

黄曲条跳甲易化扩散载体超家族成员的 cDNA 序列及其基因表达

贺华良 宾淑英 吴仲真 廖泓之 林进添

仲恺农业工程学院植物保护系/外来有害生物预警与控制研究所, 广州 510225

摘要 采用转录组测序和荧光定量 PCR 等方法, 分析蔬菜害虫黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) 易化扩散载体超家族成员的 cDNA 序列及其基因表达。结果表明: 黄曲条跳甲的一种易化扩散载体超家族成员 *PsMFS1*, 其开放阅读框为 1 224 bp, 编码 407 个氨基酸, 含有 2 个典型的功能域, 即药物分子排出系统蛋白功能域和易化扩散载体超家族蛋白功能域; 该基因在黄曲条跳甲雌雄成虫的不同部位中都有表达, 其中头部、中肠和精巢或卵巢的相对表达量较高, 触角和足部的相对表达量较低。

关键词 黄曲条跳甲; 易化扩散载体超家族; 交互抗性; 基因表达

中图分类号 Q 966; Q 969.512.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0463-06

有效控制害虫是农业生产中的重要任务。目前, 新型杀虫剂开发的数量不断减少, 害虫交互抗性的研究逐渐受到人们的关注。易化扩散载体超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 的概念主要来源于医学领域对肿瘤细胞和真菌的多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的研究^[1-2]。真菌多药耐药的机制是降低细胞内药物浓度, 增强细胞内的药物外排能力^[3-4]。真菌和肿瘤细胞的多药耐药性主要由 2 种蛋白介导, 即 ATP 结合转运蛋白 (ATP binding cassette transporters, ABC) 和易化扩散载体超家族。

与肿瘤细胞和真菌的多药耐药性现象相似, 一个昆虫品系对选择药剂以外的其他从未使用过的一种药剂或一类药剂也可产生抗药性, 即交互抗性。相同杀虫机制或相似化学结构的农药出现交互抗性是显而易见的, 但已发现不同杀虫机制或不同化学结构的农药也会出现交互抗性^[5-6], 现有的研究主要集中于害虫对不同杀虫剂的交互抗性水平与发展动态^[7-9], 而对害虫交互抗性的机制研究较少。

黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) 隶属鞘翅目叶甲科, 可为害多种植物, 尤其是十字花科的植物, 已成为蔬菜生产中最难控制的世界性害虫之一^[10-12]。据台湾省和福建省的调查结果, 黄曲

条跳甲对有机磷类 (马拉硫磷、毒死蜱、敌敌畏)、有机氯类 (丁硫克百威)、氨基甲酸酯类 (甲萘威) 及生物农药类 (阿维菌素) 均有不同程度的抗药性^[13-14]。目前对昆虫抗药性机制的研究还只局限在代谢抗性领域^[15-16], 尚未见对黄曲条跳甲交互抗性发生机制的相关报道。笔者鉴定并分析了黄曲条跳甲 MFS 成员的基因序列和特征, 旨在为深入研究黄曲条跳甲交互抗性发生的分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫的饲养和取样

黄曲条跳甲交配期雌雄成虫由仲恺农业工程学院昆虫学实验室提供。成虫采用芥菜叶喂食饲养, 光照培养箱温度为 28 ℃, 湿度为 75%, 光照度为 4 000 lx, 光照昼夜比为 14 h/10 h。黄曲条跳甲的组织取样过程: 将 3~5 头黄曲条跳甲装入离心管中, 在冰上放置 5 min 使成虫暂时休克; 在解剖镜载物台的载玻片上滴 1 滴冰上预冷的磷酸盐缓冲液, 将休克的成虫挑至液滴中; 在成虫即将苏醒时迅速解剖, 分别收集触角、头、中肠、精巢、卵巢、前足、中足、后足等组织样品, 雌虫和雄虫组织样本分开。将收集的样品置于装有磷酸盐缓冲液的 1.5 mL 离心管中, 待每管收集满 10 头样品时以 4 000 r/min 离

收稿日期: 2011-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101500) 和仲恺农业工程学院科研基金项目 (G3100005)

贺华良, 博士, 讲师。研究方向: 昆虫分子生物学和农业害虫综合防治。E-mail: hhl_1234@126.com

通讯作者: 宾淑英, 副教授。研究方向: 农业害虫综合防治。E-mail: binsuying@163.com

心 2 min, 除去各组织样本中的磷酸盐缓冲液, 置液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。由于虫体较小, 为满足 RNA 提取量, 一般需要解剖 80 头以上的雌虫或雄虫。

1.2 主要试剂

RNeasy[®] Plus Mini Kit 购自 Qiagen 公司; TaqDNA 聚合酶、PrimeScript[®] RT reagent Kit、DNA Fragment Purification Kit、MineBest Plasmid Purification Kit、pMD18-T、SYBR[®] Premix ExTaq[™]、500 bp DNA Ladder Marker 和 DL 2 000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。

1.3 RNA 的提取和反转录

按照 RNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司)使用说明书的方法, 提取黄曲条跳甲不同组织的总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, 按照 PrimeScript[®] RT reagent Kit 反转录系统说明书以随机引物进行反转录获得 cDNA, 以此作为 PCR 和荧光定量 PCR 模板。

1.4 引物设计与合成

根据黄曲条跳甲转录组测序获得的易化扩散载体超家族成员 cDNA 序列, 设计和筛选符合荧光定量 PCR 要求的特异性引物 PsMFS1-F、PsMFS1-R 用于后续的 PCR 反应。以黄曲条跳甲的 *actin* 基因作为内参基因(引物为 *Ps-actin*-F 和 *Ps-actin*-R)。荧光定量所用引物序列如下, *PsMFS1*-F: CCACCGTTCTGTCGTGTTCA, *PsMFS1*-R: CTCCTTGTTCTTCCAATGGTATCA, PCR 产物长度为 159 bp。内参 *actin* 基因的 PCR 扩增引物如下, *Ps-actin*-F: TAAACCCGACGAAAGCAATGT, *Ps-actin*-R: CGATTCCGAGAAAAGAACAGG, PCR 产物长度为 220 bp。

1.5 普通 PCR 的扩增

在离心管中加入以黄曲条跳甲成虫总 RNA 逆转录合成的 cDNA 模板 1 μL , 再加入 $10 \times \text{ExTaqDNA}$ 聚合酶反应缓冲液 2 μL (含 Mg^{2+})、扩增 *PsMFS1* 基因的正向和反向引物各 1 μL (10 mol/L), 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL , *ExTaqDNA* 聚合酶 0.2 μL (5 U/ μL), 加水至 20 μL , 混匀离心后放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 接着进行 35 个循环, 循环条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; 循环完毕后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段。回收产物纯化后连接到

pMD18-T 载体, 进一步转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 经蓝白斑和氨苄筛选, 重组质粒经扩大培养, 提取质粒 DNA 用于检测。测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成。

1.6 基因表达的荧光定量 PCR 分析

采用 SYBR Green 染料法, 在 LightCycler480 荧光 PCR 仪上进行扩增和数据分析。根据 SYBR[®] Premix ExTaq[™] 试剂盒的说明书, 按 20 μL 的总反应体系, 采用二步法进行, 反应程序: 预变性, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; 扩增, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 溶解曲线分析, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s; 冷却, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 s。试验样本的反应结束后, 结合标准曲线进行 *PsMFS1* 基因表达的绝对定量分析。

1.7 标准曲线的建立与定量分析

以经测序验证的阳性重组质粒为模板, 经 10 倍系列稀释成 7 个质量浓度梯度 (5.0 、 5.0×10^{-1} 、 5.0×10^{-2} 、 5.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-4} 、 5.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-6} ng/ μL) 以优化的反应条件进行 real-time PCR, 以达到循环阈值为纵坐标, 以模板质粒浓度的常用对数值为横坐标建立定量标准曲线。*Ps-actin* 和 *PsMFS1* 的重组质粒的浓度梯度和对应的荧光定量 PCR 都设置 3 次技术重复, 分析 3 个标准曲线内部的标准差, 检验试验的可重复性。

Ps-actin 和 *PsMFS1* 在黄曲条跳甲各组织中的表达也都设置 3 次生物学重复, 然后分别根据各自的标准曲线计算出每次试验样本中目标基因的绝对定量。

黄曲条跳甲各部位基因相对表达量的比值 = *PsMFS1* 的绝对定量/*Ps-actin* 的绝对定量。

1.8 基因序列的生物信息学与系统发育分析

基因序列和数据搜索使用 NCBI 上的 Blast 在线程序; 蛋白质序列分析采用 ExPASy 在线 Scan-Prosites 程序; 蛋白质分子质量和等电点分析采用 <http://www.expasy.org/tools/pi-tool.html> 在线工具; 信号肽序列预测采用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 在线程序进行; 跨膜结构预测采用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线程序进行。

从 NCBI 上下载 *PsMFS1* 同源基因的氨基酸序列, 使用 Clustalx 1.8 软件对这些序列进行比对, 采用分子进化遗传分析软件 PHYLIP 3.68 进行遗传距离分析, 利用多重树构建一致树, 完成进化树的生成。遗传距离分析过程中没有设置外类群。

2 结果与分析

2.1 PsMFS1 基因的序列分析

应用高通量测序平台 Illumina's Solexa Genome Analyzer II 对交配期的黄曲条跳甲雌雄成虫混合样本进行转录组测序,采用 SOAPdenovo 软件对每个读取序列片段(read)进行聚类后拼接成 unigene,再结合生物信息学软件进行靶标序列 cDNA 全长的判定^[17]。成功克隆并鉴定到含完整开放阅读框 *PsMFS1* 基因的 cDNA (GenBank 登录号:

JQ278010),其长度为 1 271 bp,开放阅读框为 1 224 bp,编码 407 个氨基酸。ExPASy 在线预测其蛋白质质量为 45 571.73 u,蛋白序列的理论等电点为 7.59。

根据在线软件 Signal P4.0 分析表明,该蛋白质分子没有信号肽区段,TMHMM 2.0 在线预测跨膜结构其包含有 10 个跨膜结构域。氨基酸序列及特征分析表明,该基因的推测蛋白含有 2 个典型的功能域,即药物分子排出系统蛋白功能域和易化扩散载体超家族蛋白功能域(图 1)。

```

1          AGT CGACTAAGT AGTGGGCAC TCAAGGCA
  M E Y L G T I E L I V I I S F L D L L A V
31  ATGGAGTAT TTAGGAACT ATTGAATTA ATTTATATA ATATCCTTT TTGGAITTA CTAGCTGTT
  G A I F P V F T Q H L R D L G A S H T T I
94  GGGGGCATT TTTCCTGTA TTCACCCAG CATTAAAGG GATTTGGGT GCTTCTCAT ACCACAATC
  G I F A S A Y S A I Q V V S G P L I G S W
157 GGGATATT GCCTCGGCT TATTCGGCA ATTCAGGTC GTCTCGGGG CCACITATA GGAAGCTGG
  S D I R D R K T V L K A T V L S C S I C V
220 AGCGACATA AGAGATAGG AAAACTGTC TAAAAGCC ACCGTTCTG TCGTGTCA ATATGTTAT
  T C L A L S D S L T V I F V V R F L L A I
283 ACATGTTG CGCCTATCT GATTCACTA ACAGTTATA TTIGTTGTA AGATTTTIA TTGCCATA
  V K H T Q T I C K A I I T D L I P L E E Q
346 GTTAAACAC ACACAAACT ATTTGTAAG GCTATAATA ACTGATTTG ATACCATTG GAAGAACA
  G E F F A K S V S I G T C G F I I G P L I
409 GGAGAATC TTTGCCAAG TCAGTTTCC ATCGGAACA TGTGGATT ATCATCGGA CCTCTCATC
  G G N L A E I Q N G F S Y V C A F T A G L
472 GGAGGAAC CTGGCTGAA TTACAGAAT GGGTTAGC TACGTTGT GCCTTTACA GCGGATTTG
  F L L N Y I L A C Y I S D D L V L D R K L
535 TTCCTTTA AATTATATT CTAGCGTGT TACATATCG GATGATTTG GTGCTTGAT AGAAAATG
  F A A D N L S I W Q R I K S E L K K T I D
598 TTCGTCGG GATAATTTG AGCATCTGG CAGAGAATA AAGTCGGAA TTGAAGAAA ACGATAGAC
  E L S E I D W S R H W H P F L L K F I L G
661 GAACTGAGC GAAATCGAC TGGTCCCGA CATTGGCAT CCTTCTCCT TTGAATTC ATCTTGGA
  F S M A C Y F S N Q G L Y L R E T Y N L S
724 TTCCTGATG GCTTGTCTAT TTCTCAAT CAGGGCTTG TATTGCGG GAGACCTAC AATTATATG
  Q K H A G Y M I S Y F S I I S I V A G L L
787 CAGAAACAC GCGCGCTAC ATGATCTCC TACTTCAGC ATCATATCG ATCGTAGCC GGCCTGCTG
  L K K I H Y V L N F D N I Y T K M I L W Y
850 TTGAAAAA ATCCACTAC GTTCTAAAT TTGACAAT ATTTACAAG AAGATGATT CTGTGGTAC
  G V L T L S F I L L Y F A Q N F N T F V G
913 GGAGTATTA ACTTTAAGT TTCATACTT TTATATTTT GCGCAAAAT TTAAACACT TTGTCGGA
  L L I P L S M S S T A M R V V T M E L M F
976 TTGTTGATT CCATTGTCA ATGTCCTCT ACAGCGATG AGAGTGGTG ACGATGGAG CTTATGTC
  Q N T E S F H K G S L S G A S N S I M S I
1 039 CAAAATACG GAATCTTTT CACAAGGC TCGCTTTCC GGAGCTTCT AATAGTATT ATGCTATA
  A R F V T P L F T G V A S D I F G E K F V
1 102 GCTAGATTC GTAACCCCG TTATTCAAC GCGTAGCTC ACGGATATT TTGGTGAA AAAATTTG
  M L L A A I P A S I G L I V S W I L L I R
1 165 ATGCTATTA GCAGCGATT CCTGCTAGT ATAGGATG ATTGTCACT TGGATTCTT TTGATAAGA
  H R Q R I K E E *
1 228 CACAGGCAA CGTATTAAA GAAGAATA TTTTAAAA AAAAAA

```

[ATG]: 翻译起始密码子; [TAA]: 翻译终止密码子; 双下划线标记区域为药物分子排出系统蛋白功能域; 单下划线标记区域为易化扩散载体超家族蛋白功能域; 阴影标记区域为蛋白分子的跨膜域。 [ATG] meaning the star code and [TAA] meaning the stop code; Animo acid sign with single underlin indicates drug efflux system protein domain; Animo acid sign with double underlin indicates major facilitator superfamily domain.

图 1 黄曲条跳甲 *PsMFS1* 基因核酸序列与其推导的氨基酸序列特征

Fig.1 Characteristics of cDNA and putative amino acid sequence of *PsMFS1* of *Phyllotreta striolata*

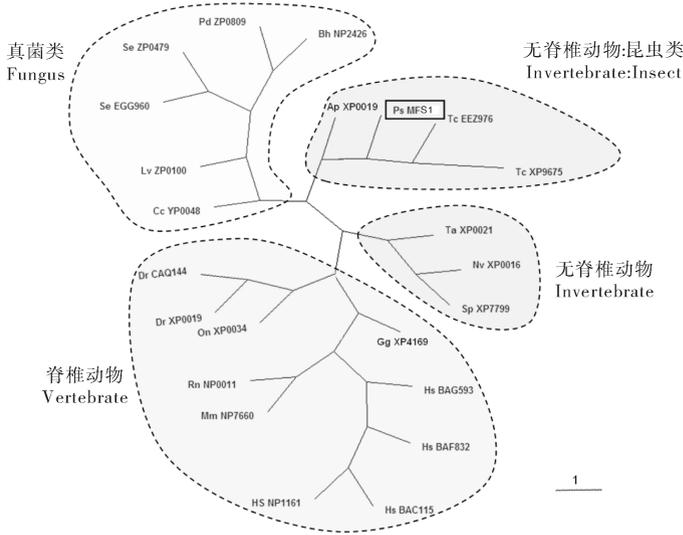
2.2 *PsMFS1* 基因的系统进化分析

通过对 *PsMFS1* 基因在 NCBI 网上进行 Blast 比对分析可知,目前在所有昆虫中只发现在赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 中报道了 *PsMFS1* 的同源基因,但脊椎动物和真菌类中的同源基因报道相对较多。分析部分 *PsMFS1* 与其同源基因推测蛋白序列的系统发育关系,结果见图 2。

从图 2 可以看出,真菌类物种和脊椎动物的

MFS1 同源基因都各自聚类为一支;黄曲条跳甲的 *PsMFS1*(图中方框标注)明显与其他 2 种昆虫的同源基因聚类在一起,但并没有与同为无脊椎动物的水生或海洋动物聚为一支。

另外,从图 2 中还可发现,在人体细胞中已找到 *PsMFS1* 的 4 种同源基因,在赤拟谷盗和表皮葡萄球菌中也已报道了 2 种 *PsMFS1* 同源基因。在黄曲条跳甲基因组中是否还有 *PsMFS1* 的多拷贝同源基因还有待进一步验证。



使用 Kimura 双参数模型构建 NJ 进化树,图中比例尺表示每单位长度位点的替换率。Phylogenetic tree generated by method of NJ with Kimura 2-parameter, the scale bar indicates the number of substitutions per site for a unit branch length.

图中基因蛋白产物的编号、相应序列号以及物种名分别如下 GenBank accession numbers related the species and protein analyzed: *Ps_MFS1*, 黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata*; *Tc_EEZ976* (EE_Z97676.1), 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; *Ap_XP0019* (XP_001945356.1), 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*; *Sp_XP7799* (XP_779901.1), 海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*; *Nv_XP0016* (XP_001638798.1), 海葵 *Nematostella vectensis*; *Ta_XP0021* (XP_002112790.1), 丝盘虫 *Trichoplax adhaerens*; *On_XP0034* (XP_03452960.1), 罗非鱼 *Oreochromis niloticus*; *Dr_CAQ144*, 斑马鱼 *Danio rerio*; *Gg_XP4169* (XP_416919.2), 鸡 *Gallus gallus*; *Mm_NP7660* (NP_766087.1), 小鼠 *Mus musculus*; *Rn_NP0011* (NP_001101685.1), 大鼠 *Rattus norvegicus*; *Bh_NP2426* (NP_242641.1), 芽孢杆菌 C-125 菌株 *Bacillus halodurans* C-125; *Pd_ZP0809* (ZP_08095488.1), 东海动性球菌 *Planococcus donghaensis* MPA1U2; *Se_ZP0479* (ZP_04796502.1), 表皮葡萄球菌 W23144 菌株 *Staphylococcus epidermidis* W23144; *Lv_ZP0100* (ZP_01004411.1), 福尔山洛克氏菌 SKA53 菌株 *Loktanella vestfoldensis* SKA53; *Cc_YP0048* (YP_004862065.1), 好气性光合细菌 *Aerobic photosynthetic bacteria*.

图 2 来自不同物种的与 *PsMFS1* 同源基因蛋白产物的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of homologous genes of *PsMFS1* from different species

2.3 *PsMFS1* 基因表达量分析

对黄曲条跳甲不同组织中的 *PsMFS1* mRNA 含量进行分析,结果表明, mRNA 在黄曲条跳甲雌雄成虫的不同部位中都有表达,其中在头部、中肠和精巢或卵巢的表达量比较高,在触角、前足、中足和后足的表达量都较低(表 1)。

从表 1 还可以看出,黄曲条跳甲雄虫精巢 mRNA 的表达量约为雌虫卵巢的 2 倍。结合笔者课题组在前期对黄曲条跳甲进行的相关研究结果^[17]综合分析,表明 *PsMFS1* mRNA 的相对表达量,属于在本试验中基因转录组结果分析数据里相对较低的水平。

表1 黄曲条跳甲成虫不同组织中

PsMFS1 mRNA 的相对表达量Table 1 *PsMFS1* mRNA relative levels in different tissues of *Phyllotreta striolata* adults

组织 Tissues	雄虫 Male	雌虫 Female
触角 Antenna	2.6±0.26	3.2±0.40
头部(不含触角) Head(missing antenna)	17.0±1.97	14.5±2.21
中肠 Midgut	22.6±5.05	22.0±1.48
精巢或卵巢 Testis or ovary	62.3±5.51	29.9±4.51
前足 Fore leg	3.8±2.01	7.5±1.97
中足 Middle leg	1.5±0.35	1.2±0.35
后足 Hind leg	2.8±0.62	1.9±0.15

3 讨论

黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* (Fabricius) 是十字花科蔬菜生产中最难控制的世界性害虫之一,且对很多化学药剂都有不同程度的抗药性。本试验观察与分析了黄曲条跳甲对不同杀虫剂的交互抗性,并成功鉴定了可能与害虫交互抗性相关的MFS家族成员。由于昆虫中MFS家族成员的功能研究相对滞后,因此,对其在昆虫交互抗性中的作用机制和信号通路还知之甚少。目前,在数据库中可查询到MFS家族成员基因序列信息的昆虫只有鞘翅目的赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和同翅目的豌豆蚜虫 *Acyrtosiphon pisum*。鞘翅目害虫黄曲条跳甲 *PsMFS1* 家族成员的鉴定和分析进一步丰富了MFS家族成员信息资源,对其分子功能的研究具有促进作用。

关于棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 对菊酯类和滴滴涕(dichloro-diphenyl-trichloroethane, DDT) 农药之间的交互抗性,有研究推测,开始时棉铃虫对滴滴涕的抗性是由滴滴涕脱氧化氢酶引起的,由于菊酯类杀虫剂的选择,这一机制又为Kdr机制代替,导致棉铃虫对二者皆具抗性^[18]。上述推测是结合代谢抗性和靶标抗性的角度来分析与探讨昆虫交互抗性的发生。MFS家族成员在真菌中主要介导降低细胞膜通透性和增强细胞内的药物外排能力^[1-2],可以解释为是一种在细胞水平的代谢抗性,也可以上升为个体水平的生理抗性。笔者对黄曲条跳甲MFS家族成员的基因序列进行鉴定,可以结合分析昆虫的生理抗性、代谢抗性甚至MFS家族成员的靶标抗性,进而为深入探讨不同昆虫对不同杀虫剂产生交互抗性的机制提供新的思路。

按杀虫作用的方式来分,农药可分为胃毒作用、触杀作用、熏蒸作用、拒食作用、干扰生长发育和不育作用等类型,因此,昆虫对不同杀虫剂的交互抗性可能是由昆虫的不同组织器官对农药表现出的综合抗性。本试验对黄曲条跳甲 *PsMFS1* 基因表达谱的研究发现, *PsMFS1* 基因在雌雄成虫的不同组织器官中都有表达,且中肠和生殖系统中的表达量比头部、触角、足部的表达量要高。昆虫的中肠最易遭受具胃毒作用或内吸作用类型农药分子的攻击^[19],因此,昆虫中肠细胞MFS基因家族成员的表达对胃毒作用农药的抗性发生可能起到了首条防线的重要作用。

另外,昆虫MFS基因家族成员可能结合更多的功能基因如ABC转运蛋白和糖蛋白共同作用^[20],实现对不同化学结构的农药分子产生抗性,即通过非专一性抗性的作用方式进而可能表现出交互抗性,因此,进行昆虫MFS基因家族成员的鉴定和分析,对深入研究昆虫交互抗性的分子机制具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] PARKINSON T, FALCONER D J, HITCHCOCK C A. Fluconazole resistance due to energy dependent drug efflux in *Candida glabrata* [J]. Antimicrob Agent Chemother, 1995, 29(8): 1696-1699.
- [2] DENNING D W, VENKATESWARLU K, OAKLEY K L, et al. Itraconazole resistance in *aspergillus fumigatus* [J]. Antimicrob Agent Chemother, 1997, 41(6): 1364-1368.
- [3] NAKAMURA K, NIIMI M, NIIMI K, et al. Functional expression of *candida albicans* drug efflux pump *cdrlp* in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45: 3366-3374.
- [4] WIRSCHING S, MORAN G P, SULLIVAN D J, et al. MDRI mediated drug resistance in *Candida dubliniensis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45: 3416-3421.
- [5] 唐振华. 我国昆虫抗药性研究的现状及进展[J]. 昆虫知识, 2000, 37(2): 97-103.
- [6] 亢春雨, 赵春青, 吴刚. 昆虫抗药性分子机制研究的新进展[J]. 华东昆虫学报, 2007, 16(2): 136-140.
- [7] 陈德国, 霍新北. 抗高效氯菊酯家蝇品系对几种杀虫剂的交互抗性[J]. 中华卫生杀虫药械, 2011, 17(2): 14-16.
- [8] 罗浑金, 李梅, 傅童生, 等. 拟除虫菊酯抗性家蝇的交互抗性研究[J]. 生物技术通报, 2007, 5: 141-143.
- [9] 孔凡彬, 高扬帆, 邓天福. 棉铃虫对不同杀虫剂的交互抗性研究进展[J]. 广西农业科学, 2005, 36(2): 145-147.
- [10] Tribolium Genome Sequencing Consortium, RICHARDS S, GIBBS R A, et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum* [J]. Nature, 2008, 452(7190): 949-955.

- [11] FEENEY P, PAAUKE K L, DEMONG N J. Flea beetles and mustard oils: host plant specificity of *Phyllotreta cruciferae* and *P. striolata* adults (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1970, 63(3): 832-841.
- [12] 张茂新, 凌冰, 梁广文. 十字花科蔬菜上黄曲条跳甲种群动态调查与分析[J]. *植物保护*, 2000, 26(4): 1-3.
- [13] FENG H T, HUANG Y J, HSU J C. Insecticide susceptibility of cabbage flea beetle *Phyllotreta striolata* (F.) in Taiwan [J]. *Plant Protection Bulletin Taipei*, 2000, 42(1): 67-72.
- [14] 傅建炜, 李建宇, 邱良妙, 等. 福建省黄曲条跳甲药剂敏感性的地区差异[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2006, 35(3): 235-238.
- [15] 郑丽祯, 傅建炜, 曹慧芳, 等. 黄曲条跳甲对敌敌畏抗性机理的初步研究[J]. *福建农业学报*, 2009, 24(6): 517-520.
- [16] 郑丽祯, 傅建炜, 陈小龙, 等. 黄曲条跳甲对毒死蜱敏感性差异的生化机制[J]. *昆虫知识*, 2009, 46(2): 256-259.
- [17] 贺华良, 宾淑英, 吴仲真, 等. 基于 Solexa 高通量测序的黄曲条跳甲转录组学研究[J]. *昆虫学报*, 2012, 55(1): 1-11.
- [18] 戴小枫, 韩丽娟. 棉铃虫对菊酯杀虫剂的抗性机制[J]. *农药科学与管理*, 1994(2): 10-15.
- [19] 张雅林, 周越, 张志勇. 斑蝥素对粘虫和小菜蛾幼虫中肠组织的影响[J]. *昆虫学报*, 2003, 46(3): 272-276.
- [20] 沈晓霞. 农药与 P-糖蛋白和其他 ABC 蛋白的交互作用与抗性的发展[J]. *世界农药*, 2010, 32(3): 18-25.

cDNA sequences and gene expression of major facilitator superfamily in *Phyllotreta striolata* (Fabricius)

HE Hua-liang BIN Shu-ying WU Zhong-zhen LIAO Hong-zhi LIN Jin-tian

*Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering /
Institute for Management of Invasive Alien Species, Guangzhou 510225, China*

Abstract The identification of the members of a major facilitator superfamily (MFS) may provides more valuable information for the research of on the cross-resistance of insects. Illumina's Solexa sequencing technology and the method of real-time PCR were used for cDNA identification and expression profiles analysis. A member of major facilitator superfamily (*P_sMFS1*) was successfully obtained. Its cDNA contained 1 224 bp open reading frame (ORF) encoding 407 amino acids. The putative protein contains a drug efflux system protein domain and a major facilitator superfamily domain. Gene expression profiles analysis showed that the *P_sMFS1* in head, midgut and production system were relative more highly expressed than that in antenna and legs. MFS possibly plays a role in the cross-resistance of *P. striolata* to pesticides and its function and mechanism *in vivo* needed more study in the future.

Key words *Phyllotreta striolata* (Fabricius); major facilitator superfamily; cross-resistance; gene expression

(责任编辑:陈红叶)