

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.01.003

薇甘菊颈盲蝽细胞色素 P450 *PmCYP4* 基因克隆及表达分析

张传光^{1,2}, 泽桑梓³, 朱家颖⁴, 季梅², 刘凌², 张乃明^{1*}

¹云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201; ²云南省林业科学院, 云南昆明 650204;

³云南省林业有害生物防治检疫局, 云南昆明 650051; ⁴西南林业大学, 云南昆明 650224

摘要:【目的】薇甘菊颈盲蝽是入侵植物薇甘菊的天敌昆虫。CYP4 家族基因在专食性昆虫与宿主植物的相互作用中发挥着极其重要的作用, 探明其不同部位的表达情况, 可为薇甘菊生物控制提供科学依据。【方法】采用 RACE 技术克隆薇甘菊颈盲蝽 *CYP* 基因, 实时荧光定量 PCR 检测其在不同部位的表达情况。【结果】*PmCYP4C1* 基因全长 1713 bp, 其中 ORF 长 1500 bp, 共编码 500 个氨基酸, 理论分子质量为 57.44 ku, 无信号肽; 与其他昆虫 CYP4 家族基因的同源性大于 40%, 与温带臭虫 *CYP* 的亲缘关系最近。该基因在雌、雄虫各部位均有表达, 且都是足部的表达量明显地高于其他部位; 雌、雄虫的表达差异在于雄虫翅膀中的表达量明显地高于触角和残体, 但在雌虫中这 3 个部位的表达量无显著差异, 且雄虫翅膀中的表达量显著地高于雌虫, 是其 2.37 倍。【结论】薇甘菊颈盲蝽 *PmCYP4* 基因除参与代谢有毒物质外, 其主要功能可能是编码与薇甘菊颈盲蝽运动相关的酶。

关键词: 薇甘菊颈盲蝽; 细胞色素 P450; 基因克隆; 表达分析

Cloning and expression analysis of a cytochrome P450 *PmCYP4* gene in *Pachypeltis micranthus* (Hemiptera: Miridae)

ZHANG Chuanguang^{1,2}, ZE Sangzi³, ZHU Jiaying⁴, JI Mei², LIU Ling², ZHANG Naiming^{1*}

¹College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; ²Yunnan Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650204, China; ³Bureau of Forestry Pest Control and Quarantine of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650051, China; ⁴Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China

Abstract: 【Aim】*Pachypeltis micranthus* is a specialist herbivore feeding on the invasive plant *Mikania micrantha*. CYP4 family genes play a very important role in the interaction between insects and host plants. 【Method】A cDNA encoding *CYP* was cloned using rapid amplification of cDNA ends (RACE) strategy. Fluorescence quantitative real time PCR (qPCR) was used to detect the expression of *CYP* gene in different body parts. 【Result】*PmCYP4* gene was 1713 bp in full length, and 1500 bp in ORF, which encoded 500 amino acids with a predicted molecular weight of 57.44 ku. There was no signal peptide in this deduced amino acid sequence. The homology of *PmCYP4* of *P. micranthus* with CYP4 family of other insects was more than 40%, with the closest relationship with *CYP* of *Cimex lectularius*. *PmCYP4* gene was expressed in different body parts with the highest expression in leg. The expression in wings of males was significantly higher than in antennae and residue and 2.37 times higher than females, but there were no significant differences in these body parts for females. 【Conclusion】In addition to metabolic toxins, the main function of *PmCYP4* gene may be to encode for enzymes related to the movement of *P. micranthus*.

Key words: *Pachypeltis micranthus*; cytochrome P450; cloning; expression analysis

薇甘菊 *Mikania micrantha* H. B. K. 是世界上最具侵略性的杂草之一(范志伟等, 2016; Ming *et al.*, 2017), 也是唯一一种全国林业检疫有害植物(徐小伟等, 2014)。物种在入侵过程中与入侵生境中其他物种相互竞争、协同适应, 如入侵我国云南的薇甘菊挥发油内普遍存在 β -cadinene、allo-aromadendrene、

收稿日期(Received): 2018-07-18 接受日期(Accepted): 2018-09-26

基金项目: 云南省重点研发项目(2018BB009); 中央财政林业科技推广项目(云[2017]TG 07 号)

作者简介: 张传光, 男, 博士研究生。研究方向: 植物保护。E-mail: 261632992@qq.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: zhangnaiming@sina.com

β -caryophyllene 及 5-(1,1-dimethylethyl)-2,3-1H-Inden-1-one 等多碳化合物(季梅等,2012;孙盟等,2013),而生长在原产地秘鲁的薇甘菊检测不到这些物质,说明入侵地薇甘菊的次生代谢物种类发生了改变,且含量也明显增加(Ni *et al.*,2007)。此外,薇甘菊在入侵的过程中其体内的化学防御素——缩合单宁也显著高于本地物种(倪广艳等,2014)。

Yiran & Liu (2017)首次报道了一个专食薇甘菊的新种——薇甘菊颈盲蝽 *Pachypeltis micranthus* Mu et Liu,是控制云南省瑞丽市薇甘菊的一种本土天敌昆虫。研究发现,被薇甘菊颈盲蝽取食后,薇甘菊叶片中的防御性酶 POD 和 PAL 的活性下降,PPO 活性提高(季梅等,2014;李胜等,2018),说明在被颈盲蝽取食后薇甘菊很快做出了防御反应。植物次生物质能对昆虫产生不利影响,甚至产生毒杀作用,而昆虫则通过对植物次生物质忌避取食、解毒代谢等多种机制,对寄主植物产生适应性(陈澄宇等,2015)。其中,细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP)作为最古老和最庞大的超基因家族,其介导的多功能氧化酶(microsomal mixed function oxidases, MFO)是昆虫中涉及抗性的 3 大主要代谢解毒酶类之一,对多样的外源化合物和内源化合物的氧化代谢起作用(Hryciak & Bandiera,2009; Omura,1999),特别是 CYP4 家族基因在昆虫对植物次生物质的解毒代谢及与寄主植物相互作用中发挥了重要作用(吴益东等,1997; Ding *et al.*,2013; Edi *et al.*,2014; Feyereisen,1999)。

Feyereisen *et al.* (1989)克隆了第一个昆虫 CYP 基因,此后,昆虫 CYPs 逐渐成为研究热点(艾均文等,2015)。对于薇甘菊颈盲蝽而言,如何应对宿主植物的化学防御,其体内存在何种代谢解毒酶,相关基因在不同部位的表达量如何,都未有相关的报道。本文旨在克隆薇甘菊颈盲蝽 CYP4 基因,研究其在不同部位的表达情况,为深入研究其在薇甘菊颈盲蝽与薇甘菊互作中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 薇甘菊颈盲蝽采自云南省瑞丽市。

1.1.2 实验试剂及主要仪器 Trizol,SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech)、DNA Marker DL2000 均购自宝生物工程(大连)有限公司,PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 Takara 公司。

高速冷冻离心机(5804R 型,德国 Eppendorf 公司),PCR 仪(Veriti96 型,美国 Applied Biosystems 公司),荧光定量 PCR 仪(Rotor Gene-Q 型,德国 QIAGEN 公司),凝胶成像仪(GBOX iChemi 型,英国 Syngene 公司),超微量紫外分光光度计(Nano-Drop 2000,美国 Thermo 公司)。

1.1.3 培养基 LB 培养基:酵母提取物、胰蛋白胨、NaCl 分别为 5、10、10 g · L⁻¹,用 NaOH 调节 pH 为 7;加入 15 g · L⁻¹琼脂为 LB 固体培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集方法 将捕捉到的雌、雄活体切分为触角、残体、翅膀、足 4 个部分,迅速保存至液氮中带回实验室,每部分 3 个重复,每个重复 100 头。

1.2.2 总 RNA 的提取及 CYP 基因的克隆 参照 Trizol 试剂说明书,以样品研磨提取总 RNA,提取到的总 RNA,采用紫外分光光度计检测其质量,储存在-80 °C 冰箱备用。

以提取的总 RNA 为模板,用 SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech)反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。根据实验室前期对薇甘菊颈盲蝽 cDNA 文库测序获得的 CYP 片段序列,设计 5' RACE 和 3' RACE 特异性引物(5'-GGCAAAGGTCT-GCTGACAAGTA-3'和 5'-TGAATGGTACGTAGGCAA-ACGG-3'),以反转录合成的 cDNA 为模板,参照 RACE 试剂盒说明书,PCR 扩增该基因的 3'端和 5'端序列。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。用 1%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。利用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化,TA 克隆接入 pGEM®-T-easy 载体(Promega),蓝白斑筛选,挑取阳性克隆送至昆明硕擎生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 序列分析 用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)将 CYP 的核苷酸序列翻译成氨基酸序列;用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白进行基本进化性质分析;用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)对信号肽进行预测;用 ClustalX 1.83 进行多序列比对分析进化树(Thompson *et al.*,1997),MEGA 7.0 软件构建 NJ (neighbor-joining)分子系统进化树(Kumar *et al.*,2016)。

1.2.4 荧光定量 PCR 用 Trizol 试剂提取各样品

总 RNA,将各样品总 RNA 定量至 1 μg,用 Prime-ScripttmRT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒对提取的各样品总 RNA 先进行基因组 DNA 的去除,定量后再反转录成 cDNA 模板。根据实验前期克隆获得的 CYP cDNA 序列,设计特异性引物(5'-CGTTTTTCTCCGAGCGTTC-3'和 5'-TTGAAC TTCGACGGTTGG-3'),对该基因在薇甘菊颈盲蝽不同性别、不同部位中的表达量进行荧光定量 PCR 分析。以 18S RNA 为内参基因(5'-TTTCAAATGTCTGCCT-TATC-3'和 5'-TGTGTTAGCCGTTTCTCA-3'),每个样品重复 3 次。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 20 s,39 个循环。荧

光定量 PCR 结果采用 $E^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算,根据该方法把表达量最低的样品表达量值定义为 1 (Livak & Schmittgen,2001)。最后,用 Excel 对数据进行整理、IBM SPSS Statistics 进行方差分析和 S-N-K 多重比较、Origin Pro 2016 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 *PmCYP4* 生物信息学分析

2.1.1 *PmCYP4* 编码氨基酸理化性质 *PmCYP4* cDNA 全长 1713 bp,ORF 为 1500 bp,编码 500 个氨基酸,5'端非编码区 27 bp,3'端非编码区 183 bp,无信号肽(图 1)。编码氨基酸的基本理化性质见表 1。

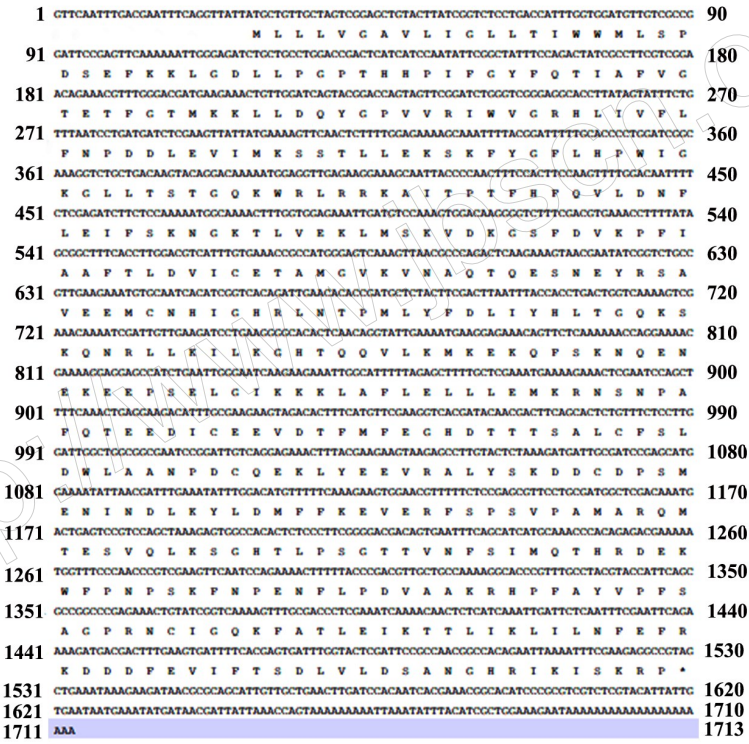


图 1 *PmCYP4* 基因的开放阅读框和推测的氨基酸序列
Fig.1 ORF and the deduced amino acid sequences of *PmCYP4*

表 1 <i>PmCYP4</i> 编码氨基酸的理化性质	
Table 1 Physical and chemical properties of amino acids encoded by <i>PmCYP4</i>	
指标 Index	预测结果 Predicted outcome
分子式 Molecular formula	C ₂₆₁₁ H ₄₀₆₁ N ₆₇₃ O ₇₃₉ S ₂₃
分子质量 Molecular weight/(ku)	57.44
氨基酸数 Number of amino acids	500
等电点 Isoelectric point	6.93
负电荷残基 Asp+Glu	63
正电荷残基 Arg+Lys	62
平均亲水系数 Average hydrophilicity	-0.279
不稳定系数 Instability index	28.84
脂肪系数 Aliphatic index	84.02

2.1.2 *PmCYP4* 基因序列分析 *PmCYP4* 编码的氨基酸序列中的 2 个保守区域见图 1 和图 2(下划线部分):(1) CYP4 家族成员保守区 EVDTFM-FEGHDTT(周夏,2015);(2) FXXGXXXXCXG/A 区域,为红素结合环,C 是保守的半胱氨酸,X 代表任意密码子,其为血红素铁第 5 个配体,也是在 450 nm 处与 CO 结合产生吸收峰特征性光谱的原因(邱星辉和冷欣夫,1998;郑明奇等,2001)。

不同物种、不同来源的 *CYP* 基因均有高度的序列同源性,序列比对发现,*PmCYP4* 与地中海实蝇

Ceratitis capitata、家蝇 *Musca domestica*、辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons*、铜绿蝇 *Lucilia cuprina* CYP4 的氨基酸同源性分别为 41%、42%、43%、45% (图 2)。

系统进化树显示, *PmCYP4* 与温带臭虫 *Cimex lectularius* *CPY4* 基因编码的蛋白同源性处于同一分支上, 进化关系最近 (图 3)。

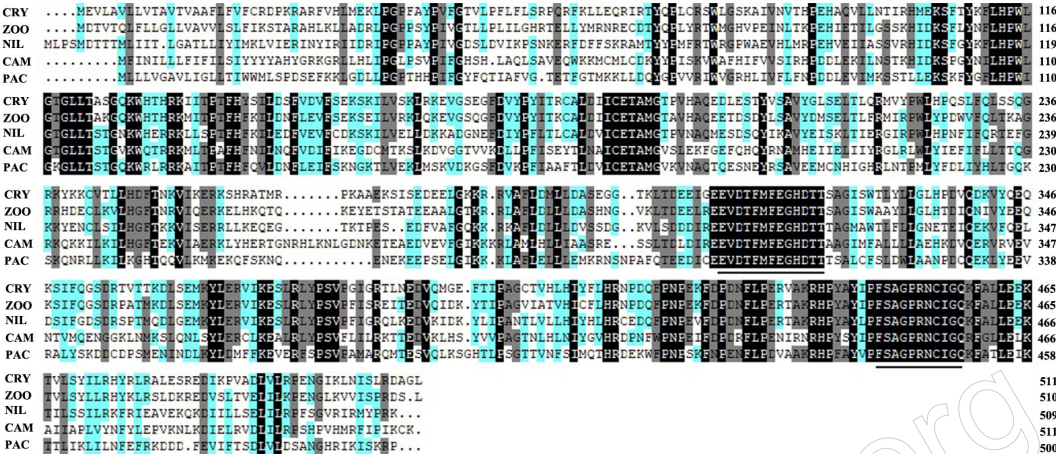


图 2 *PmCYP4* 与其他昆虫 CYP 多序列比对
Fig.2 Multiple alignment of *PmCYP4* and other insects

CRY: 砂白蚁, PNF27066.1; ZOO: 内华达古白蚁, KDR12230.1; NIL: 褐飞虱, AIW79997.1; CAM: 佛罗里达弓背蚁, XP_025266601.1; PAC: 薇甘菊颈盲蝽。下划线部分为 *PmCYP4* 编码的氨基酸序列中的 2 个保守区域。黑色和灰色阴影分别表示保守性极高和较高的残基位点。
CRY: *Cryptotermes secundus*, PNF27066.1; ZOO: *Zootermopsis nevadensis*, KDR12230.1; NIL: *Nilaparvata lugens*, AIW79997.1; CAM: *Camponotus floridanus*, XP_025266601.1; PAC: *Pachypeltis micranthus*. The underlined parts were two conserved domains of the amino acid sequences of *PmCYP4*. Residues identical or similar are highlighted in black and grey respectively.

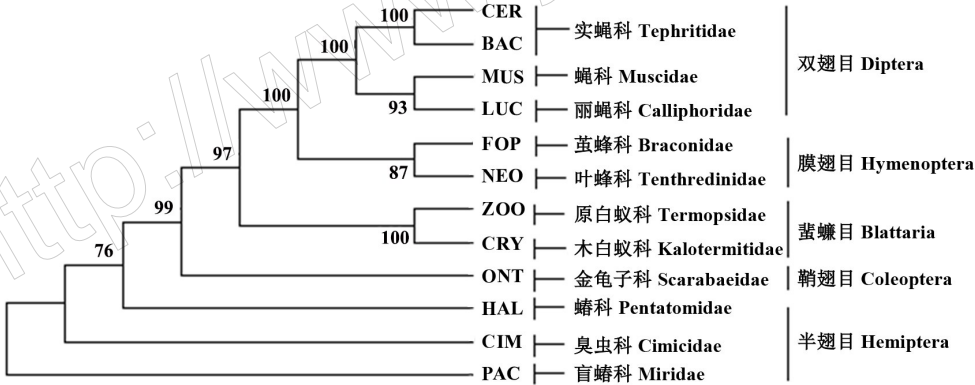


图 3 *PmCYP4* 基因系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of *PmCYP4*

CER: 地中海实蝇, XP_004521346.1; BAC: 辣椒实蝇, XP_018799661.1; MUS: 家蝇, XP_005186030.1; LUC: 铜绿蝇, XP_023297259.1; FOP: 阿里山潜蝇茧蜂, XP_011300548.1; NEO: 红头松叶蜂, XP_015512314.1; ZOO: 内华达古白蚁, XP_021934792.1; CRY: 砂白蚁, XP_023705844.1; ONT: 喙蝇, XP_022906724.1; HAL: 茶翅蝽, XP_014284338.1; CIM: 温带臭虫, XP_014249034.1.
CER: *Ceratitis capitata*, XP_004521346.1; BAC: *Bactrocera latifrons*, XP_018799661.1; MUS: *Musca domestica*, XP_005186030.1; LUC: *Lucilia cuprina*, XP_023297259.1; FOP: *Fopius arisanus*, XP_011300548.1; NEO: *Neodiprion lecontei*, XP_015512314.1; ZOO: *Zootermopsis nevadensis*, XP_021934792.1; CRY: *Cryptotermes secundus*, XP_023705844.1; ONT: *Onthophagus taurus*, XP_022906724.1; HAL: *Halyomorpha halys*, XP_014284338.1; CIM: *Cimex lectularius*, XP_014249034.1.

2.2 *mCYP4* 基因荧光定量 PCR 分析

PmCYP4 在薇甘菊颈盲蝽雌、雄虫中的表达量都是足中最高, 显著高于翅膀、触角、残体。雌虫残体中表达量最低, 触角、翅膀、足中的表达量分别是其 1.15、1.88 和 11.90 倍, 残体、触角和翅膀中的表达量无显著差异; 雄虫触角表达量最低, 残体、翅膀、足中

的表达分别是其 1.02、6.07 和 16.32 倍, 且翅膀中的表达量显著高于残体和触角, 而残体和触角中的表达量无显著差异; 雌虫翅膀、残体及触角与雄虫相应组织中的表达量无显著差异, 但雄虫翅膀中的表达量显著高于雌虫翅膀, 是其 2.37 倍 (图 4)。

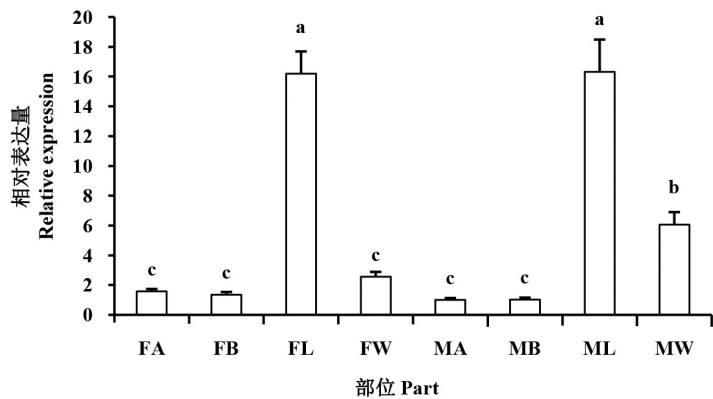


图 4 *PmCYP4* 基因在薇甘菊颈盲蝽不同部位中的表达量

Fig.4 Relative expression levels of *PmCYP4* gene in different parts of *P. micranthus*

FA:雌虫触角;FB:雌虫残体;FL:雌虫足;FW:雌虫翅膀;MA:雄虫触角;MB:雄虫残体;ML:雄虫足;MW:雄虫翅膀。
不同字母表示在 5% 水平上差异显著。

FA: Antenna of female; FB: Residual body of female; FL: Leg of female; FW: Wing of female; MA: Antenna of male; MB: Residual body of male; ML: Leg of male; MW: Wing of male. Different letters mean significant differences at 5% level.

3 讨论

CYP 基因家族包括 36 个基因族(李显春等, 1999; 张宇宏等,2015),昆虫中已鉴定的 *CYP* 分属于 *CYP4*、*CYP6*、*CYP9*、*CYP12*、*CYP18*、*CYP28* 等 27 个家族,除 *CYP4* 家族外全是昆虫特异的家族(Feyereisen,1999)。通过序列比对,此次克隆到的薇甘菊颈盲蝽 *PmCYP4* 基因与 *CYP4* 家族基因编码的蛋白同源性最高,且存在 2 个保守区域。Blast 结果表明,薇甘菊颈盲蝽 *CYP* 基因与其他昆虫的 *CYP4* 家族的同源性都大于 40%,所以 *PmCYP4* 应属于 *CYP4* 家族。

CYP4 基因起源于 1000 多万年前,早于脊椎动物和无脊椎动物分化(Bradfield *et al.*, 1991),其功能包括促进多种激素及甾醇的生物合成和降解,调节昆虫发育和形态改变(杨帆和王进军,2008),代谢植物有毒物质、多种杀虫剂,诱导诱变剂等(Gu & Knipple,2013)。薇甘菊颈盲蝽的 *CYP4* 家族基因的主要作用可能是调节内源性物质和代谢食物中的有毒物质,*PmCYP4* 应主要分布于中肠、脂肪体和马氏管中,表达部位及量应无性别差别,在残体中有几乎同水平的表达量,但表达量很低。因此,*PmCYP4* 基因可能参与了食物源有毒化合物的代谢,但不是其主要功能。*CYP4* 基因也参与了信息素的失活(Lazard *et al.*,1990; Maibèchechoisne *et al.*,2005)。在繁殖期,薇甘菊颈盲蝽雌虫通过气味分子来引诱雄虫交尾(王大伟等,2014; 泽桑梓等,2017),而 *PmCYP4* 基因在雌、雄虫触角中的表达量很低且无差异,所以 *PmCYP4* 基因没有参与性信息

素的失活,但可能参与了环境信息素的失活。

本研究发现,*PmCYP4* 在雌、雄虫的足中表达量显著大于其他部位,雄虫翅膀中的表达量显著大于雌虫,GO 数据库对此基因的功能注释之一是作为配对供体,结合或减少氧分子来增加氧化还原酶活性(GO:0016705)。前期对薇甘菊颈盲蝽的生物特性研究中发现,该虫的爬行能力较强,飞翔能力较弱,且雄虫飞翔能力远强于雌虫,据此推测,*PmCYP4* 的主要功能可能是编码与运动相关的酶。

参考文献

艾均文, 龚昕, 薛宏, 何行健, 刘昌文, 肖建中, 刘勇, 郑颖, 2015. 不同鳞翅目昆虫细胞色素 P450 基因(*CYPs*)的比较基因组学分析. 农业生物技术学报, 23(2): 244-252.

陈澄宇, 康志娇, 史雪岩, 高希武, 2015. 昆虫对植物次生物质的代谢适应机制及其对昆虫抗药性的意义. 昆虫学报, 58(10): 1126-1139.

范志伟, 沈奕德, 李晓霞, 黄乔乔, 2016. 入侵植物薇甘菊新枝在海南的月生长动态. 生物安全学报, 25(1): 18-22.

季梅, 泽桑梓, 孙盟, 杨斌, 赵宁, 2012. 3 种菊科入侵植物叶片精油成分的 GC-MS 分析. 西部林业科学, 41(6): 84-87.

季梅, 泽桑梓, 赵宁, 杨斌, 2014. 颈盲蝽取食对薇甘菊叶片防御性酶活性的影响. 浙江农业学报, 26(3): 748-751.

李胜, 郑端靖, 王尹, 林莹, 刘梦然, 桂富荣, 万方浩, 喜超, 2018. 颈盲蝽取食对薇甘菊叶片营养物质和防御酶的影响. 生物安全学报, 27(1): 45-49.

李显春, 王荫长, 韩召军, 1999. 昆虫细胞色素 P450 基因的克隆及其策略. 华东昆虫学报, 8(2): 103-111.

倪广艳, 朱丽薇, 牛俊峰, 赵秀华, 张振振, 赵培强, 2014.

- 三种菊科入侵植物的生长与化学防御的关系研究. 生态环境学报, 23(1): 1-6.
- 邱星辉, 冷欣夫, 1998. 昆虫细胞色素 P450 研究: P450 基因. 应用昆虫学报, 35(1): 48-51.
- 孙盟, 泽桑梓, 吴艳蕊, 季梅, 马惠芬, 杨斌, 苏尔广, 2013. GC-MS 测定薇甘菊不同器官精油成分. 广东农业科学, 40(19): 111-115.
- 王大伟, 泽桑梓, 季梅, 杨斌, 朱家颖, 赵宁, 2014. 薇甘菊颈盲蝽化学成分分析及其引诱化化合物的研究. 江苏农业科学, 42(12): 148-152.
- 吴益东, 沈晋良, 陈进, 周威君, 李爱玫, 沈文飏, 1997. 棉铃虫六龄幼虫微粒体细胞色素 P450 和细胞色素 b₅ 的测定及组织分布. 农业生物技术学报, 5(3): 297-301.
- 徐小伟, 泽桑梓, 杨斌, 季梅, 2014. 薇甘菊的分布危害、生物防治及资源化利用研究现状与展望. 热带农业科学, 34(12): 75-84.
- 杨帆, 王进军, 2008. 昆虫细胞色素 P450 与抗药性关系研究进展. 四川动物, 27(3): 460-463.
- 泽桑梓, 王海帆, 季梅, 谢世聪, 2017. 薇甘菊颈盲蝽基础生物学特性. 江苏农业科学, 45(12): 64-69.
- 张宇宏, 郑基焕, 毛润乾, 庞虹, 2015. 孟氏隐唇瓢虫细胞色素 P450 基因的克隆与序列分析. 环境昆虫学报, 37(4): 759-766.
- 郑明奇, 邱星辉, 张文吉, 2001. 棉铃虫细胞色素 P450 的分子生物学. 生命的化学, 21(3): 229-230.
- 周夏, 2015. 甘蓝夜蛾细胞色素 P450 基因的克隆及功能分析. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学.
- BRADFIELD J Y, LEE Y H, KEELEY L L, 1991. Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(10): 4558-4562.
- DING Z, WEN Y, YANG B, ZHANG Y, LIU S, LIU Z, HAN Z, 2013. Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression of cytochrome P450 CYP6AY1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(11): 1021-1027.
- EDI C V, DJOGBENOU L, JENKINS A M, REGNA K, MUSKAVITCH M A, POUPARDIN R, JONES C M, ESSANDOH J, KETO H G K, PAINE M J, KOUDOU B G, DONNELLY M J, RANSON H, WEETMAN D, 2014. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*, 10(3): 1-12.
- FEYEREISEN R, 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44(1): 507-533.
- FEYEREISEN R, KOENER J F, FARNSWORTH D E, NEBERT D W, 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P450 from an insecticide-resistant strain of the housefly, *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5): 1465-1469.
- GU L, KNIPPLE D C, 2013. Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection*, 45(3): 36-40.
- HRYCAY E G, BANDIERA S M, 2009. Expression, function and regulation of mouse cytochrome P450 enzymes: comparison with human P450 enzymes. *Current Drug Metabolism*, 10: 1151-1183.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 33(7): 1870.
- LAZARD D, TAL N, RUBINSTEIN M, KHEN M, LANCET D, ZUPKO K, 1990. Identification and biochemical analysis of novel olfactory-specific cytochrome P450IIA and UDP-glucuronosyl transferase. *Biochemistry*, 29(32): 7433-7440.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- MAÏBÈCHECOISNE M, MERLIN C, FRANÇOIS M C, PORCHERON P, JACQUINJOLY E, 2005. P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae. *Gene*, 346: 195-203.
- MING Y, HE Z, HUANG Y, LU L, YAN Y, LAN H, HAO S, YING L, QIANG G, LU J, 2017. The emergence of the hyperinvasive vine, *Mikania micrantha* (Asteraceae), via admixture and founder events inferred from population transcriptomics. *Molecular Ecology*, 26(13): 3405-3423.
- NI G Y, LI F L, CHEN B M, SONG Y L, PENG S L, 2007. Allelopathic plants. 21. *Mikania micrantha* H.B.K. *Allelopathy Journal*, 19(2): 287-296.
- OMURA T, 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 266(3): 690.
- THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS D G, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- YIRAN M U, LIU G, 2017. A new species in the genus *Pachypeltis* (Hemiptera: Miridae) from China. *Entomotaxonomia*, 39(3): 181-187.