

黄曲条跳甲酯酶基因片段的克隆及序列分析^{*}

郑丽祯^{1,2**} 傅建炜^{1,2} 杨 广² 陈小龙² 钟小露² 尤民生^{2***}

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所 福州 350013; 2. 福建农林大学应用生态研究所 福州 350002)

摘 要 黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) 是十字花科蔬菜的主要害虫之一, 其抗药性问题日益严重, 克隆黄曲条跳甲的酯酶基因可为其抗性治理提供必要的科学依据。本文利用反转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 的方法得到一条 281 bp 的核酸片段, 再利用 3'-RACE 技术获得该基因片段的 3' 端 (1 468 bp), 编码 442 个氨基酸。核苷酸序列同源性分析表明, 与赤拟谷盗 *est1* 基因和杂拟谷盗 *est1* 基因的同源性最高, 为 71% (211/297), 与果蝇 *alpha-esterase5* 的同源性为 70% (156/222), 氨基酸序列与杂拟谷盗、赤拟谷盗、果蝇的酯酶基因的同源性分别为 43% (188/434)、43% (188/434)、33% (144/432)。从 BLAST 结果可初步推测该片段应为编码黄曲条跳甲酯酶基因的部分核苷酸序列, 该序列在 GenBank 中的登录号为 EU166919。

关键词 黄曲条跳甲, 抗药性, 酯酶基因, 克隆

Cloning and sequence analysis of the esterase gene fragment of the striped flea beetle, *Phyllotreta striolata*

ZHENG Li-Zhen^{1, 2**} FU Jian-Wei^{1, 2} YANG Guang² CHEN Xiao-Long²

ZHONG Xiao-Lu² YOU Min-Sheng^{2***}

(1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

2. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract The striped flea beetle (SFB), *Phyllotreta striolata* (Fabricius) is a major pest of cruciferous vegetables. The resistance of this pest to insecticides has been increasing in recent years. Cloning of the SFB esterase gene may provide a solid and scientific basis for developing strategies to manage pesticide resistance in this species. RT-PCR was undertaken to clone one nucleotide fragment of 281 bp, and the 3'-RACE used to obtain a 3'-sequence (1 468 bp of the fragment, GenBank accession number EU166919) encoded by 442 amino acids. Homological analysis revealed that the obtained fragment was most similar to the esterase1 genes of *Tribolium castaneum* and *T. confusum*, with a nucleotide identity of 71% (211/297). The cloned fragment was also 70% (156/222) identical with the *alpha-esterase5* gene of *Drosophila melanogaster*. The amino acid sequence had 43% (188/434), 43% (188/434) and 33% (144/432) similarity to the esterase genes of *T. confusum*, *T. castaneum* and *D. melanogaster*, respectively. It can therefore be inferred that the obtained fragment should be a partial nucleotide sequence of the SFB esterase gene.

Key words *Phyllotreta striolata*, insecticide resistance, esterase gene, cloning

黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) (鞘翅目 Coleoptera: 叶甲科 Chrysomelidae) 是广泛分布于世界各地的重要害虫。黄曲条跳甲成虫取食叶片形成小孔, 严重时可导致种苗毁灭; 幼虫在土壤中生活, 为害寄主植物的根部表皮, 可引起植

物枯萎死亡。近些年来, 在中国南方的一些菜区, 黄曲条跳甲的危害甚至超过小菜蛾, 成为影响十字花科蔬菜生产的头号害虫 (黄咏俏等, 2005; 刘芸等, 2005)。目前对黄曲条跳甲的防治主要依赖杀虫剂, 而杀虫剂的长期使用导致跳甲产生了抗

^{*} 资助项目: 国家 973 前期重点项目 (2004CCA00200); 福建省自然科学基金项目 (B0610025); 农业部“亚热带农业生物灾害与治理”重点开放实验室和福建省高等学校“农业生物多样性与生态安全”重点实验室项目。

^{**} E-mail: zlz9202@163.com

^{***} 通讯作者, E-mail: msyou@fjau.edu.cn

收稿日期: 2011-08-17, 接受日期: 2012-10-22

药性(郑惠钟和吴世昌,1993;田坤发,1999;Feng *et al.*, 2000;周先治和吴刚,2004;傅建炜等,2006),因此迫切需要对黄曲条跳甲抗药性产生的机理进行相关的研究。与其它一些昆虫抗药性研究的深度和水平相比,目前针对黄曲条跳甲抗药性的研究尚处于生化测定阶段,对其抗药性分子机理的研究报道甚少,对黄曲条跳甲抗性相关酶基因的克隆和序列分析在国内外未见报道。

酯酶(esterase, Est, EC 3. 1. 1. 1)是昆虫体内一种重要的解毒酶系,它可以通过水解酯类化合物的酯键,或与亲脂类有毒化合物结合,降低有毒化合物的有效浓度来降低其毒性。有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂都含有酯键,很多昆虫对有机磷杀虫剂产生抗性是由于酯酶的过量产生所致。酯酶水平的提高既可由基因扩增引起,也可能由基因表达改变引起(Campbell and Newcomb, 1998)。除基因扩增外,在家蝇中酯酶还可以因突变产生结构上不同的酶,使酯酶或有效代谢杀虫剂,或更多地结合杀虫剂(Cuerrero, 2000)。目前,与抗性相关酶基因的克隆还仅限于蚊虫、蚜虫、果蝇等少量模式昆虫,赤拟谷盗、二化螟和小菜蛾等昆虫的酯酶基因也已经克隆和测序(黄菁等, 2002; Quesneville *et al.*, 2005;曲明静等, 2006)。

本文根据已发表的其它昆虫的酯酶基因的核苷酸序列及氨基酸序列的保守区域,设计上游引物和下游引物,对黄曲条跳甲酯酶基因的目的片段进行克隆,并利用 RACE 技术获得黄曲条跳甲酯酶基因的 3'端。克隆黄曲条跳甲的酯酶基因,有助于抗性酶性质的深入研究、杀虫剂合理设计,为黄曲条跳甲抗药性机理的研究以及抗性早期治理提供必要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄曲条跳甲从福州建新镇淮安村蔬菜基地采集,以人工栽培的上海青作为寄主饲养。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5 α ,为福建农林大学应用生态研究所实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶、克隆载体 pMD18-T Vector、BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;Access RT-PCR Introductory System A1260 试剂盒、*Sac* I、*Eco*R I

购自 Promega 公司;E. Z. N. A. mRNA Enrichment Kit 购自 OMEGA 公司。

1.2 黄曲条跳甲 mRNA 的提取

采集黄曲条跳甲的蛹,用 E. Z. N. A. mRNA Enrichment Kit 提取黄曲条跳甲的 mRNA。

1.3 酯酶基因目的片段的克隆

RT-PCR 采用 Access RT-PCR Introductory System A1260 试剂盒的方法。

引物参照 Zhu 和 Clark (1994) 的引物由 TaKaRa 公司合成。引物序列为:

上游引物 5'-ATGAGCTC
TGGATHTAYGGNGGNGG-3'

下游引物 5'-ACGAATTC
CNGCNSWYTCNCCRAA-3'

PCR 反应程序:94℃ 变性 3 min;94℃ 1 min, 40℃ 1 min, 72℃ 2 min, 3 个循环;94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环;72℃ 延长 5 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,回收预期 DNA 片段,克隆于 pMD18-T 载体上,菌液 PCR 检测后送 TaKaRa 公司测序,根据测序结果设计特异性引物。

1.4 3'-RACE-Ready cDNA 的合成

采用 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒。3'-RACE cDNA 合成的反应体系为 10 μ L,在 0.5 mL 离心管中加入:1 μ L mRNA, 1 μ L 的 3'-CDS primer A,加入 3 μ L Sterile water 至总体积为 5 μ L,混匀,稍微离心,70℃ 温育 2 min,冰浴 2 min,稍微离心,再加入以下试剂:2 μ L 5 $\times$ First-Strand Buffer, 1 μ L DTT (20 mmol/L), 1 μ L dNTP Mix (10 mmol/L), 1 μ L BD PowerScript Reverse Transcriptase,混匀,离心,恒温箱或热循环 42℃ 温育 1.5 h,加 200 μ L Tricine-EDTA Buffer 稀释第一链反应产物,72℃ 保温 7 min,样品可在 -20℃ 保存 3 个月以上。

1.5 3'-RACE

根据 cDNA 片段序列信息设计特异性引物:
GSP2 5'

CGGTGGAGGATTCATCAATGGAAGCAAC 3'

以 3'端第一链 cDNA 原液为模板,用 GSP2 和 UPM 为正反向引物,进行 PCR 反应,PCR 程序:94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环;94℃ 30 s, 70℃

30 s,72℃ 3 min,5 个循环;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 3 min,20 个循环。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,割胶回收目的片段,再进行连接、转化、克隆。

1.6 菌液 PCR

利用 T 载体上的通用引物,由 Invitrogen 公司合成,引物序列为:

Primer 1

5'GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'

Primer 2

5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'

反应程序为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min 35 个循环;72℃ 延长 7 min。扩增产物经电泳检测后,将阳性克隆重组质粒的菌液送往 TaKaRa 公司测序。

1.7 序列分析

分别使用 BIOXM 和 DNAMAN 进行核苷酸序列的翻译和氨基酸的比对分析,用在线的 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行核苷酸序列的同源性分析。

2 结果与分析

2.1 黄曲条跳甲 RNA 的提取

用 E. Z. N. A mRNA 提取试剂盒提取黄曲条跳甲的 RNA,并进一步纯化 mRNA。总 RNA 提取后测定 OD 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 1.85,符合要求。RNA 琼脂糖变性胶的电泳图谱呈现出 2 条清晰可区分的条带(图 1),分别为 28 s 和 18 s RNA,比值约为 2:1,表明 RNA 是比较完整的。

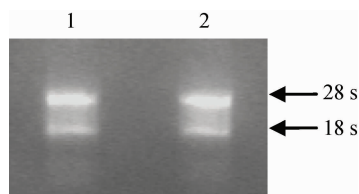


图 1 黄曲条跳甲蛹总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis of total RNA extracted from SFB pupae

1,2: 黄曲条跳甲为 DNA。

1,2: total RNA of SFB.

2.2 RT-PCR 扩增

使用简并引物扩增黄曲条跳甲酯酶基因的片段,RT-PCR 扩增产物的电泳结果表明(图 2),扩增产物在泳道中有一条清晰的目的条带,片段大小约 280 bp。将其回收,并命名为 EPS-RT。

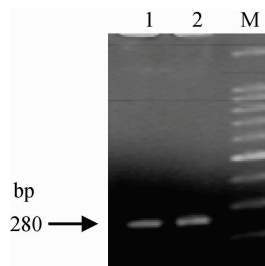


图 2 RT-PCR 产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis of RT-PCR products

M: 100 bp DNA ladder; 1,2: RT-PCR 产物。

M: 100 bp DNA ladder; 1,2:RT-PCR products.

2.3 EPS-RT 重组质粒的菌液 PCR

将 EPS-RT 回收,与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α,通过氨苄青霉素抗性标记和蓝白斑筛选阳性克隆,而后用菌液 PCR 法检测目的片段是否连接到 T 载体上。菌液 PCR 所用的引物为 T 载体上的通用引物,如果重组质粒上没有插入片段,其扩增产物约为 150 bp,图 3 中 4 个泳道,片段为 430 bp 左右,说明插入片段约为 280 bp,这与 EPS-RT 片段长度一致,说明 1、2、3、4 为阳性克隆。

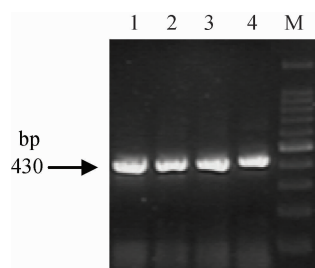


图 3 重组质粒的菌液 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoresis of PCR products of recombinant clones by colony PCR

M: 100 bp DNA ladder; 1~4: 菌液 PCR 产物。

M: 100 bp DNA ladder; 1~4: PCR products.

2.4 3'-RACE 的 PCR 扩增

根据 EPS-RT 片段的序列,利用软件 Primer Premier 5.0 设计 3'-RACE 引物 GSP2,进行黄曲条

跳甲酯酶基因 3'末端的 PCR 扩增,利用 Clontech 的 3'-RACE 试剂盒,将黄曲条跳甲的 mRNA 反转录成 3'-RACE-Ready cDNA,作为模板,用 GSP2 扩增酯酶基因的 3'端序列,并获得一个约 1 400 bp 条带(图 4),将其回收,并命名为 EPS-F。

2.5 EPS-F 重组质粒的菌液 PCR

将 EPS-F 回收,与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α,通过氨苄青霉素抗性标记和蓝白斑筛选阳性克隆,而后用菌液 PCR 法检测目的片段是否连接到 T 载体上。菌液 PCR 所用的引物为 T 载体上的通用引物,如果没有插入片段,其扩增产物约为 150 bp,图 5 中 1、2 泳道,片段为 1 550 bp 左右,说明插入片段约为 1 400 bp,这与 EPS-F 片段长度一致,说明 1、2 为阳性克隆。

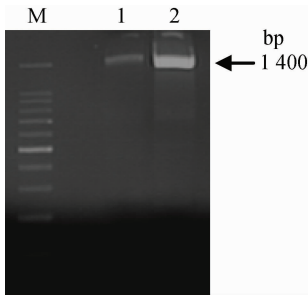


图 4 3'-RACE 扩增产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis of 3'-RACE PCR products

M: 100 bp DNA ladder; 1,2:3'-RACE PCR 产物。
M:100 bp DNA ladder; 1,2: 3'-RACE PCR products.

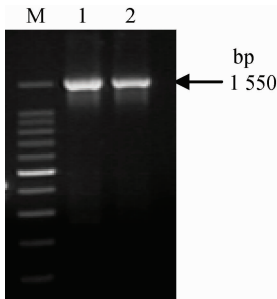


图 5 重组质粒的菌液 PCR 产物电泳图

Fig.5 Electrophoresis of PCR products of recombinant clones by colony PCR

M: 100 bp DNA ladder; 1,2: 菌液 PCR 产物。
M: 100 bp DNA ladder; 1,2: PCR products.

2.6 EPS-F 的序列比较分析

将阳性克隆重组质粒的菌液送往 TaKaRa 公

司测序,测序结果表明得到了 1 468 bp 的片段,编码 442 个氨基酸,含有 FGESAG 保守片段,这是多种昆虫酯酶基因的保守序列(如方框所示),3'端有长度为 29 个核苷酸 poly(A)尾巴,符合真核生物的普遍特征(图 6)。

核苷酸序列 BLAST 结果与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum est1* 基因(登录号: NM001039423, AJ845187)的同源性为 71% (211/297),与杂拟谷盗 *Tribolium confusum est1* 基因(登录号: AJ845190)的同源性为 71% (211/297),与果蝇 *Drosophila melanogaster alpha-esterase5* (登录号: NM079541)的同源性为 70% (156/222)。

氨基酸序列 BLAST 结果与杂拟谷盗 *Tribolium confusum*(登录号: CAH60167) *esterase* 的同源性为 43% (188/434),与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (登录号: CAH60166) *esterase* 的同源性为 43% (188/434),与果蝇 *Drosophila melanogaster alpha-esterase5*(登录号: NP524257) 的同源性为 33% (144/432),与疟蚊 *Anopheles gambiae esterase* (登录号: CAJ14159)的同源性为 33% (148/445)。从 BLAST 结果可推测,本试验所获得所获得的 1 468 bp 片段应为编码黄曲条跳甲酯酶基因的部分核苷酸序列,该序列在 GenBank 中的登录号为 EU166919。

3 讨论

RNA 的质量决定着可被反转录为 cDNA 最大的序列信息。因此,获得最优质的 RNA 及避免引入 RNA 酶和反转录酶抑制剂是十分重要的。本试验初期用 Trizol 试剂抽提总 RNA,RT-PCR 没有获得预期的结果,可能总 RNA 有污染,后改用 E. Z. N. A. mRNA Enrichment Kit 提取总 RNA 后再纯化 mRNA,用于 RT-PCR,最后获得了酯酶基因的保守序列片段,说明如何获取高质量的 RNA 是本试验研究中最基本和最关键的步骤之一。

酯酶基因扩增及突变是酯酶影响昆虫抗药性的主要方式,一般认为酯酶相关抗性的分子机制主要有结构基因突变、基因扩增及转录水平的调节等(Georgiou *et al.* ,1980; Mouches *et al.* ,1990; Raymond *et al.* ,1991; Field *et al.* ,1993)。酯酶活性升高的主要分子机制是结构基因 *est-2* 和 *est-3* 扩增造成酶的过量产生(Poirie *et al.* ,1992; Xu *et al.* ,1994; Vaughan *et al.* ,1995; Rooker *et al.* ,

1	GAATTTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTGGAGATTCGGTGGAGGATTCATCAATGGAAGCAACAAATCCATC
1	N L R I R A R Y P G I L W R F G G G F I N G S N K S I
82	GTGTACGGCCCGAGTATTTGATAACGGAAGACGTGGTGATAGTAGCAATGAATTATCGATTAGGATTTTGGGTTTCTC
28	V Y G P E Y L I T E D V V I V A M N Y R L G F L G F L
163	CATTTAAACGATCAATGGCTGGATGTGCCGGTAACGCGGGACTCAAAGACCAACAGCTGGCCCTCAAGTGGGTCCAAAAA
55	H L N D Q W L D V P G N A G L K D Q Q L A L K W V Q K
244	AATATAAAACACTTCAACGGCGATCCTGATAACGTGACGATATTCGGCGAAAGCGCCGAAGCGCCAGCGTGCATTACCAA
82	N I K H F N G D P D N V T I F G E S A G S A S V H Y Q
325	GTGGTATCTCCTTCTCCGAAGGACTTTTCCACAGAGCTATCATGCAAAGCGGTTCTTGCACAATCCTTGGCCTTACTCG
109	V V S P S S E G L F H R A I M Q S G S L H N P W P Y S
406	CAGGACGTCGGTCTCGAATTCGCCAGACTGGTAAAGAGGATGTCGCTGACGAAAAAGAAGCCTTGGAGGTCTCACGAGT
136	Q D V G L E F A R L V K E D V A D E K E A L E V L T S
487	TTACCCGCTAACGATTTATTCTTGATCAAGAGAAATCTTGCAATCTAGAGGCGGTGGTTTGGGCATAGTAGGACCAACT
163	L P A N D L F L Y Q E K F L Q S R G G G L G I V G P T
568	GTAGAATACCCCAACGATACCGCGTTCGTAACCTCCCCACCGTTGAATTAATAACTAATGGTTTCTACAACAAAGTGCCC
190	V E Y P N D T A F V T S P P V E L I T N G F Y N K V P
649	ATTCTACTGGGCTACACAGACCGCGAGGGTTGCTATTGGAAGCGCTCAAAAAGATGCGAGAAAACTCGGAACAAAAATCC
217	I L L G Y T D R D G L L F E A L K K M R E N S E Q K S
730	GAATCCGGTTCTCCCATGAGTTTGGAGTCGCTCGTACATCCGCATATGGGCCTCGACAAGGACGATCCCAAGAGGGAATC
244	E S G S P M S L E S L V H P H M G L D K D D P K R E I
811	ATCGGAAGAAATACGCCGAGTTCTATTTCCAAGGCGACAACGCCAAGGACAAAGTCATGATACTAACAGATCACATTTTC
271	I A K K Y A E F Y F Q G D N A K D K V M I L T D H I F
892	TTGCTGGGATCTTCGCATCGTCGATTACCACGCGAAGACGTGGGCCAGCCGGTGCATCTCTACAGGATGTCCATCGAT
298	F A G I F A S S I H H A R T S G Q P V H L Y R M S I D
973	GCCGGTCTAAATGTATTCAAGAAATTCACGAAACTAGATGAGCCAGGAGCTTGCCACGCGGACGATATTGGTTATTGTTC
325	A G L N V F K K F T K L D E P G A C H G D D I G Y L F
1054	ACTACAATATTGGGAAAAGATTCCGTGGAATCGGACCGGTGGAGGAGAAAGCTATGAGGAGCTTCGTGAAGCTGTGGACG
352	T T I L G K D S V E I G P V E E K A M R S F V K L W T
1135	GATTTTCGCGGATACGGCAACCCACGCCCGAAGGGAGTAGTTTAAATGTCACCTGGGAGCCTTTCGAAGAAATCGAACAG
379	D F A R Y G N P T P E G S S L N V T W E P F E E I E Q
1216	AACTACTTGGACATCGGTGAAACATTGACACCCTTGAAGAAACCCGAGGAAGAAAGGGTGAACCTTTTGGCGGGAATATTC
406	N Y L D I G E T L T P L K K P E E E R V N F W R E I F
1297	AAACTTAGTCCTTTAACGGAATAATTATTATAAATACCACACGTTACAAATATAATACTGCAAGCCAAAAA
433	K L S P L T E N Y L *
1378	AAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATCGTCGACCTGCAGGCA
1459	TGCAAGCTT

图 6 *EPS-F* 核苷酸序列及推导出的氨基酸序列

Fig. 6 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *EPS-F*

1996; Qiao *et al.*, 1999), 对农药敏感和产生抗性的昆虫体内酯酶含量差别可高达数百倍(乔传令等, 2000)。因此, 为了研究黄曲条跳甲抗药性的分子机理, 我们试图通过基因克隆的方法得到黄曲条跳甲酯酶基因的全长序列, 并进一步研究对农药敏感和产生抗性的黄曲条跳甲酯酶基因在表

达方面是否存在基因拷贝增加的现象。

本研究利用 RT-PCR 的方法得到黄曲条跳甲酯酶基因 281 bp 的目的片段,再利用 3'-RACE 技术获得该基因片段的 3'端(1 468 bp),编码 442 个氨基酸,含有 FGESAG 保守片段,这是多种昆虫酯酶基因的保守序列(申本昌等,2004)。本试验所获得的黄曲条跳甲酯酶基因片段在 GenBank 上 BLAST 结果,同源性较高的有 *est1*, *alpha-esterase 5*, *alpha-esterase 9*, *alpha-esterase 7* 基因等,只能初步判断试验所得到的片段是酯酶基因,无法确定属于酯酶基因的哪一个酶系。昆虫酯酶在昆虫正常生理活动中具有较多功能,为多基因家族,一种昆虫为什么具有较多的酯酶基因,可能和酯酶具有降解多种环境有害物质有关,也可能是携带不同抗性酯酶基因的昆虫被动运输的结果(乔传令等,2000)。至于黄曲条跳甲体内还有哪些酯酶基因及各酯酶基因在黄曲条跳甲对杀虫剂抗性中所起的作用还有待于更进一步的研究。

后续工作可利用 5'-RACE 技术获得黄曲条跳甲酯酶基因的全长序列,将能更充分地判断该酯酶基因属于哪一个酶系。也可将抗性品系与敏感品系的抗性相关酶序列进行比较,寻找抗性的产生是否与抗性相关酶基因的突变有关,或者利用 RNAi 技术,明确抗性相关酶基因的功能,从而最终明确黄曲条跳甲与抗性相关酶基因的分子生物学机制。

参考文献 (References)

- Campbell PM, Newcomb RD, 1998. Two different amino acid substitutions in the aliesterase E3 confer alternative types of organophosphorns insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 (3):139 – 150.
- Cuerrero FD, 2000. Cloning of a horn fly cDNA, *HliaE7*, encoding an esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(11):1107 – 1115.
- Feng HT, Huang YJ, Hsu JC, 2000. Insecticide susceptibility of cabbage flea beetle *Phyllotreta striolata* (Fab.) in Taiwan. *Plant Prot. Bull., Taipei*, 42(1):67 – 72.
- Field LM, Williamson MS, Moores GD, 1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticides resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae*(Sulzer). *Biochem. J.*, 294 (Pt2):569 – 574.
- Georgiou GP, Pasteur N, Hawley MK, 1980. Linkage relationship between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. *J. Econ. Entomol.*, 73(2):301 – 305.
- Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M, Lemieux L, Herzog M, Abadon M, Beyssat-Arnaouty V, Hyrien O, de Saint Vincent BR, Georgiou GP, 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *PNAS*, 87 (11):2574 – 2578.
- Poirie M, Raymond M, Pasteur N, 1992. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem. Genet.*, 30(1/2):13 – 26.
- Qiao CL, Sun ZQ, Liu JE, 1999. New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guangzhou, China. *J. Med. Entomol.*, 36(6):666 – 670.
- Quesneville H, Bergman CM, Andrieu O, Autard D, Nouaud D, Ashburner M, Anxolabehere D, 2005. Combined evidence annotation of transposable elements in genome sequences. *PLoS Comp. Biol.*, 1(2):e22.
- Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N, 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350(6314):151 – 153.
- Rooker S, Guillemaud T, Bergé J, Pasteur N, Raymond M, 1996. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, 77 (Pt5):555 – 561.
- Vaughan A, Rodriguez M, Hemingway J, 1995. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterase from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.*, 305 (Pt2):651 – 658.
- Xu J, Qu F, Liu W, 1994. Diversity of amplified esterase B genes responsible for organophosphate resistance in *Culex quinquefasciatus* from China. *Acad. J. Second Mil. Med. Univ.*, 9(2):20 – 23.
- Zhu KY, Clark JM, 1994. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinota decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24(5):453 – 461.
- 傅建炜, 李建宇, 邱良妙, 林泽燕, 尤民生, 2006. 福建省黄曲条跳甲药剂敏感性的地区差异. 福建农林大学学报, 35(3):235 – 238.
- 黄菁, 王少丽, 乔传令, 2002. 程序化设计简并引物与克隆

- 小菜蛾酯酶基因. 昆虫知识, 39(6):458-461.
- 黄咏俏, 李志胜, 侯有明, 2005. 秋季菜心田主要害虫生态位. 华东昆虫学报, 14(1):48-51.
- 刘芸, 尤民生, 侯有明, 2005. 饲养黄曲条跳甲实验种群的一种新方法. 昆虫知识, 42(5):578-581.
- 乔传令, 王靖, 邢建民, 2000. 不同地区小菜蛾种群的抗药性及酯酶同工酶的研究. 农药学学报, 2(4):33-39.
- 曲明静, 许新军, 韩召军, 姜晓静, 陈茂华, 樊堂群, 2006. 二化螟酯酶基因克隆及序列分析. 江西农业学报, 18(3):52-54.
- 申本昌, 赵德修, 乔传令, 2004. 小菜蛾酯酶基因的克隆. 昆虫知识, 41(1):43-46.
- 田坤发, 1999. 十字花科蔬菜黄曲条跳甲的发生与防治. 蔬菜, (11):20-21.
- 郑惠钟, 吴世昌, 1993. 黄曲条跳甲的发生和防治. 上海农业学报, 9(2):72-75.
- 周先治, 吴刚, 2004. 福州地区黄曲条跳甲的抗性监测. 福建农林大学学报, 33(3):158-161.