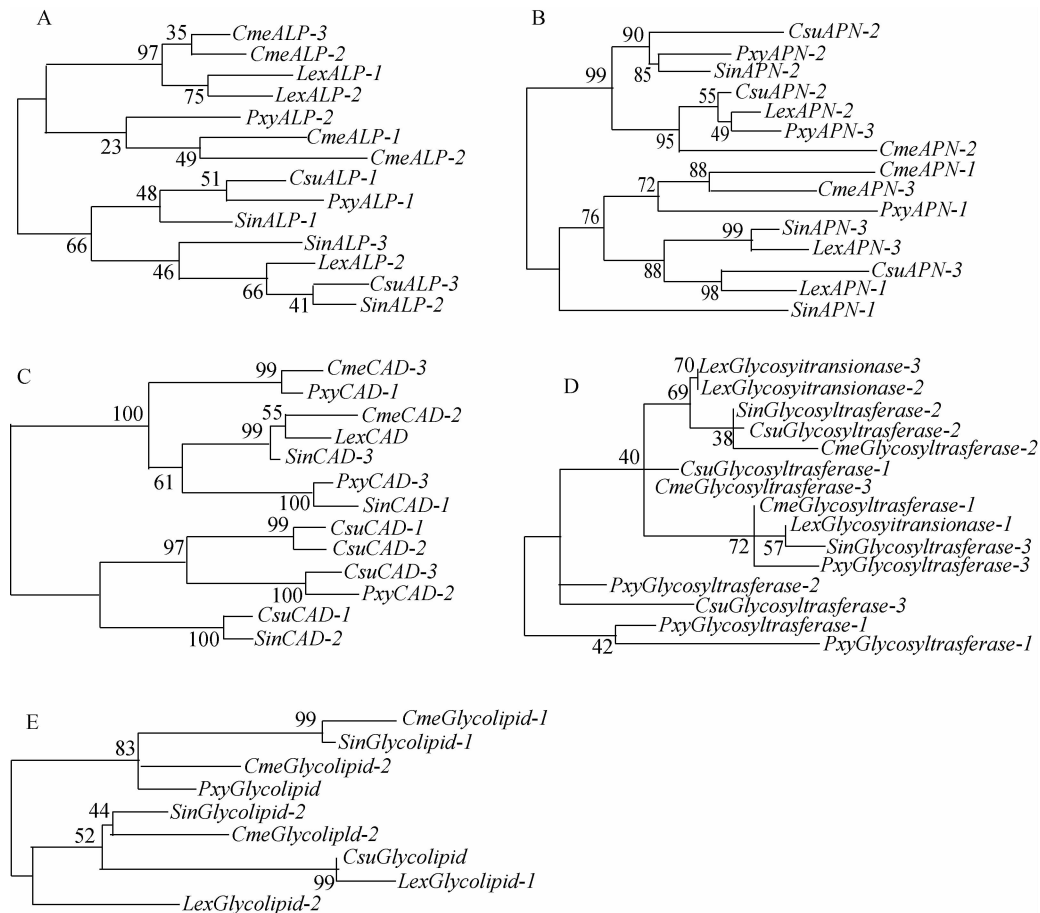


图 1 基于 5 种鳞翅目转录组 Bt 受体相关基因的分子进化树

Fig. 1 The cladograms of Bt receptor related genes based on transcriptome of five Lepidoptera insects

Csu:二化螟 *C. suppressalis*; Sin:三化螟 *S. incertulas*; Cme:稻纵卷叶螟 *C. medinalis*; Lex:甜菜夜蛾 *L. exigua*; Pxy:小菜蛾 *P. xylostella*; ALP:碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase; APN:氨肽酶 N Aminopeptidase N; CAD:钙粘蛋白 Cadherin; Glycolipid:糖脂类; Glycosyltransferase:糖基转移酶; 图中显示的数字表示该分支在用 Bootstrap 方法进行评估时的重复次数 figures in the picture means the number of replications of this branch in Bootstrap method.

3 讨论

在传统的害虫抗药性研究中,主要是单个基因的研究为主(Zhang *et al.*, 2010; Khajuria *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Karatolos *et al.*, 2012)。通过对单个基因的克隆和表达分析等,来研究抗性与该基因表达或突变的相互关系。但由于害虫的抗性形成是代谢酶活性增强和靶标基因突变的综合体现,传统的思路往往将不同抗性机制单独分析,无法实现系统研究的目的。即使在代谢抗性或靶标抗性研究中,也往往只是集中于某一个或几个基因。

组学技术的进步改变了这一传统思路。对昆虫转录组的测定和深入分析,则有可能同时获得所有的解毒代谢酶基因、靶标基因的序列信息,为系统全面地研究害虫解毒代谢酶基因的增强以及靶标基因的突变分析提供了可能。从表面上,这仅仅是一个数量的变化,但量变可能导致质变。传统的思路是对引起害虫抗性的单个或几个因素进行深入研究,而组学技术引入害虫抗药性研究后,则开始对引起害虫抗性形成的重要因素进行了全面系统的分析。作者分析认为,这将是未来害虫抗药性研究的发展趋势。

随着高通量测序技术的产生和发展,继 2000 年黑腹果蝇的全基因组测序(Adams *et al.*, 2000)完成以后,很多昆虫基因组和转录组序列陆续被测定。这些基因信息在昆虫的抗药性研究中是很好的序列资源。本文中对 5 种鳞翅目昆虫 13 个抗性相关基因进行搜索,对害虫抗性相关基因进行了系统全面的分析,同时也比较分析了 5 种害虫抗药性相关基因的进化关系,可为昆虫抗药性及其进化提供了重要的线索。

在转录组数据分析中,不仅应该注意转录组数据对害虫抗药性研究的促进,也应该了解转录组数据的特点以避免误导。如前所述,由于转录组测序技术的限制,只能获得基因的序列片段。尽管如此,由于同源基因的数目不同,其获得的转录组序列片段也会有不同的变化。同源基因越多,在相同测序条件下获得的基因的片段也越多。因此,基因的同源基因数目与转录组片段的数量有一定的正相关。在表 1 中, P450 相关基因的片段普遍较多。截止到 2011 年初,在 NCBI 上可以搜索到的 P450 蛋白序列已有 102 条,其中包括 85

条家蚕 *Bombyx mori* 序列和 17 条野蚕 *B. mandarina* 序列(艾均文等, 2011)。在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中搜索到 112 个、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 有 164 个、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 有 144 个及西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 48 个(Richards *et al.*, 2008)。而对于昆虫体内对 Bt 受体相关基因的搜索表明(表 3),由于糖基转移酶在解毒过程中起到的重要作用,例如解除摄入的植物化感物质的毒性,其相关基因的数目是最多的。在 NCBI 搜索糖基转移酶的结果中,家蚕有 42 个,果蝇 *Drosophila melanogaster* 中有 33 个,冈比亚按蚊中搜索到 22 个、西方蜜蜂 12 个(刘增虎, 2010)。以上数据也验证了基因的同源基因数目与转录组片段的数量有一定的正相关。

参考文献 (References)

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR,

- Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461):2185—2195.
- Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G, 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet*, 20(3):163—170.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.*, 29(7):644—652.
- Karatolos N, Williamson MS, Denholm I, Gorman K, Ffrench-Constant RH, Bass C, 2012. Over-expression of a cytochrome P450 is associated with resistance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *PLoS ONE*, 7(2):e31077.
- Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Siegfried BD, Zhu KY, 2011. Identification of a novel aminopeptidase P-like gene (OnAPP) possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*). *PLoS ONE*, 6(8):e23983.
- Kohli DK, Bachhawat AK, 2003. CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics. *Nucleic. Acids Res.*, 31(13):3501—3502.
- Ma GY, Sun XF, Zhang YL, Li ZX, Shen ZR, 2010. Molecular cloning and characterization of a prenyltransferase from the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(7):552—561.
- Oakeshott JG, Devonshire AL, Claudianos C, Sutherland TD, Horne I, Campbell PM, Ollis DL, Russell RJ, 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chem. Biol. Interact.*, 157/158:269—275.
- Pauchet Y, Wilkinson P, Vogel H, Nelson DR, Reynolds SE, Heckel DG, Ffrench-Constant RH, 2010. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Mol. Biol.*, 19(1):61—75.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C, 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet*, 6(6):e1000999.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R, Beeman RW, Gibbs R, Bucher G, Friedrich M, Grimmekhuijzen CJ, Klingler M, Lorenzen M, Roth S, Schroder R, Tautz D, Zdobnov EM, Muzny D, Attaway T, Bell S, Buhay CJ, Chandrabose MN, Chavez D, Clerk-Blankenburg KP, Cree A, Dao M, Davis C, Chacko J, Dinh H, Dugan-Rocha S, Fowler G, Garner TT, Garnes J, Gnirke A, Hawes A, Hernandez J, Hines S, Holder M, Hume J, Jhangiani SN, Joshi V, Khan ZM, Jackson L, Kovar C, Kowis A, Lee S, Lewis LR, Margolis J, Morgan M, Nazareth LV, Nguyen N, Okwuonu G, Parker D, Ruiz SJ, Santibanez J, Savard J, Scherer SE, Schneider B, Sodergren E, Vattahil S, Villasana D, White CS, Wright R, Park Y, Lord J, Oppert B, Brown S, Wang L, Weinstock G, Liu Y, Worley K, Elsik CG, Reese JT, Elhaik E, Landan G, Graur D, Arensburger P, Atkinson P, Beidler J, Demuth JP, Drury DW, Du YZ, Fujiwara H, Maselli V, Osanai M, Robertson HM, Tu Z, Wang JJ, Wang S, Song H, Zhang L, Werner D, Stanke M, Morgenstern B, Solovyev V, Kosarev P, Brown G, Chen HC, Ermolaeva O, Hlavina W, Kapustin Y, Kiryutin B, Kitts P, Maglott D, Pruitt K, Sapojnikov V, Souvorov A, Mackey AJ, Waterhouse RM, Wyder S, Kriventseva EV, Kadowaki T, Bork P, Aranda M, Bao R, Beermann A, Berns N, Bolognesi R, Bonneton F, Bopp D, Butts T, Chaumot A, Denell RE, Ferrier DE, Gordon CM, Jindra M, Lan Q, Lattorff HM, Laudet V, von Levetsow C, Liu Z, Lutz R, Lynch JA, da Fonseca RN, Posnien N, Reuter R, Schinko JB, Schmitt C, Schoppmeier M, Shippy TD, Simonnet F, Marques-Souza H, Tomoyasu Y, Trauner J, Van der Zee M, Vervoort M, Wittkopp N, Wimmer EA, Yang X, Jones AK, Sattelle DB, Ebert PR, Nelson D, Scott JG, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y, Zhu Q, Hogenkamp D, Dixit R, Jiang H, Zou Z, Marshall J, Elpidina E, Vinokurov K, Oppert C, Evans J, Lu Z, Zhao P, Sumathipala N, Altincicek B, Vilcinskis A, Williams M, Hultmark D, Hetru C, Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S,

- Schachtner J, Verleyen P, Raible F, Walden KK, Angeli S, Foret S, Schuetz S, Maleszka R, Miller SC, Grossmann D, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190):949—955.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10):2731—2739.
- Yu X, Wang M, Kang M, Liu L, Guo X, Xu B, 2011. Molecular cloning and characterization of two nicotinic acetylcholine receptor beta subunit genes from *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(4):163—178.
- Zhang L, Shi J, Shi X, Liang P, Gao J, Gao X, 2010. Quantitative and qualitative changes of the carboxylesterase associated with beta-cypermethrin resistance in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 156(1):6—11.
- 艾均文, 薛宏, 何行健, 孟繁利, 朱勇, 向仲怀, 2011. 家蚕细胞色素 P450 基因的研究进展. *昆虫学报*(8): 918—926.
- 刘增虎, 2010. 家蚕尿苷二磷酸—葡萄糖基转移酶基因 BmUGT496 的克隆和真核表达. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.