

出國報告（出國類別：國際研討會）

第 60 屆美國昆蟲學會年會

服務機關：國立中興大學昆蟲系

姓名職稱：戴淑美 副教授

出國地區：美國田納西州諾斯克維爾

出國期間：101 年 11 月 11 日 至 100 年 11 月 14 日

報告日期：101 年 11 月 30 日

摘要

第60屆美國昆蟲學年會(60th Annual Meeting of the Entomological Society of America)於美國田納西州的諾斯克維爾舉行,主題為一個為全球科學存在的全球學會(A Global Society for a Global Science),在此新視野下,成功吸引大量的高品質專題討論會(symposia)。從49個國家,將近3,000 個學者組成103專題討論會與總共2,485 篇的論文發表,其中包括405個一般海報(posters)、230 個學生海報比賽與33 個虛擬海報(virtual posters)。議題主要涵蓋:(一)節肢動物基因體學的全球觀(A Global View of Arthropod Genomes), (二)非脊椎生物的基因轉殖(Transgenic Engineering of Invertebrate Species), (三)以水生昆蟲偵測全球變化 (Aquatic Entomology as a Measure of Global Changes), (四)全球節肢動物的忌避研究與發展 (Global Arthropod Repellent Research and Development), (五)微生物防治藥劑的永續性:目前的挑戰、最近的發展與未來的需要(Persistence of Microbial Control Agents: Current Challenges, Recent Advancements and Future Needs), (六)蟎蟬學的最新進展(Current Advances in Acarology), (七)第四代殺蟲劑: RNA干擾或後轉錄基因默化的介紹[An Introduction to RNA Interference (RNAi) or Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS): Fourth Generation Pesticides]等。其中RNA干擾技術的應用仍是此次會議的寵兒,每一場相關專題討論會均擠滿感興趣的聽眾。此次參加會議主要的目的除了以海報型式發表最近在二化螟抗藥機制的後續研究成果,也希望藉此機會獲得相關領域的最新研究進展與認識更多各國的昆蟲學家。

目次

一、目的	4
二、參加會議經過	4
三、與會心得	7
四、建議	7
五、攜回資料名稱及內容	7
六、附錄 A：發表海報（一）	8
附錄 B：發表海報（二）	9

本文

一、目的：

美國昆蟲學會(The Entomological Society of America, ESA)是世界上最大的昆蟲專業與科學服務組織，成立於 1889 年，目前擁有超過 6,000 名的會員。此學會的首要活動是每年輪流在美國境內不同地區舉辦年會，號招各方昆蟲學家與其他科學家發表討論相關研究資訊。除此之外，也提供會議(conferences)、論文提交(submitted papers)、繼續教育研討會(continuing education seminar)、學生口頭報告或海報展示比賽、同行與雇主雇員間的交流等機會。值得一提的是此學會逐漸從美國境內的昆蟲學會轉型為國際性的昆蟲學會，近年來外國會員均以每年 50% 的速度增長，發表論文的外國作者也占一半以上。今年又特別以”一個為全球科學存在的全球學會(A Global Society for a Global Science)”為主題，吸引從 49 個國家、將近 3,000 名學者組成 103 個高品質的專題討論會(symposia)。在這種屬性的研討會中，有很多機會可以獲得不同領域的最新研究成果與動向，並與熟識或新認識的研究人員相互交流訊息。因此，在獲知本次會議的主題後，即積極籌畫參與此年會。一方面以海報形式發表最近的研究成果：A314S substitution in acetylcholinesterase resulting in changes of its catalytic efficiency contributes to carbofuran resistance in *Chilo suppressalis*，另一方面則聽取相關領域的最新發展趨勢，認識更多慕名已久的昆蟲學家。

二、參加會議經過：

11 月 9 日(五)

晚上 11 點 50 分由桃園中正國際機場起程，當天晚上 8 點 30 分抵達洛杉磯。在機場附近旅館過夜，方便隔天一早搭七點 50 分的飛機前往目的地。

11 月 10 日(六)

早上 7 點 50 分搭乘中型飛機前往亞特蘭大，飛行時間比預定少一小時，於 2 點左右提前抵達。亞特蘭大機場十分大，從下機的 E 出機門到前往 Knoxville 的 C 登機門至少要走 20 分鐘以上，幸好在中途某轉折點有電車可搭乘，節省一半時間。下午 4 點 10 分換搭不到 100 人坐的小飛機到會議舉行的小城 Knoxville。因為時差關係，到達下榻旅館時天色已黑。簡單安頓後即搭大會安排的會場旅館穿梭巴士到會場報到，順使用過晚餐後才回旅館休息，準備參與隔天各項感興趣的相關會議報告。

11月11日(日)

第一天有多個重要的研討會主題，上午先參加"全球節肢動物的忌避劑研究與發展"研討會，在會中獲得多個重要訊息與觀念。例如：(一) 開發自然產物或綠色化學物質作為蚊子的忌避劑，包括由夏威夷或印度偏方所萃取的長鏈脂肪酸。(二) 進行忌避實驗所用的生物檢定方法與取代血液的溶液配方。(三) 在費洛蒙中加入殺蟲劑以降低害蟲為害。接著則參加下午的"第四代殺蟲劑：RNAi"的介紹，這個主題在近年來的研討會十分熱門，晚到的人只能站在門口聽講。目前 RNAi 的應用主要有三：作為治療劑使用、改良作物與防治害蟲。在防治害蟲方面要注意的有目標抑制基因的選擇、輸送方式(如何導入蟲體)與穩定性。令人印象較深刻的是將 RNAi 做成餌料讓欲防治的昆蟲吃進體內，以達基因默化效果。重要研究例子有白蟻與牛蟬。晚上則參加學會的歡迎茶會，在多人致詞與頒獎後，原預期有可以裹腹的食物，沒想到大排長龍之後，卻只有數量有限的玉米片與味道奇怪的炸雞塊，只得在人生地不熟的地方冒雨覓食。

11月12日(一)

這一天的活動大多為學生的演講比賽與壁報比賽，所以上午留在住宿旅館調整時差，並努力撰寫趕著要繳交卻未能在出國前完成的期末報告。中午才搭接送巴士到會場觀看海報與廠商展覽的產品，以及張貼隔天要展示的海報。此次會議共發表兩篇海報論文：(一) 有關水稻害蟲二化螟的抗藥性研究-- A314S substitution in acetylcholinesterase resulting in changes of its catalytic efficiency contributes to carbofuran resistance in *Chilo suppressalis*, (二) 有關登革熱病媒蚊埃及斑蚊的抗藥性研究。

11月13日(二)

星期二早上有兩個值得一聽的專題討論會：(一) 危機會驅動革新嗎？昆蟲抗藥性管理：Proactive 或 Reactive? (二) RNAi：從基礎科學到全球應用 (From Basic Science Toward Global Application)。但由於早上 10:00 必須到海報展示區向觀看者說明內容細節，因此僅能至上述第一個討論會聽取兩場演講。第一場演講是關於科羅拉多馬鈴薯甲(Colorado potato beetle)的抗藥性問題，第二場則是西方玉米根蟲(Western corn rootworm)對 BT 轉基因作物的抗藥性問題，二者均是著名的舊害蟲，卻始終面臨抗藥性問題的挑戰。究竟要如何避免或延緩抗藥性的發生？從一開始就減少抗藥性產生的可能性(Proactive)或翻轉已經產生的抗藥性(Reactive)，或者二者並行？但是無論用哪一種策略，輪用不同作用機制的藥劑與採行其他綜合防治方法都是必要的措施的。至於是否要採用高劑量防治策略，則需要考慮抗藥性遺傳特性。

雖然無法參與後續的討論會，在海報展示區卻意外認識從事"除蟲菊抗藥機制研究"的著名專家 Professor Ke Dong，原本以為是外國人，沒想到是從中國大陸到康乃爾大學取得博士後，留在美國的女教授。進一步彼此交流後詳細交談

後更熟悉彼此之間的研究進展，這是這次參加此次會議最大的收穫之一。

下午去聽專題討論會是有關於 RNAi 的應用效能、前景與挫折。RNAi 的基因功能默化，無論在蚊子、西方玉米根蟲或菸草天蛾(*Manduca sexta*)都有詳細介紹。其中最受矚目的議題之一是：如何可以把雙股 RNA 送入蟲體？目前使用的方法有：直接注射、注射攜帶此雙股 RNA 的質體、餵食(如蜜蜂)、浸泡(如蚊子幼蟲)等，每一種方法的轉基因效果因蟲而異，其中仍以注射的成功率最高。

11 月 14 日(三)

星期三雖是年會議程的最後一天，但仍有仍十分精彩的專題討論持續進行。上午有“永續害蟲管理的新工具”，下午則有“後基因體時期中環境反應基因的功能、調節與演化”。

在上午的專題討論中，比較引人注意的是 DNA 甲基化與蚜蟲的多型性有關。對昆蟲而言，只有 <1% 的 DNA 會被甲基化，但與外型相關的 31 個基因卻高度甲基化。另外，在綜合害蟲管理工具箱 (IPM toolbox) 中可選用那些殺蟲劑？從大鼠與昆蟲的半致死劑量 (LD50) 的比值歸納出相對比較安全的藥劑，包括：Pyrazole carboxamides, Quinazolines, sulfoximines, Butenolides, Cis-nitromethylenes, Milbemysins 等。最後，Professor Ke Dong 說明如何藉著在 Domain II 上已知的抗擊昏作用(knockdown resistance, kdr)點突變預測其他未偵測而可能存在的點突變，將具有預測新點突變的那離子通道基因表現在蠨螋的胚胎上，確定在 Domain I 相對位置的點突變也會引起蚊子對合成除蟲菊殺蟲劑的抗擊昏作用。

下午的專題討論首先講到科羅拉多馬鈴薯岬的氧化酶體(CYPome)，在此蟲中有 20 個會過度表現 41 個會被誘導表現的 CYP 基因，其中益達胺可在脂肪體誘導 CYP6 與 CYP9 的表現，植物毒素則在腸道誘導表現。如果餵食 RNAi，可使此蟲的 CYP 表現量降低。另外兩個有趣的議題分別為：(一)自私對偶基因：害蟲抗藥性的分子演化，(二)CYP 的上游調節與害蟲抗藥性的關係。前者提到抗藥性的演化與抗藥對偶基因的遺傳、適應性與用藥前的頻度有關。由於在 120 種對偶基因 haplotypes 中，感性的數目(>100)遠超過抗性的數目，因此監測抗藥性時應以抗性對偶基因為主。後者提到 G-protein couple receptor (GPCR) 的訊息傳遞途徑可能與抗藥性有關，目前已知在抗百滅寧的蚊子中，rhodopsin-like GPCR 基因可被誘導表現。因此，GPCR、protein kinase A 與 CYP 之間的交互作用與害蟲抗藥性有關。

晚上雖然有閉幕典禮，隔天有遊覽行程，但在聽完下午的專題討論之後即搭機至洛杉磯。

11 月 15 ~ 17 日：洛杉磯私人行程。

11 月 18 日(日)：搭機返台。

11 月 19 日(一)：抵達台灣。

三、與會心得：

此次參與第 60 屆美國昆蟲學年會除了獲知許多新的研究發展趨勢與會見舊識之外，更重要的是認識兩位從事昆蟲毒理學研究的著名專家：一是康乃爾大學昆蟲系的 Professor Jeffery G. Scott，另一名是密西根州立大學的 Professor Ke Dong，並在海報展示期間與 Professor Dong 有非常深入的交流。另外，在第一天的“全球節肢動物的忌避劑研究與發展”研討會中，獲得進行忌避實驗所用的生物檢定方法與取代血液的溶液配方，並與講者討論相關細節。僅此三人的演講或海報展示就讓我覺得收穫滿滿，不虛此行。

四、建議：

在獲得國科會計畫之前，雖然想出國參加研討會，但因缺乏經費而無法成行。但在 2009 年獲得國科會計畫補助之後，才開始有機會參加亞太昆蟲研討會、世界昆蟲研討會、分子昆蟲科學國際研討會與美國昆蟲學年會等國際會議，才開始有機會與相關領域的科學家有實質的交流、開拓視野，並從中獲取新知，這對於從事學術研究的大學教授們是非常有幫助的。不過由於現在獲得國科會計畫補助的機率愈來愈小，如未獲得補助就沒有機會出國研習，十分可惜。因此建議：無論是否獲得國科會的研究計畫補助，希望國科會均能支持學術或研究單位的研究人員與學生多參與相關領域的國際會議，以增加參與者與更多他國專家交流的機會，增廣參與者的視野與見聞，以及相關研究成果與效益。

五、攜回資料名稱：

1. Program Book of ESA 60TH ANNUAL MEETING.



A314S substitution in acetylcholinesterase resulting in changes of its catalytic efficiency contributes to carbofuran resistance in *Chilo suppressalis*

Shu-Mei Dai^{1*}, Hsuan-Jen Chien², Xin-Yi Huang¹, Cheng Chang³

¹ Department of Entomology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan
² Plant Protection Division, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan
³ Biotechnology Centre, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan
 * Correspondence: sda15497@dragon.nchu.edu.tw

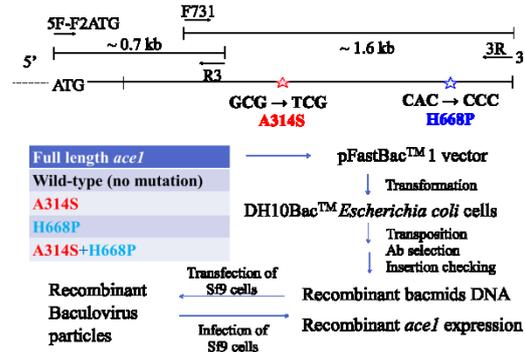


Background

Rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker, is one of the most important rice insect pests in Taiwan. Under heavy insecticide applications, more than 1000-fold resistance to carbofuran has been detected in certain field strains of this stem borer. Modified acetylcholinesterases (AChE) with A314S and H668P amino acid substitutions was found to be associated with this resistance¹. The aim of this study is to further confirm this association by using AChEs expressed in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells with the Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System.

Materials and Methods

Generation of recombinant baculovirus and expression of *ace1*:



Enzyme kinetics:

The activity of AChE was measured according to Ellman (1961)² by using the lysate of P3-infected Sf9 and homogenates of *C. suppressalis* collected from Changhua.

Results

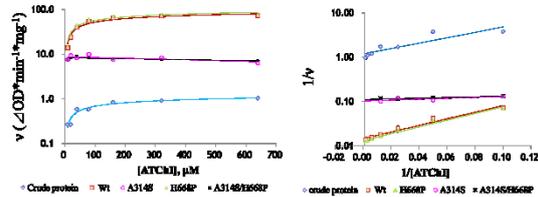


Figure 1. Saturation curve and Lineweaver-Burk plot of Michaelis-Menten kinetics for expressed AChEs and crude extracts of *C. suppressalis*.

Table 1. K_m and V_{max} of expressed AChEs and crude extract of *C. suppressalis*

	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m (Efficiency of catalysis)	Ratio
Crude Protein	26.8	0.86	0.03	
Wt	60.0	100.0	1.67	1
H668P	57.0	100.0	1.75	1.05
A314S	2.7	10.0	3.70	2.21
A314S/H668P	1.9	9.1	4.79	2.81

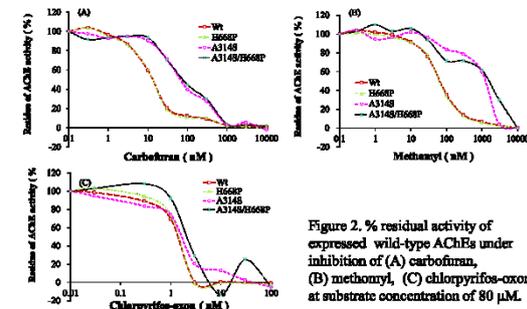


Figure 2. % residual activity of expressed wild-type AChEs under inhibition of (A) carbofuran, (B) methomyl, (C) chlorpyrifos-oxon at substrate concentration of 80 μ M.

Conclusions

1. The activity of all four expressed AChEs is significantly higher than that of crude extract of *C. suppressalis*. There is more than 100-fold difference between V_{max} of crude extract and expressed wild-type AChE of this rice stem borer.
2. Although the specific activity of A314S substituted AChE is considerably lower, the overall catalytic efficiency is higher than that of wild-type and H668P substituted AChE due to a compensation of increase in binding affinity (or a decrease in K_m).
3. AChE with A314S substitution is less sensitive to the inhibition of carbofuran and methomyl, which confirms that A314S substituted AChE is responsible for the carbofuran resistance in *C. suppressalis*.

References

1. Chang, C., X. Cheng, and S.M. Dai. 2010. Acetylcholinesterase point mutations associated with carbofuran resistance in *Chilo suppressalis*. The 58th Annual Meeting of the Entomological Society of America, Dec. 12-15, 2010.
 2. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Acknowledgements

This study was supported by the National Science Council, R.O.C., under grant NSC98-2313-B-005-030-MY3.

附錄 B：發表海報(二)



國立中興大學
National Chung Hsing University



Significantly Elevated Expression of the *cyp 9* Genes in a Permethrin Resistant Strain of *Aedes aegypti*

Cheng Chang^a, Xin-Yi Huang^b, Wen-Kai Shen^b, and Shu-Mei Dai^b

^a Biotechnology Center, National Chung-Hsing University ^b Department of Entomology, National Chung-Hsing University, Taichung 40227, Taiwan, R.O.C.

Introduction

Aedes aegypti is major carrier to transmit a wide variety of human and veterinary diseases including yellow fever, dengue fever, and dengue hemorrhagic fever. Up to date, effective control this vector still highly dependent on chemical insecticides. However, resistance to pyrethroid insecticides in mosquitoes has occurred and becomes a major threat to disease control programs after routine application. In general, two different mechanisms are involved in pyrethroid resistance, an increase in the rate of detoxification and insensitivity of target site. Mutations of *para* gene associated with knockdown resistance in Per-R resistant strain of *Ae. aegypti* have been identified¹. Although changes in esterase, mono-oxygenases, and glutathione transferases are known to contribute to the resistance, little is known about these metabolic resistance mechanisms. The goal of this research is to identify potential candidates that response to the developed permethrin resistance in our previous established Per-R strain.

Cytochrome P450s Are Responsible to Permethrin Resistance

Cytochrome P450s (CYPs) are enzymes mediated detoxification of both endogenous compounds and xenobiotics. Using mosquito larva bioassay, we found the LC50 values of permethrin in Per-R dropped from 334.5 to 21.3 µg/ml when assayed with piperonyl butoxide (PBO) [Table 1]. The synergistic effect gave the first clue that cytochrome P450 contribute to permethrin resistance development. Moreover, the total monoxygenase activity also increase 1.9-fold in Per-R was found compared to it in susceptible Bora Bora strain.

Table 1. Synergistic effect of PBO in different *Aedes aegypti* strains

Strain	Insecticide	Synergist	LC ₅₀ (µg/ml)	SR ²	RR ₅₀ ³
Bora Bora	Permethrin	-	1.78	-	-
		PBO ¹	0.27	6.5	-
Per-R42	Permethrin	-	334.50	-	100.3
		PBO ¹	21.30	15.7	12.1

¹ PBO, piperonyl butoxide
² SR (synergism ratio) = LC50 (no synergist) / LC50 (with synergist)
³ RR (resistant ratio) = LC50 (Per-R42) / LC50 (Bora Bora)

Determination of Expression Profile of *cyp 9* Genes in *Aedes aegypti*

Recently, Strode et al.² reported an unusual expansion of CYP9 gene family in *Ae. aegypti*. To test whether or not the CYP9s expression involves in permethrin resistance, we designed primer sets from conserved region of CYP9 to identify expressed potential targets of permethrin resistance in *Ae. aegypti* [Fig. 1].

Fig. 1. Conserved regions of CYP9 amino acid sequence alignment for design of degenerate primers

	200	210	220	540	550	560
CYP9H1v1.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCAK			RSKIDTGVYI	FFGVGFNRCIG	
CYP9H1v2.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCAK			RSKIDTGVYI	FFGVGFNRCIG	
CYP9H1v3.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSBS			RSKIVFGYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H1v4.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSBS			RSKIVFGYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H1.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCAK			RSKIVFGYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H2.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSSE			KASINMGAYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H3.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSER			KGSIRTGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H4.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H5.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H6.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H7.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H8.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H9.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H10.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H11.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H12.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H13.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H14.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H15.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H16.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H17.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H18.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H19.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H20.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H21.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H22.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H23.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H24.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H25.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H26.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H27.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H28.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H29.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H30.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H31.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H32.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H33.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H34.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H35.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H36.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H37.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H38.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H39.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H40.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H41.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H42.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H43.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H44.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H45.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H46.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H47.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H48.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H49.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	
CYP9H50.pro	TLSEAFYI-SKMRHMFELVADCSGD			KRNINLGVYI	FFGAGFNRCIG	

Oligonucleotide primer sequences used for <i>cyp 9</i> gene		
Gene	Primer	Sequence (5'-3')
CYP9	forward	ACDYTGAGTCCDGGCHTYACBGG
	reverse	CAGTITYCKNGGDCDRYNCRAACGG

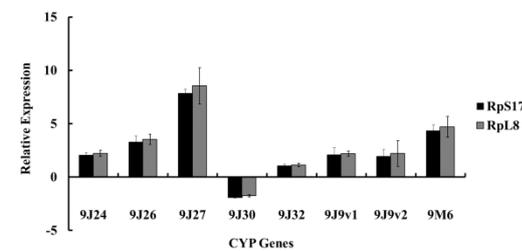
Quantitative RT-PCR Analyzing for Resistance Related *cyp* Candidates

After RT-PCR analysis, subcloning, and DNA sequencing of susceptible and resistance mosquitoes, eight *cyp 9* genes, i.e. 9J24, 9J26, 9J27, 9J30, 9J32, 9J9v1, 9J9v2, and 9M6, were identified that expressed in both larva and adult stages.

CYP Activity Is Contribute to Permethrin Resistance

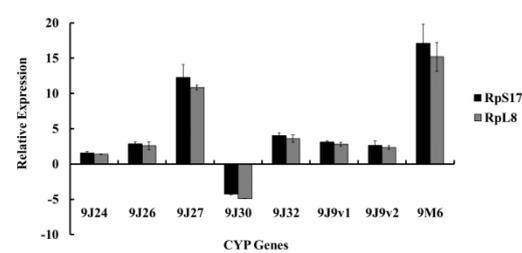
Specific primer sets for the individual *cyp 9* gene were synthesized, and their expression profiles were analyzed using RT-real time PCR. After internal calibration with ribosomal protein gene *S17* (RpS17), 9J27, and 9M6 revealed 7.8- and 4.3-fold elevation in resistant larva. Another internal control, ribosomal protein gene *L8* (RpL8), gave similar and reproducible results [Fig. 2]. Most *cyp 9* genes reveal elevation in Per-R except the 9J30.

Fig. 2. Relative expression patterns of individual *cyp 9* gene in between susceptible and resistance mosquito larva



and 9M6 gave 1.6-, 2.9-, 12.3-, 4.0-, 3.1-, 2.7-, and 17.1-fold increase in Per-R, respectively [Fig. 3]. Under permethrin selection pressure, 9J27, and 9M6 had been highly induced in adult mosquitoes as the observation in larva stage.

Fig. 3. Relative expression levels of individual *cyp 9* gene in between susceptible and resistance adults



Conclusions

In this study, we identify several *cyp 9* genes reveal up regulation in resistance Per-R mosquitoes. The observed elevation of *cyp 9* expression provides another line of evidence indicates the cytochrome P450s involved in permethrin resistance development. The functions of individual CYP9 enzyme involve in permethrin metabolic pathway will be examined in near future.

References

- Chang, C., Shen, W.K., Wang, T.T., Lin, Y.H., Hsu, E.L., Dai, S.M. (2009). A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 39: 272-278.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lunjara N, Nelson, D.R., Drane, D.R., Kammerstein, S.E., Homingway, J., Block, W.C. 4th, Ransaw, H. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 38: 113-123.