

氟虫脲对东亚飞蝗和中华稻蝗几丁质合成酶基因表达的影响

刘晓健^{1,2}, 杨美玲¹, 张建琴^{1,2}, 马恩波¹, 张建珍^{1,2,*}

(1. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006; 2. 山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 为了探讨氟虫脲可能的作用靶标及毒性机制, 本研究以重要农业害虫东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 和中华稻蝗 *Oxya chinensis* (Thunberg) 为材料, 采用简并引物扩增中华稻蝗几丁质合成酶 1 基因 (*OcCHS1*) 的部分 cDNA 序列; 以氟虫脲浸渍法处理 2 龄中期中华稻蝗及 1, 2 和 3 龄东亚飞蝗若虫为处理组, 丙酮处理为对照组, 使用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 方法分析氟虫脲对蝗虫几丁质合成酶基因 mRNA 表达的影响。结果获得的 *OcCHS1* 部分 cDNA 序列, 其长度为 312 bp, 编码 104 个氨基酸, GenBank 登录号为 HM214491, 与东亚飞蝗几丁质合成酶 1 基因 (*LmCHS1*) 在氨基酸水平上相似度达 95%。RT-PCR 结果显示, 处理组几丁质合成酶 1 扩增带均强于对照组。实时荧光定量 PCR 结果表明: 与对照组相比, 处理组中华稻蝗 2 龄中期若虫 *OcCHS1* mRNA 表达提高了 1.02 倍, 东亚飞蝗 1, 2, 3 龄若虫 *LmCHS1* mRNA 表达分别提高了 34%, 82% 和 89%, 差异显著 ($P < 0.05$)。分析基因表达提高的原因是几丁质合成受阻后基因表达水平的一种代偿性增加, 由此推测几丁质合成酶可能是氟虫脲作用的靶标之一。

关键词: 东亚飞蝗; 中华稻蝗; 几丁质合成酶; 氟虫脲; 基因表达; 作用机制

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)09-1039-06

Effects of flufenoxuron on the expression of chitin synthase gene in *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acrididae) and *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Oedipodidae)

LIU Xiao-Jian^{1,2}, YANG Mei-Ling¹, ZHANG Jian-Qin^{1,2}, MA En-Bo¹, ZHANG Jian-Zhen^{1,2,*}
(1. Research Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In order to explore the possible target and mechanism of flufenoxuron, important agricultural pests *Locusta migratoria manilensis* and *Oxya chinensis* were used as test insects in this study. A partial fragment of chitin synthase 1 cDNA from *O. chinensis* (*OcCHS1*) was amplified using a pair of degenerate primers. With the mid-2nd instar nymphs of *O. chinensis* and the 1st, 2nd, 3rd instar nymphs of *L. migratoria manilensis* dipped in flufenoxuron as treatments and acetone treatment as the control, the effects of flufenoxuron on the mRNA expression of chitin synthase genes were analyzed using RT-PCR and real-time quantitative PCR. The partial cDNA fragment of *OcCHS1* (GenBank accession number: HM214491) was obtained, which consists of 312 nucleotides that encode 104 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of *OcCHS1* showed 95% identity with those of *LmCHS1*. The results of RT-PCR and real-time quantitative PCR analysis showed that the expression of *OcCHS1* in the mid-2nd instar nymphs of *O. chinensis* and *LmCHS1* in the 1st, 2nd and 3rd instar nymphs of *L. migratoria manilensis* exposed to flufenoxuron increased 102%, 34%, 82% and 89%, respectively, compared to the control. Increased expression of *CHS1* mRNA may be due to compensation response of the *CHS1* gene at the transcriptional level that is caused by the retarded chitin synthesis. It is so inferred that chitin synthase may be one of targets of flufenoxuron.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*; *Oxya chinensis*; chitin synthase; flufenoxuron; gene expression; mechanism

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970410); 山西省留学基金项目(2009); 山西省青年基金项目(2007021030)

作者简介: 刘晓健, 女, 1983 年生, 河北平山人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: xiaojianliu1983@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zjz@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-03-25; 接受日期 Accepted: 2010-06-20

蝗灾是中国农业历史上的重大自然灾害,飞蝗和稻蝗是对禾本科作物危害最大的类群(陈永林, 2000)。目前在蝗虫防治工作中,仍以有机磷杀虫剂为主要手段,虽然传统杀虫剂防治蝗虫的效果显著,但已有报道表明某些东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 和中华稻蝗 *Oxya chinensis* (Thunberg) 自然种群已经对有机磷杀虫剂产生了一定程度的抗性(Ma *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009)。氟虫脲是苯甲酰基脲(benzoylphenyl ureas, BPUs)的一种,可作用于昆虫生长和发育的关键阶段,干扰昆虫的正常发育而使其死亡。与传统的有机磷农药相比,苯甲酰基脲类化合物具有不污染环境、对人畜安全以及对多数非靶标生物无害的优点(冒德寿等, 2001)。因此,苯甲酰基脲类杀虫剂具有成为环境友好型杀虫剂的开发潜力。

关于苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂的毒理学研究,自 20 世纪 70 年代已有研究学者从生化水平开展了大量研究工作。Mulder 和 Gijswijt (1973) 首次报道了灭幼脲 PH6038 干扰菜粉蝶 *Pieris rapae* 表皮几丁质的正常沉积; Hunter 和 Vincent (1974) 报道了灭幼脲对飞蝗也有类似的影响; 卡死克(氟虫脲)对东亚飞蝗体壁中的几丁质合成具有明显的抑制作用,对前胸背板中的几丁质合成抑制率为 60%~80% (王贵强等, 1996)。生化水平的研究表明: 氟虫脲等苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂均特异性地干扰昆虫表皮几丁质的合成。几丁质合成是一个复杂的过程,几丁质合成抑制剂作用于几丁质合成过程中的哪个环节尚不清楚。几丁质合成酶(chitin synthase, CHS)在几丁质合成途径的最后一步起着关键作用,该酶是否受几丁质合成抑制剂的影响,学者们存在不同的看法。Post 和 Vincent (1973) 发现敌灭灵 Du19111 抑制葡萄糖合成几丁质的过程,导致 N-乙酰葡萄糖胺的积累。N-乙酰葡萄糖胺加入几丁质合成酶后可以合成几丁质,由于加入 BPUs 后 N-乙酰葡萄糖胺出现沉积,由此推断 BPUs 可能影响几丁质合成酶,其后还有一些研究证据支持这一观点(Post *et al.*, 1974)。同时,一些研究表明,几丁质合成抑制剂并不直接抑制几丁质合成酶(Cohen and Casida, 1980; Cohen, 1985; Gangishetti *et al.*, 2009)。Deul 等(1978)以敌灭灵 Du19111 和灭幼脲处理菜粉蝶,其表皮几丁质合成酶的活性无论在处理活体还是离体情况下均无变化。本课题组在与美国堪萨斯州立大学合作研究中,发现几丁质合成抑制剂除虫脲影响双翅目昆

虫四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus* 几丁质的含量及几丁质合成酶基因 mRNA 的表达,在国际上首次从分子水平报道了除虫脲对几丁质合成酶基因表达的影响(Zhang and Zhu, 2006)。之后有日本学者以鳞翅目昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 为研究对象,得出定虫隆对几丁质合成酶基因表达没有影响的结果(Ashfaq *et al.*, 2007)。苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂是否影响几丁质合成酶,其作用靶标和毒性机制是怎样的,目前尚无系统性的研究。本实验以不完全变态昆虫的代表类群东亚飞蝗和中华稻蝗为研究对象,通过几丁质合成酶基因的克隆、药物处理和 mRNA 表达分析,研究氟虫脲对重要农业害虫东亚飞蝗和中华稻蝗的几丁质合成酶是否产生影响,从分子水平探讨苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂可能的作用靶标及作用机制,以期为进一步基于几丁质的合成途径设计新型杀虫剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫来源: 中华稻蝗虫卵采自太原市晋源区,东亚飞蝗虫卵购买自河北沧州蝗虫养殖公司,人工气候培养箱进行孵化,温度 $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%, 光照周期 14L: 10D。选择同一时间孵化的蝗蛹转移至纱笼中,给以新鲜小麦幼苗饲喂,喷水保持湿度。

1.1.2 主要试剂: RNAiso™ Plus, DNase I (RNase Free), TaKaRa 公司产品; M-MLV Reverse Transcriptase, T-easy 载体, Promega 公司产品; Taq DNA Polymerase, DNA Polymerase Mix, TIANGEN 公司产品; 氟虫脲, Sigma 公司产品; SYBR® Green Real-time PCR Master Mix, Applied Biosystems 公司产品。

1.2 中华稻蝗几丁质合成酶基因片段的扩增及序列分析

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成: 取 5 龄中华稻蝗若虫的表皮提取总 RNA,按照 RNAiso™ Plus 试剂说明书进行操作, DNase I (RNase Free) 处理所提取的 RNA,经电泳检测与定量后,用 M-MLV Reverse Transcriptase 合成第一链 cDNA。

1.2.2 引物的设计与合成: 根据已知昆虫几丁质合成酶 1 基因的氨基酸保守序列,设计一对简并引物 CHS1F: 5'-GAYGGNGAYATHGAYTT-3' 和 CHS1R: 5'-TCYTCNCCYTGRTCRTA-3', 引物由上海英骏公司合成。

1.2.3 PCR 扩增: 以中华稻蝗表皮 cDNA 第一链为模板, CHS1F/ CHS1R 为引物进行 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系中含 5 μ L 10 $\times$ reaction buffer; 2 mmol/L $MgCl_2$; 0.2 mmol/L dNTP; 15.5 μ L ddH₂O; 2 μ mol/L 上游/下游引物; 1 μ L cDNA 模板; 2.5 U Taq DNA Polymerase。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 30 s, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 退火温度从 56℃ 降至 48℃, 每摄氏度 2 个循环, 降至 48℃ 时再加 20 个循环, 共 38 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

1.2.4 PCR 产物克隆、鉴定及测序: 将与目标条带大小相符的片段经电泳回收纯化后, 连接到 T-easy 载体上, 转化到大肠杆菌 DH5 α , 挑取白色菌落, 培养后提取少量质粒, 用 *EcoR* I 酶切鉴定重组阳性克隆, 将重组阳性克隆送往北京奥科测序公司进行测序。

1.3 试虫处理

将 1 mg 氟虫脲用 1 mL 丙酮溶解, 配置成 1 mg/mL 的母液, 取 50 μ L 母液用水稀释至 1 mg/L, 采用浸渍法分别处理 2 龄中期中华稻蝗若虫以及 1, 2 和 3 龄东亚飞蝗若虫 10 s, 以丙酮(百分比浓度 $\geq 99.5\%$)处理作对照, 每组 20 头, 设置 3 个重复。处理后蝗虫转移至纱笼给以新鲜麦苗, 人工培养箱中饲养 72 h。选取对照组和处理组蝗虫的表皮, 按 RNAisoTM Plus 试剂说明书操作, 提取总 RNA, 并用 DNase I (RNase Free) 处理所提取的 RNA。电泳与定量检测后, 取 1.5 μ g RNA, 用 M-MLV Reverse Transcriptase 进行 cDNA 第一链合成。

1.4 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 分析氟虫脲处理后几丁质合成酶 1 mRNA 水平的表达

根据本研究中克隆得到的中华稻蝗几丁质合成酶基因部分 cDNA 序列和本课题组已提交到 GenBank 的东亚飞蝗几丁质合成酶基因 *LmCHS1* 全长序列(GenBank 登录号: GU067730), 设计特异性的表达引物。中华稻蝗上游引物 DCHS1F: 5'-AGAATAGAAATCTGGGAGCAGCAT-3', 下游引物 DCHS1R: 5'-CTCGAACATTTGATACCACACCAT-3'; 东亚飞蝗上游引物 FCHS1F: 5'-CTTGAGCCAATTGCTTTGGT-3', 下游引物 FCHS1R: 5'-TGAGTTCTGTGGATGCAAGG-3'。以丙酮处理的对照组和氟虫脲处理组中东亚飞蝗和中华稻蝗的表皮 cDNA 为模板进行 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 扩增, β -actin 为内参基因。RT-PCR 的反应体系中含 12.5 μ L DNA Polymerase Mix; 10.5 μ L ddH₂O; 0.5 μ mol/L 上游/下游引物; 1 μ L cDNA 模板。PCR 扩增程序:

94℃ 预变性 30 s, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s (*CHS1* 30 个循环, β -actin 26 个循环), 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳分析表达条带。实时荧光定量 PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green I 在 ABI Prism 7300(美国应用生物系统公司)进行, 目的基因和内参基因 β -actin 均采用 Real-time PCR Master Mix 进行 PCR 反应。25 μ L 反应体系: ddH₂O 9.5 μ L, SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L, 10 $\times$ cDNA 模板 2 μ L。PCR 反应条件为: 95℃ 10 min, 随后 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 共 40 个循环。Real-time PCR 仪自动生成熔解曲线, 以确定扩增条带的特异性。用 ABI Prism 7300 SDS 1.1(美国应用生物系统公司)软件进行数据记录分析, 阈值线由软件自动设定。处理组和对照组均设 3 个生物学重复, 每个样品 3 次技术重复。用灭菌超纯水代替 cDNA 模板作为空白对照。

1.5 数据统计与分析

测序结果利用 Blastn 程序在核酸数据库中进行相似性比对, DNAClub 软件搜索开放阅读框并翻译成氨基酸序列。实时荧光定量 PCR 结果采用比较 C_T 值的相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法)计算几丁质合成酶 1 基因的相对表达量。实验结果以平均数 $\pm$ 标准差(SD)表示。差异显著性采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为可接受的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 中华稻蝗几丁质合成酶 1 基因的克隆及序列分析

以 5 龄中华稻蝗表皮 cDNA 为模板, 用简并引物进行 PCR 扩增, 得到 1 条约 300 bp 的条带(图 1), 测序后长度为 312 bp, 编码 104 个氨基酸(图 2), GenBank 登录号为 HM214491。将该序列在 NCBI 网站上进行 Blastn 序列分析, 与东亚飞蝗几丁质合成酶 1 基因在氨基酸水平上相似度达 95%, 命名为 *OcCHS1*。

2.2 氟虫脲处理中华稻蝗后 *OcCHS1* mRNA 表达的变化

氟虫脲处理 2 龄中华稻蝗若虫后对 *OcCHS1* mRNA 的表达分析显示(图 3): 中华稻蝗处理组的 RT-PCR 扩增带强于对照组; 实时荧光定量 PCR 结果表明处理组 *OcCHS1* 基因表达较对照组提高了 1.02 倍, 统计学分析表明差异显著($P < 0.05$)。

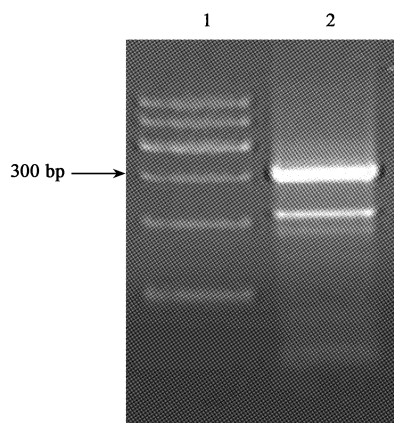


图1 中华稻蝗几丁质合成酶1基因(*OcCHS1*)部分cDNA片段的扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of the partial cDNA fragment of chitin synthase 1 gene (*OcCHS1*) from *Oxya chinensis*

1 GACGGGACATAGACTTCCAACCTCATGCTGTTTCATCTATTGGTTCACTTGATGAAGAAG
D G D I D F Q P H A V H L L V H L M K K
61 AATAGAAATCTGGGAGCAGCATGTGGCCGATTACCCCTGTTGGTTCTGGACCCATGGTG
N R N L G A A C G R I H P V G S G P M V
121 TGGTATCAATGTTTCGAGTATGCCATTGGCATTGGCTGCAGAAAGCAACAGAACATATG
W Y Q M F E Y A I G H W L Q K A T E H M
181 ATCGGTTGTGTCCTCTGTAGCCCTGGATGTTTCTCTCTCTTCAGAGGGAAGTCACTTATG
I G C V L C S P G C F S L F R G K S L M
241 GATGATTGTGTGATGAACAAATATACACACGATCAGAGGAAGCTCGACACTATGTGCAA
D D C V M N K Y T T R S E E A R H Y V Q
301 TACGACCGGGC
Y D Q G

图2 中华稻蝗几丁质合成酶1基因(*OcCHS1*)cDNA部分核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the partial cDNA fragment of *OcCHS1*

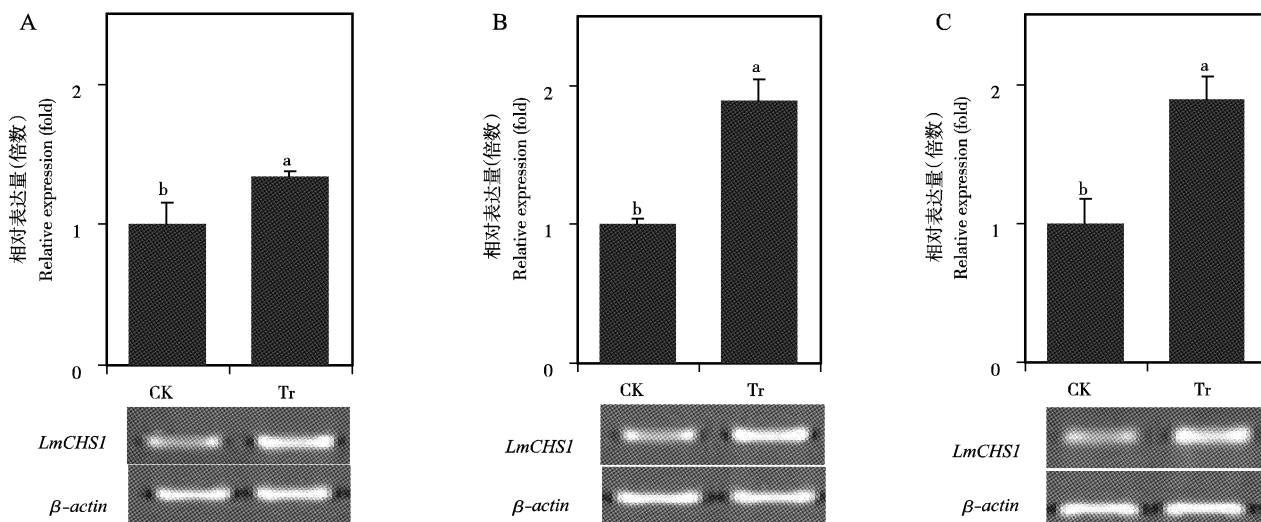


图4 利用RT-PCR和Real-time PCR技术分析氟虫脲处理1(A), 2(B)和3龄(C)东亚飞蝗若虫后*LmCHS1*的mRNA表达

Fig. 4 Analysis of the effect of flufenoxuron on *LmCHS1* expression in the 1st (A), 2nd (B) and 3rd (C) instar nymphs by RT-PCR and Real-time PCR

A, B, C 分别为1, 2, 3龄东亚飞蝗试验结果 A, B, C represent the results of the 1st, 2nd and 3rd instar nymphs, respectively; CK: 对照组 Control; Tr: 处理组 Treatment. 柱上不同字母表示对照组和处理组之间有显著差异($P < 0.05$, Student's *t*-test). Different letters above bars mean significant difference between the treatment and the control ($P < 0.05$) using Student's *t*-test.

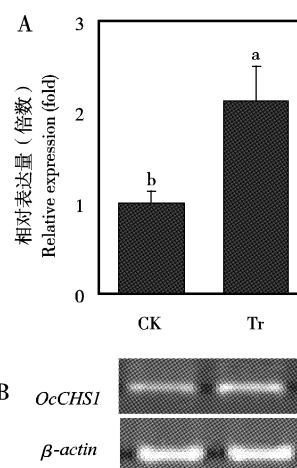


图3 利用RT-PCR和Real-time PCR技术分析氟虫脲处理2龄中华稻蝗若虫后*OcCHS1*的mRNA表达

Fig. 3 Analysis of the effect of flufenoxuron on *OcCHS1* expression in the 2nd instar nymphs by RT-PCR and Real-time PCR

A: Real-time PCR结果 Real-time PCR results; B: RT-PCR结果 RT-PCR results; CK: 对照组 Control; Tr: 处理组 Treatment. 柱上不同字母表示对照组和处理组之间有显著差异($P < 0.05$, Student's *t*-test). Different letters above bars mean significant difference between the treatment and the control ($P < 0.05$) using Student's *t*-test.

2.3 氟虫脲处理东亚飞蝗后*LmCHS1* mRNA表达

由图4可见, 氟虫脲处理1, 2和3龄东亚飞蝗若虫后, *LmCHS1*的mRNA表达分别比对照提高了34%, 82%和89%, 差异显著($P < 0.05$)。结果表明: 氟虫脲可以显著提高东亚飞蝗几丁质合成酶1基因的mRNA表达。

3 讨论

氟虫脲是苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂的一种, 对东亚飞蝗具有高效毒杀作用(雷仲仁等, 2002)。该类杀虫剂主要影响昆虫表皮几丁质的形成, 但确切的作用机制尚不清楚。几丁质合成酶是几丁质合成途径的关键酶(Merzendorfer and Zimoch, 2003), 该酶作为潜在靶标在苯甲酰基脲类杀虫剂的机理研究中备受关注。几丁质合成酶基因相对较大, 基因克隆和体外表达均存在较大的难度, 因此, 前人的研究大部分都集中在生化水平。随着分子生物学的快速发展, 昆虫几丁质合成酶基因相继被克隆, 经相关软件分析表明, 该酶是一个大的跨膜蛋白, 预测其功能是在膜内将尿苷二磷酸酯-N-乙酰氨基葡萄糖合成几丁质, 然后运输到膜外, 并可能参与几丁质在表皮的有序排列(Merzendorfer, 2006)。

本实验室以中华稻蝗为材料, 比较了除虫脲、氟虫脲和定虫隆 3 种苯甲酰基脲类几丁质合成抑制剂的作用效果, 发现氟虫脲对蝗虫的毒性作用最强。处理组出现若虫因蜕皮受阻而死亡的现象, 且对进食量和蝗虫增重产生明显的影响(曾慧花等, 2008)。为了从分子水平探讨几丁质合成酶在几丁质合成抑制中的作用, 我们克隆了东亚飞蝗几丁质合成酶 1 两个不同剪切子(*LmCHS1A* 和 *LmCHS1B*) 的全长序列(GenBank 登录号分别为 GU067730 和 GU067731), 并采用 RNA 干扰技术研究了其生物学功能, 发现干扰飞蝗几丁质合成酶 1 基因后若虫表现出因蜕皮困难而死亡的现象, 与氟虫脲处理蝗虫后的表型极为相似。RNA 干扰飞蝗几丁质合成酶 1 基因后的 mRNA 表达分析表明, *LmCHS1* 的表达被抑制 80% 左右(Zhang *et al.*, 2010)。基于这些研究结果, 我们的假设是: 氟虫脲是否也会抑制几丁质合成酶基因的表达? 从而导致几丁质合成困难, 出现蜕皮困难而死亡的现象。

我们选用两个直翅目物种东亚飞蝗和中华稻蝗为材料来回答几丁质合成酶基因的表达是否会受氟虫脲抑制的问题。为此, 在本研究中, 进一步克隆了中华稻蝗几丁质合成酶 1 基因的部分片段, 命名为 *OcCHS1*。用 1 mg/L 的氟虫脲浸渍法处理 1, 2 和 3 龄东亚飞蝗若虫和 2 龄中华稻蝗若虫, 结果发现氟虫脲可显著提高蝗虫几丁质合成酶 1 基因的 mRNA 表达。比较分析氟虫脲处理和 RNA 干扰结

果, 发现氟虫脲与 RNA 干扰虽然都导致蝗虫蜕皮困难而死亡, 但推测作用机理是不同的, 因为氟虫脲并没有抑制几丁质合成酶 1 的 mRNA 表达, 而是显著提高该酶基因的表达。

为什么氟虫脲处理蝗虫后几丁质合成酶 1 基因的 mRNA 表达会提高? 经文献查阅和综合分析认为: 氟虫脲引起几丁质合成受阻, 可能导致几丁质合成酶 1 基因的 mRNA 的表达代偿性增加。这种现象在按蚊几丁质合成酶的研究(Zhang and Zhu, 2006)和重金属对 P450 影响的研究中也被观察到(Korashy and El-Kadi, 2005)。基于我们的实验结果和果蝇几丁质合成酶突变体的研究(Devine *et al.*, 2005), 推测氟虫脲引起几丁质合成酶代偿性表达后, 可能会导致几丁质合成酶的冗余, 过多的几丁质合成酶聚集在膜的周围, 会使这个大的跨膜蛋白空间结构受到影响, 从而干扰几丁质的正常合成, 影响蝗虫正常的蜕皮和生长发育, 出现蜕皮困难而死亡的现象。几丁质合成酶的体外表达及相关蛋白水平的工作正在进行, 结果将帮助我们验证假设是否成立, 为阐释几丁质合成抑制剂的靶标及作用机制提供科学依据。

参考文献 (References)

- Ashfaq M, Sonoda S, Tsumuki H, 2007. Developmental and tissue-specific expression of *CHS1* from *Plutella xylostella* and its response to chlorfluazuron. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 20–30.
- Chen YL, 2000. The study on locusts and its main achievements in China. *Entomological Knowledge*, 37 (1): 50–58. [陈永林, 2000. 中国的飞蝗研究及其治理的主要成就. 昆虫知识, 37 (1): 50–58]
- Cohen E, 1985. Chitin synthase activity and inhibition in different insect microsomal preparations. *Experientia*, 41: 470–472.
- Cohen E, Casida JE, 1980. Inhibition of *Tribolium* gut chitin synthase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 13: 129–136.
- Deul DJ, Jong BJ, Kortebach JAM, 1978. Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides II. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 8: 98–105.
- Devine WP, Lubarsky B, Shaw K, Luschnig S, Messina L, Krasnow MA, 2005. Requirement for chitin biosynthesis in epithelial tube morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47): 17014–17019.
- Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Müller U, Schwarz H, Moussian B, 2009. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *European Journal of Cell Biology*, 88: 167–180.
- Hunter E, Vincent JF, 1974. The effects of a novel insecticide on insect cuticle. *Experientia*, 30: 1432–1433.

- Korashy HM, El-Kadi AOS, 2005. Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P4501A1 gene by heavy metals. *Toxicological Sciences*, 88(1): 39–41.
- Lei ZR, Wen JZ, Lv YG, Wang Y, Huang H, 2002. Evaluations on the toxicity and applicability of several insect growth regulators for controlling oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Plant Protection*, 28(2): 5–7. [雷仲仁, 问锦曾, 吕远刚, 王音, 黄虹, 2002. 几种昆虫几丁质抑制剂对东亚飞蝗的毒力测定和应用评价. 植物保护, 28(2): 5–7]
- Ma EB, He YP, Zhu KY, 2004. Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78: 67–77.
- Mao DS, Lin J, Liu FC, 2001. Recent development of benzoylurea chitin synthesis inhibitors. *Pesticides*, 40(4): 6–12. [冒德寿, 林军, 刘复初, 2001. 苯甲酰脲类几丁质合成抑制剂的进展. 农药, 40(4): 6–12]
- Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases; a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 1–15.
- Merzendorfer H, Zimoch L, 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206: 4393–4412.
- Mulder R, Gijswijt MJ, 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pesticide Science*, 4: 737–745.
- Post LC, Jong BJ, Vincent WR, 1974. 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 4: 473–483.
- Post LC, Vincent WR, 1973. A new insecticide inhibits chitin synthesis. *Naturwissenschaften*, 60: 431–432.
- Wang GQ, Yan YH, Zhang L, Zheng YL, Zhao P, 1996. The effect of insect growth regulator on body weight and cuticle of locusts. *Modernizing Agriculture*, (8): 5–7. [王贵强, 严毓骅, 张龙, 郑玉龙, 赵萍, 1996. 昆虫生长调节剂对飞蝗体重及表皮的影响. 现代化农业, (8): 5–7]
- Wu HH, Yang ML, Guo YP, Ma EB, 2009. The susceptibilities of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea) to malathion and comparison of the esterase properties from three collected populations in Tianjin area, China. *Agricultural Sciences in China*, 8(1): 76–82.
- 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). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 71(1): 3–15.
- Zeng HH, Zhang JJ, Yang ML, Guo YP, Ma EB, 2008. Toxic effect of diflubenzuron on *Oxya chinensis*. *Sichuan Journal of Zoology*, 27(5): 835–836. [曾慧花, 张建珍, 杨美玲, 郭亚平, 马恩波, 2008. 几丁质合成抑制剂除虫脲对中华稻蝗的毒性效应研究. 四川动物, 27(5): 835–836]
- Zhang JZ, Liu XJ, Zhang JQ, Li DQ, Sun Y, Guo YP, Ma EB, Zhu KY, 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11): 824–833.
- Zhang JZ, Zhu KY, 2006. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 712–725.

(责任编辑: 赵利辉)