



溴氰菊酯对飞蝗羧酸酯酶基因表达的影响*

张建琴** 王 燕 李大琪 杨美玲 张建珍 马恩波***

(山西大学应用生物研究所 太原 030006)

摘 要 【目的】研究溴氰菊酯作用下飞蝗羧酸酯酶基因的 mRNA 表达特性,为溴氰菊酯的代谢解毒及飞蝗 *Locusta migratoria* 防治中抗性风险的评估提供基础资料。【方法】本文采用不同剂量溴氰菊酯处理 3 龄飞蝗,提取总 RNA,体外反转录合成 cDNA 模板,采用 Real-time PCR 技术分析飞蝗羧酸酯酶基因在溴氰菊酯不同浓度和不同时间处理后的表达模式。【结果】飞蝗经不同浓度溴氰菊酯处理 12 h 后, *LmCesA3* 和 *LmCesE1* 表现为诱导效应;除 *LmCesA2* 外,其余羧酸酯酶基因经溴氰菊酯 LD₃₀ 剂量处理后分别在不同的时间点表现为诱导效应。【结论】5 个羧酸酯酶基因 *LmCesA1*、*LmCesA3*、*LmCesD1*、*LmCesE1* 和 *LmCesI1* 可以被溴氰菊酯诱导,表明其可能参与飞蝗对溴氰菊酯的代谢解毒及抗性产生。

关键词 飞蝗, 溴氰菊酯, 羧酸酯酶, 基因表达, Real-time PCR

Effect of deltamethrin on carboxylesterase gene expression in *Locusta migratoria*

ZHANG Jian-Qin^{1**} WANG Yan LI Da-Qi YANG Mei-Ling ZHANG Jian-Zhen MA En-Bo^{***}

(Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract [Objectives] To provide a theoretical basis for detecting deltamethrin detoxification and resistance risk assessment in *Locusta migratoria* by analyzing mRNA expression of carboxylesterase genes in response to deltamethrin exposure. [Methods] Locusts were exposed to different doses of deltamethrin and treated with deltamethrin for different periods of time in order to analyze the mRNA expression of carboxylesterase genes in response to deltamethrin. cDNAs were synthesized from the total RNA of different templates using reverse transcriptase. Real-time PCR was performed to analyze the mRNA expression of carboxylesterase genes. [Results] Exposure to different doses deltamethrin for 12 h induced the mRNA expression of *LmCesA3* and *LmCesE1*. Except for *LmCesA2*, the transcription levels of the remaining carboxylesterase genes in third-instar nymphs of *L. migratoria* exposed to deltamethrin at LD₃₀ were induced after different periods of deltamethrin exposure. [Conclusion] Deltamethrin induced mRNA expression in 5 carboxylesterase genes, including *LmCesA1*, *LmCesA3*, *LmCesD1*, *LmCesE1* and *LmCesI1*. These results suggest that these genes play an important role in the detoxification of deltamethrin and the development of resistance to this pesticide in *L. migratoria*.

Key words *Locusta migratoria*, deltamethrin, carboxylesterase, gene expression, real-time PCR

羧酸酯酶广泛存在于微生物、植物和动物中 (Sato and Hosono, 2006), 其功能主要是将包

含酯键的内源性和外源性化合物分解为相应的醇和酸 (Heikinheimo *et al.*, 1999)。羧酸酯酶

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31172161, 31071980); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题 (20121401110008, 20111401110006); 山西省自然科学基金项目 (2011011033-1)

**E-mail: jianqinzh3@163.com

***通讯作者, E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

收稿日期: 2013-10-23, 接受日期: 2013-12-12

属于 α/β 水解酶, 其氨基酸序列上存在非常保守的催化三联体 Ser-Glu (Asp)-His 和围绕催化中心 Ser 的亲核臂(GX SXG)(Oakeshott *et al.* , 1999)。在哺乳动物中, 羧酸酯酶参与药物的生物学转化以及农药的转酯反应(Ahmad and Forgash , 1976 ; Imai , 2006)。在昆虫中, 羧酸酯酶具有重要的生物学功能, 主要参与激素代谢, 神经递质的降解以及来源于环境和食物中农药的解毒(Kontogiannatos *et al.* , 2011)。基于羧酸酯酶催化能力和细胞定位, 并经系统进化分析, 目前昆虫羧酸酯酶可分为 14 个簇(命名为 A-N 簇), 具有三种功能, 其中 A-C 簇与细胞内代谢解毒相关; D-H 簇为分泌型且具有催化能力; I-N 簇与神经发育相关(Oakeshott *et al.* , 2005)。

飞蝗是重要的农业害虫, 长期化学农药防治导致其产生了不同程度的抗药性。已有研究表明飞蝗羧酸酯酶作为重要的代谢解毒酶之一, 在对马拉硫磷的抗药性中起关键作用(Yang *et al.* , 2009 ; Zhang *et al.* , 2011)。拟除虫菊酯类杀虫剂早已被用于害虫防治, 导致许多害虫对其产生了抗药性(Soderlund and Knipple , 2003 ; da Silva and de Azeredo-Espin , 2009)。溴氰菊酯是典型的拟除虫菊酯类杀虫剂, 目前已在飞蝗的防治中广泛应用, 但其在飞蝗体内的解毒机制及抗性风险尚不明确。本研究采用 Real-time PCR 技术分析飞蝗羧酸酯酶基因在溴氰菊酯不同浓度和不同时间处理后的表达模式, 以确定飞蝗羧酸酯酶基因在溴氰菊酯作用下的表达特性, 为溴氰菊酯的解毒及飞蝗防治中抗性风险的评估提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 飞蝗 飞蝗虫体为本实验室孵化饲养所得, 将蝗卵置于人工气候箱中孵化, 温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 50%, 光照时间: 黑暗时间=14:10。孵化蝗蚬以新鲜麦苗饲喂于纱笼中, 每天更换一次新鲜麦苗, 3 龄后添加麦麸饲喂。根据实验需求选取 3 龄期蜕皮初期、活力良好、大小均匀的个体作为实验材料。

1.1.2 主要试剂和仪器 溴氰菊酯(Deltamethrin) 购自美国 SIGMA 公司; SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 购自日本 TOYABO 公司; RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂), RNase Inhibitor , DNase I (RNase-free) 均购自日本 TaKaRa 公司; RevertAidTMH Minus M-Mulv reverse transcriptase 购于加拿大 Fermentas 公司。PTC-200 PCR 仪(美国 MJ research 公司); 3K15 型冷冻离心机(德国 Sigma 公司); SpectraMAX 190 型酶标仪(美国 Molecular Device 公司); ABI Prism 7300 定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验材料的准备 参照 Guo 等(2012) 生物测定的结果, 用丙酮将溴氰菊酯稀释为 3 个不同浓度: $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LD₁₀), $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LD₃₀) 和 $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (LD₅₀)。点滴 $3 \mu\text{L}$ 不同浓度的溴氰菊酯于 3 龄飞蝗第 2、3 腹节之间, 每个浓度点滴 15~20 头(雌雄虫各半), 对照组点滴 $3 \mu\text{L}$ 丙酮, 每组 3 个生物学重复。室温饲养 12 h 后观察存活率, 收集存活的若虫冻存于液氮中备用。

选择溴氰菊酯 LD₃₀ 剂量进行农药时间效应实验。点滴 $3 \mu\text{L}$ 浓度为 $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴氰菊酯于 3 龄飞蝗第 2、3 腹节之间, 每个浓度点滴 80~100 头(雌雄虫各半), 对照组点滴 $3 \mu\text{L}$ 丙酮, 每组 3 个生物学重复。室温饲养, 在点滴处理后分别于 4、8、12、24 和 48 h 收集存活的若虫 10 头并冻存于液氮中备用。

1.2.2 总 RNA 的提取、纯化及第一链 cDNA 的合成

1.2.2.1 总 RNA 的提取 将速冻于液氮中的样品转移至预冷研钵中, 在液氮中将其迅速研为粉末。取 1 mg 置于玻璃匀浆器中, 加 1 mL Trizol 试剂用研杵研磨, 匀浆液呈透明状后将其转入新的 1.5 mL 离心管中, 具体提取方法见 TaKaRa Trizol 提取试剂盒。

1.2.2.2 总 RNA 的纯化 测定总 RNA 的浓度, 吸取 20~50 μg 总 RNA 进行纯化。在 RNA 中加入 50 μL 反应液: 5 μL 10 $\times$ DNase I buffer, 2 μL DNase I (RNase-free , 5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.5 μL RNase

Inhibitor (40 U·μL⁻¹), 加适量 DEPC 水补足体积到 50 μL, 37℃ 反应 30 min; 加 50 μL DEPC 处理水, 再加等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 充分混匀, 4℃ 12 000 g 离心 15 min, 取上清(水层)移至另一微量离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 充分混匀; 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 取上清(水层)移至另一微量离心管中, 加入与上清液等体积的异丙醇, 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 离心回收沉淀, 用 70% 预冷乙醇清洗沉淀, 真空干燥; 用适量的 DEPC 水溶解纯化后的 RNA 沉淀, 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认是否去除基因组 DNA。

1.2.2.3 第一链 cDNA 的合成 按照 RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 反转录试剂说明书进行第一链 cDNA 的合成, 将合成的 cDNA 置于 -20℃ 贮存备用。

1.2.3 Real-time PCR 分析溴氰菊酯对飞蝗羧酸酯酶基因表达的影响 采用 Real-time PCR 技术分析飞蝗羧酸酯酶基因在溴氰菊酯不同浓度和不同时间处理后的表达模式。所用引物见表 1。20 μL PCR 反应体系为: 10 μL SYBR® Green

Real-time PCR Master Mix, 2 μL cDNA 模板, 浓度为 0.4 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL, 6.4 μL 去离子水补足体积。PCR 反应条件为: 95℃ 60 s; 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 45 s (40 个循环)。用 ABI Primer 7300 SDS 1.1 (美国应用生物系统公司) 软件进行数据记录分析和产生熔解曲线, 软件自动设定阈值线。每个样品 3 个生物学重复, *β-actin* 作为内参基因。采用 2^{-ΔΔCt} 法 (Pfaffl, 2001) 计算基因相对表达量, 用 LSD 检验数据之间的显著性差异, 羧酸酯酶基因抑制效率计算方法: (对照组 2^{-ΔCT} - 处理组 2^{-ΔCT}) / 对照组 2^{-ΔCT} × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度溴氰菊酯对飞蝗羧酸酯酶基因 mRNA 表达水平的影响

采用 Real-time PCR 技术对不同浓度溴氰菊酯处理后飞蝗羧酸酯酶基因的表达情况进行分析。从图 1 可见, 与对照组相比, 溴氰菊酯处理后 12 h 羧酸酯酶基因 mRNA 表达量受到抑制,

表 1 用于 Real-time PCR 的飞蝗羧酸酯酶基因引物
Table 1 Primers of locust carboxylesterase genes for Real-time PCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物长度 (bp) Product size (bp)
<i>LmCesA1</i>	F: CAGAACCTCCTGTTGGAACACA R: CAGAGCATCTCTTACACCATTCCAT	77
<i>LmCesA2</i>	F: CTCATCTCCTACGGCGTCATC R: TCACCAGTCGTGAGGAAACCT	74
<i>LmCesA3</i>	F: ACGACACCTTCCAGCAGTTTCG R: TCCGAACATCATTTTGAACAGGTT	164
<i>LmCesD1</i>	F: CAGACTTCTGAAGACTGCTTGTTTCTA R: GGCACCAGGATGTAAGAAGATCA	105
<i>LmCesE1</i>	F: ACTGCCTGAGGAGCGTGGAT R: AATGATTCTCTTCCTTACCTTCC	121
<i>LmCesI1</i>	F: TGGTACATACAACGCCACAAAACC R: TTCCAACAATGCCACCTGTTC	77
<i>β-actin</i>	F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	155

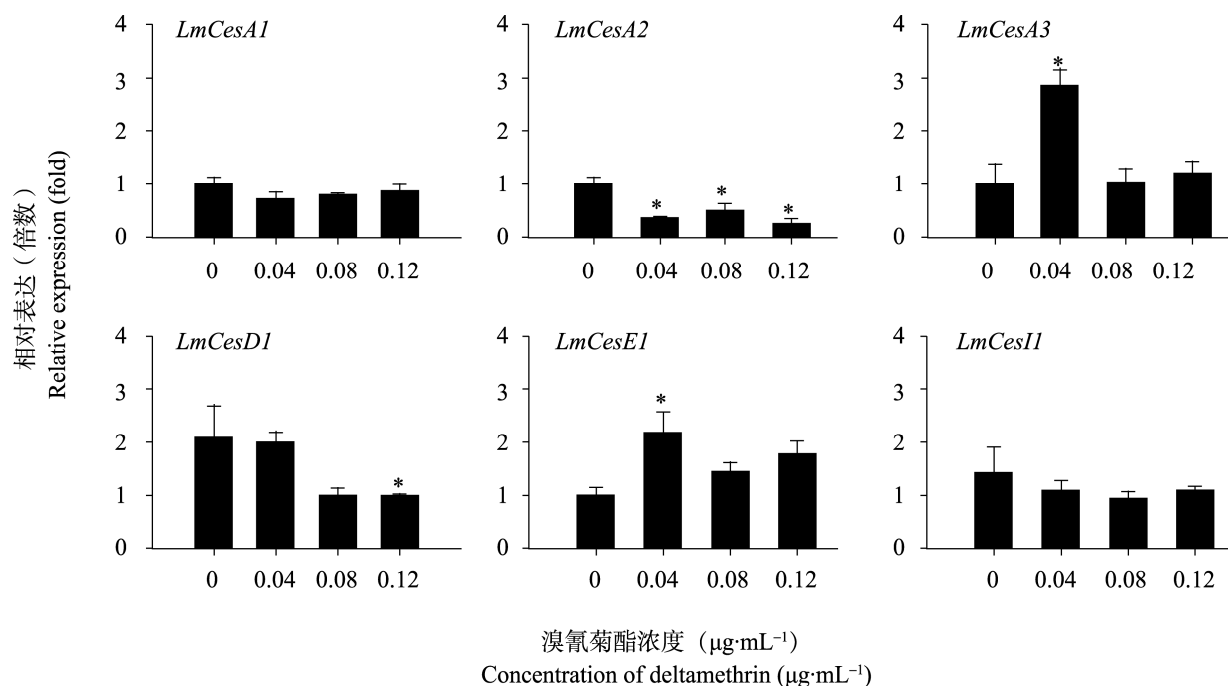


图 1 不同浓度溴氰菊酯对飞蝗羧酸酯酶基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of deltamethrin on the mRNA expression of carboxylesterase genes

飞蝗点滴丙酮作为对照组, 不同浓度溴氰菊酯(0.04, 0.08, 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)点滴飞蝗作为处理组, 12 h 后收集虫体作为实验材料。每组数据 3 个生物学重复。 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因。图中数值为平均值 $\pm$ SE, Student's t -test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Locust nymphs treated with acetone as control (0) and deltamethrin at three different doses (0.04, 0.08 and 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) as treatment groups. Locusts were collected as templates at 12 h. $\beta\text{-actin}$ was used as a reference gene. Vertical bars indicate standard errors of the mean ($n = 3$). Asterisks on the bars indicate that the mean are significantly different among the control and treatments (Student's t -test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

其中 *LmCesA2* mRNA 的表达在溴氰菊酯 3 个剂量处理后均表现为明显的抑制效应, 在 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴氰菊酯处理后, 其表达量抑制效果最明显, 达到 72%; *LmCesD1* 在 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴氰菊酯处理后, 其 mRNA 表达量被抑制了 51%。而 *LmCesA3* 和 *LmCesE1* 基因在 0.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴氰菊酯处理后, 其表达量分别提高了 2.84 和 2.17 倍, 表明低剂量溴氰菊酯能显著诱导 *LmCesA3* 和 *LmCesE1* 的表达。

2.2 溴氰菊酯处理飞蝗不同时间后羧酸酯酶基因 mRNA 表达水平分析

采用 Real-time PCR 对溴氰菊酯 LD_{50} 剂量处理飞蝗 5 个时间段 (4、8、12、24 和 48 h) 后羧酸酯酶基因的表达情况进行了分析。图 2 结果显示, 羧酸酯酶基因经溴氰菊酯 LD_{50} 剂量处理后不同时间段其 mRNA 表达量呈现短期被诱导,

长期被抑制的效应; 溴氰菊酯处理后 4 h, 4 个羧酸酯酶基因出现显著的诱导效应 (*LmCesA1* 为 2.02 倍, *LmCesD1* 为 1.76 倍, *LmCesE1* 为 2.07 倍, *LmCesH* 为 1.26 倍)。溴氰菊酯处理后 8 h, 部分羧酸酯酶基因显示明显的抑制效应 (*LmCesA1* 抑制效率为 41.9%, *LmCesA2* 抑制效率为 55.8%, *LmCesH* 抑制效率为 31.2%); 溴氰菊酯处理后 12 h, 2 个基因呈现明显的抑制效应 (*LmCesA1* 抑制效率为 46.4%, *LmCesA2* 抑制效率为 86.2%)。溴氰菊酯处理后 24 h, 3 个基因均呈现显著的抑制效应 (*LmCesA1* 抑制效率为 41.6%, *LmCesA2* 抑制效率为 39.2%, *LmCesA3* 抑制效率为 60.9%)。综上所述, 3 龄飞蝗经溴氰菊酯 LD_{50} 剂量处理后, *LmCesA2* 表现为抑制效应, 其余 5 个羧酸酯酶基因 *LmCesA1*、*LmCesA3*、*LmCesD1*、*LmCesE1* 和 *LmCesH* 均表现出不同程度的诱导作用, 表明这些基因可能参与飞蝗对

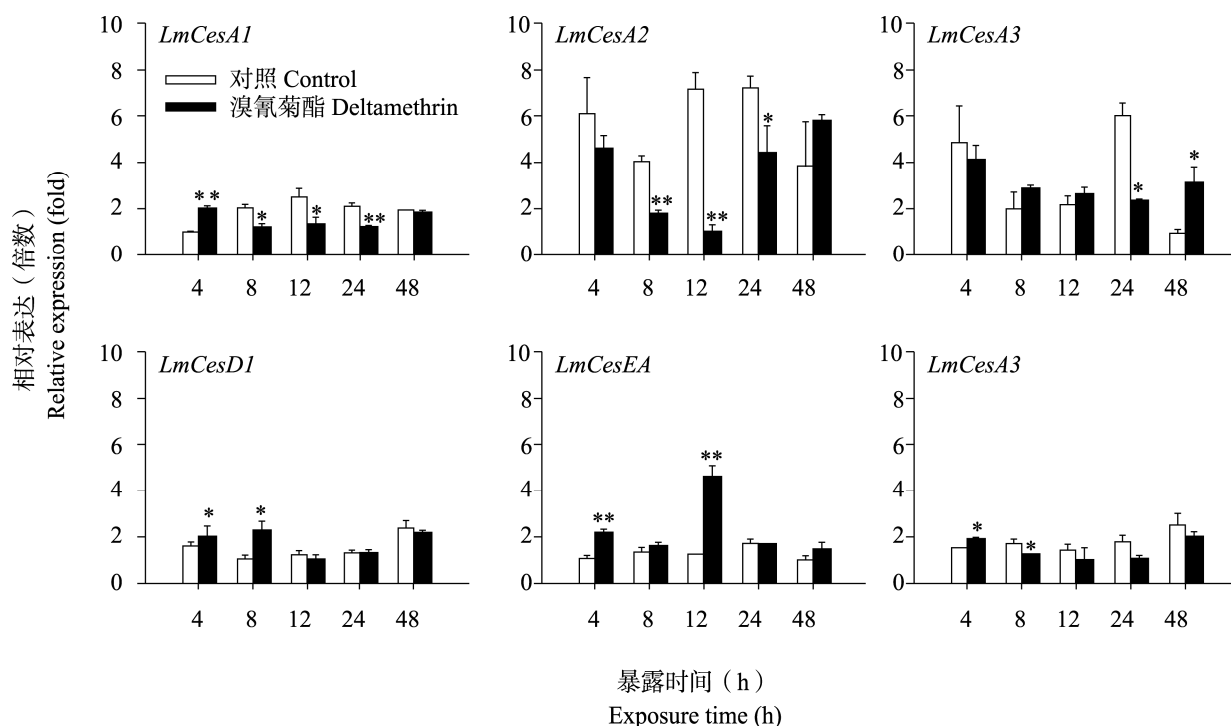


图2 溴氰菊酯处理飞蝗不同时间后羧酸酯酶基因 mRNA 的表达

Fig. 2 Effect of deltamethrin on the mRNA expression of carboxylesterase genes after the locust nymphs treated with deltamethrin at different time points.

飞蝗点滴丙酮作为对照组, 溴氰菊酯点滴飞蝗作为处理组, 不同时间段 (4, 8, 12, 24 和 48 h) 收集活力旺盛的活虫作为实验材料。每组数据 3 个生物学重复。 β -actin 为内参基因。图中数值为平均值 $\pm$ SE, Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Locust nymphs treated with acetone as control and deltamethrin at five different time points (4, 8, 12, 24 and 48 h) as treatment groups. Locusts were collected as templates. β -actin was used as a reference gene. Vertical bars indicate standard errors of the mean ($n = 3$). Asterisks on the bars indicate that the mean are significantly different among the control and treatments (Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

溴氰菊酯的代谢解毒及抗药性的产生。

3 讨论

拟除虫菊酯类杀虫剂由于成本低, 杀虫谱广以及使用安全等优点得到广泛应用。羧酸酯酶作为昆虫体内重要的解毒酶, 可水解拟除虫菊酯类杀虫剂 (Sogorb and Vilanova, 2002)。有研究报道, 许多昆虫 (包括双翅目、鳞翅目、鞘翅目和半翅目) 已对拟除虫菊酯产生了抗性 (Argentine *et al.*, 1995; Field and Devonshire, 1998; da Silva and de Azeredo-Espin, 2009; Wu *et al.*, 2011; Adelman *et al.*, 2011), 研究表明, 抗性的分子机制涉及编码序列的突变, 基因扩增或基因上调

(Field and Devonshire, 1998; Hemingway *et al.*, 1998)。

羧酸酯酶是昆虫体内重要的代谢解毒酶系, 由多种基因编码。基于基因组测序技术平台, 目前已有多种昆虫羧酸酯酶基因数目相继报道, 例如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 35 条, 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 51 条 (Oakeshott *et al.*, 2005), 家蚕 *Bombyx mori* 69 条 (Tsubota and Shiotsuki, 2010a), 蜜蜂 *Apis mellifera* 24 条 (Claudianos *et al.*, 2006), 赤拟谷盗 *Tribolium castaneu* 49 条 (Yu *et al.*, 2009), 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 28 条 (Tsubota and Shiotsuki, 2010b) 等。本实验室对飞蝗转录组

数据库进行分析,发现至少有 80 条羧酸酯酶基因,在此基础上通过 RACE-PCR 技术获得多条羧酸酯酶基因的全长序列,并通过 RNA 干扰技术证明多个羧酸酯酶基因参与不同杀虫剂的代谢解毒(Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013)。

昆虫代谢解毒酶具有可诱导性,利用这一特性可以推测其是否参与杀虫剂解毒过程(Poupardin *et al.*, 2008)。为了探讨飞蝗羧酸酯酶是否可以被诱导,我们利用定量 PCR 技术分析了溴氰菊酯处理后飞蝗羧酸酯酶基因的表达情况,结果表明, *LmCesA1*、*LmCesD1*、*LmCesE1* 和 *LmCesH1* 均在低剂量溴氰菊酯处理时有显著诱导效应, *LmCesA3* 在 LD₃₀ 剂量长时间处理后能显著被诱导。上述 5 个羧酸酯酶基因可以被溴氰菊酯诱导,表明其可能参与飞蝗对溴氰菊酯的代谢解毒及抗药性的产生。但是不同的处理剂量及不同的处理时间都会对诱导结果产生影响。所以要阐明某一基因在杀虫剂代谢中的作用,我们还需要通过 RNA 干扰沉默单个基因间接验证或体外表达后给以代谢底物直接证明。本文研究结果从分子水平探讨溴氰菊酯处理后对飞蝗羧酸酯酶基因的诱导效应,为进一步深入研究杀虫剂代谢解毒及抗性产生机制提供了基础资料。

参考文献 (References)

- Adelman ZN, Kilcullen KA, Koganemaru R, Anderson MAE, Anderson TD, Miller DM, 2011. Deep sequencing of pyrethroid-resistant bed bugs reveals multiple mechanisms of resistance within a single population. *PLoS ONE*, 6(10): e26228.
- Ahmad S, Forgash AJ, 1976. Nonoxidative enzymes in the metabolism of Insecticides. *Ann. Clin. Biochem.*, 13(3): 141–164.
- Argentine JA, Lee SH, Sos MA, Barry SR, Clark JM, 1995. Permethrin resistance in a near isogenic strain of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Phys.*, 53(2): 97–115.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 615–636.
- da Silva NM, de Azeredo-Espin AML, 2009. Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genetics Mol. Research*, 8(3): 1067–1078.
- Field LM, Devonshire AL, 1998. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochem. J.*, 330 (1): 169–173.
- Guo YQ, Zhang JZ, Yang ML, Yan LZ, Zhu KY, Guo YP, Ma EB, 2012. Comparative analysis of cytochrome P450-like genes from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen): expression profiling and response to insecticide exposure. *Insect Sci.*, 19(1): 75–85.
- Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis DL, 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure*, 7(6): R141–146.
- Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardena KGI, Ranson H, 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philos. Trans. R. Soc., London B*, 353(1376): 1695–1699.
- Imai T, 2006. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *J. Drug Metab. Pharmacok.*, 21(3): 173–185.
- Kontogiannatos D, Michail X, Kourti A, 2011. Molecular characterization of an ecdysteroid inducible carboxylesterases with GQSCG motif in the corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 1000–1009.
- Oakeshott JG, Claudianos C, Russell RJ, Robin GC, 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of evolution of successful multigene family. *Bioassays*, 21(12): 1031–1042.
- Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases// Gilbert LI, Iatrou K, Gill S(eds.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 5. Oxford, UK: Elsevier. 309–381.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): 2002–2007.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP, 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(5): 540–551.
- Satoh T, Hosono KM, 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterase. *Chem. Biol. Interact.*, 162(3): 195–211.
- Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33 (6): 563–577.
- Sogorb MA, Vilanova E, 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid

- insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.*, 128(1/3): 215–228.
- Tsubota T, Shiotsuki T, 2010a. Genomic analysis of carboxyl/cholinesterase genes in the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 11: 377.
- Tsubota T, Shiotsuki T, 2010b. Genomic and phylogenetic analysis of insect carboxyl/cholinesterase genes. *J. Pestic. Sci.*, 35(3): 310–314.
- Wu SW, Yang YH, Yuan GR, Campbell PM, Teese MG, Russell RJ, Oakeshott JG, Wu YD, 2011. Overexpressed esterases in a fenvalerate resistant strain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(1): 14–21.
- Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu XJ, Guo YP, Ma EB, 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch. Insect Biochem. Phys.*, 71(1): 3–15.
- Yu QY, Lu C, Li WL, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 553.
- Zhang JZ, Zhang JQ, Yang ML, Jia QD, Guo YP, Ma EB, Zhu KY, 2011. Genomics-based approaches to screening carboxylesterase genes potentially involved in malathion resistance in oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*). *Pest Manag. Sci.*, 67(2): 183–190.
- Zhang JQ, Li DQ, Ge PT, Yang ML, GuoYP, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2013. RNA interference revealed the roles of two carboxylesterase genes in insecticide detoxification in *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 93(6): 1207–1215.