



番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的克隆、 时空表达及对乙基多杀菌素的表达响应*

王圣宇^{1**} 解津刚^{1**} 颜国荣² 林明灏¹ 王鑫海¹
王圣斐¹ 王建民¹ 李玉珊² 刘小宁^{1***}

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830017;

2. 新疆维吾尔自治区农业科学院作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要 【目的】世界性入侵害虫番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* 对生物杀虫剂乙基多杀菌素表现出逐渐增强的抗药性, 本研究旨在探究 CYP9 亚家族基因 *CYP9A304v2* 在番茄潜叶蛾生长发育及代谢乙基多杀菌素过程中的潜在功能。【方法】本研究通过基因克隆、生物信息学分析、时空表达谱检测、胁迫诱导实验及分子对接等技术, 对 *CYP9A304v2* 基因的序列特征、系统发育关系、在不同发育阶段以及乙基多杀菌素胁迫条件下的表达模式、以及其蛋白与药剂的结合能力进行分析。【结果】*CYP9A304v2* 基因开放阅读框长度为 1 596 bp, 编码了 531 个氨基酸, 系统发育分析揭示番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 属于 CYP6 家族。时空表达谱显示该基因在番茄潜叶蛾幼虫 4 龄和蛹期特异性高表达, 且在乙基多杀菌素胁迫下显著上调表达 ($P < 0.05$)。分子对接结果显示, *CYP9A304v2* 蛋白与乙基多杀菌素具有较强的结合亲和力, 结合自由能均低于 -37.7 kJ/mol。【结论】时空表达谱显示 *CYP9A304v2* 在番茄潜叶蛾幼虫 4 龄及蛹期特异性高表达, 且其蛋白与乙基多杀菌素具有强结合亲和力, 暗示该基因可能在幼虫-蛹转变期间及对乙基多杀菌素的解毒代谢起关键作用。本研究为番茄潜叶蛾抗药性机制研究提供了候选基因及理论依据。

关键词 番茄潜叶蛾; *CYP9A304v2*; 乙基多杀菌素; 时空表达; 生物信息学; 分子对接

Cloning, spatiotemporal expression and response to spinetoram, of the *Tuta absoluta* *CYP9A304v2* gene

WANG Sheng-Yu^{1**} XIE Jin-Gang^{1**} YAN Guo-Rong² LIN Ming-Hao¹ WANG Xin-Hai¹
WANG Sheng-Fei¹ WANG Jian-Min¹ LI Yu-Shan² LIU Xiao-Ning^{1***}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and
Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, China;

2. Institute of Crop, Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract [Aim] To investigate the potential role of the CYP9 subfamily gene *CYP9A304v2* in the development of *Tuta absoluta* and the response of this gene to spinetoram, a biopesticide to which *T. absoluta* is becoming increasingly resistant. [Methods] Gene cloning, bioinformatics analysis, spatiotemporal expression profiling, stress induction experiments, and molecular docking were employed to characterize the sequence features and phylogenetic relationships of *CYP9A304v2*. In addition, expression patterns in different developmental stages and in response to spinetoram were measured, together with an evaluation of the binding affinity between the *CYP9A304v2* protein and spinetoram. [Results] The open reading frame (ORF) of *CYP9A304v2* was 1 596 bp in length, and encoded 531 amino acids. Phylogenetic analysis revealed that *T. absoluta*

*资助项目 Supported projects: 大学生创新训练计划项目 (202410755100); “天山人才” 培养计划; “三农” 骨干人才工程 (2024SNGGGGCC011)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: w2155208948@outlook.com; 838245737@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuxn0103@xju.edu.cn

收稿日期 Received: 2025-09-04; 接受日期 Accepted: 2026-05-08

CYP9A304v2 belongs to the CYP6 family. Spatiotemporal expression profiling demonstrated specific high expression of *CYP9A304v2* in the 4th instar larval and pupal stages, and that its expression was significantly upregulated under spinetoram stress ($P < 0.05$). Molecular docking analyses indicates strong binding affinity between the *CYP9A304v2* protein and spinetoram, with binding free energies consistently below -9 kcal/mol. **[Conclusion]** The high expression of *CYP9A304v2* during the 4th instar larval and pupal stages, combined with its strong binding affinity for spinetoram, suggests that this gene may play a critical role in both the larval-pupal transition and the detoxification of spinetoram. These results identify a candidate gene that could be targeted to control *T. absoluta*, and provide new information on insecticide resistance mechanisms in this species.

Key words *Tuta absoluta*; *CYP9A304v2*; spinetoram; spatiotemporal expression; bioinformatics; molecular docking

番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta*, 又名番茄麦蛾、番茄潜麦蛾、南美番茄潜叶蛾等, 属鳞翅目麦蛾科, 是一种起源于南美洲的世界性入侵害虫, 后迅速传播到非洲和欧亚大陆 (Desneux *et al.*, 2010; Biondi *et al.*, 2018), 虫害发生严重时, 可导致番茄田减产 80%-100%, 严重威胁全球番茄产业 (渠成等, 2023)。2017 年, 该虫首次出现在我国新疆伊犁地区, 主要危害茄科作物, 尤以番茄受害最为显著 (Zhang *et al.*, 2020)。番茄潜叶蛾幼虫期通过潜食叶片及果实形成蛀道, 破坏植物组织并诱发次生病害, 对新疆番茄主产区的生产安全构成持续性威胁 (马丽娟等, 2025)。番茄潜叶蛾幼虫发育历经 4 个龄期, 4 龄末期停止取食并进入蛹期。目前对番茄潜叶蛾的防治以杀虫剂为主, 常用的杀虫剂有双酰胺类、拟除虫菊酯类、有机磷类等 (冯科力等, 2025), 但杀虫剂的过度使用不但会使环境不断恶化, 对人畜健康构成威胁, 同时也会使昆虫的抗药性不断提高, 因此, 探究番茄潜叶蛾的新型绿色防治策略刻不容缓。

乙基多杀菌素 (Spinetoram) 是一种新型的多杀菌素类杀虫剂, 具有杀虫谱广、活性高、易降解、对非靶标生物毒性低、抗性风险低等优点, 在具备生物农药的安全性的同时又兼具化学农药的快速杀虫效果 (Zhang *et al.*, 2018), 目前已被广泛用于控制番茄潜叶蛾 (Xie *et al.*, 2025b)。然而随着乙基多杀菌素使用频次的增加势必会造成害虫的耐药性, 目前有研究报道称, 中国境内已有数个番茄潜叶蛾种群对乙基多杀菌素产生低水平抗性 (渠成等, 2024), 且抗性品系中 P450 酶活性显著高于敏感品系 (Xie *et al.*, 2025b), 提示代谢抗

性可能正在形成。然而, 具体介导该抗性的 P450 基因及其分子机制尚不明确。因此, 亟需从分子水平探究番茄潜叶蛾对乙基多杀菌素抗性形成的关键基因与调控机制, 为延缓田间抗性发展, 制定科学轮换用药策略提供理论依据。

昆虫细胞色素 P450 单加氧酶作为 I 相解毒代谢的关键酶系, 通过介导昆虫对杀虫剂的氧化代谢, 在昆虫抗药性进化中发挥关键调控作用 (Chen *et al.*, 2025)。该酶系通过催化对农药和植物化感物质的解毒, 增强昆虫的适应性和生存能力 (Li *et al.*, 2004)。昆虫细胞色素 P450 基因家族中的 CYP3 和 CYP4 进化枝在基因多样性和环境适应性中占据主导地位 (Feyereisen, 2011; Liang *et al.*, 2024)。其中, CYP3 进化枝下的 CYP9 亚家族因功能可塑性和底物广谱性, 成为昆虫应对化学胁迫的重要分子解毒酶 (Shi *et al.*, 2023)。研究表明, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* CYP9A 亚家族通过协同代谢植物棉酚与拟除虫菊酯类农药, 实现寄主适应与抗药性的双重进化突破 (Chen *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2021); 马来西亚登革热埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的拟除虫菊酯抗药性由 CYP9 家族的基因介导 (Ishak *et al.*, 2017); 烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫中肠中的 CYP9 家族成员对外源化合物具有潜在代谢作用 (Stevens *et al.*, 2000); 淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* CYP9J40 则能直接参与降解溴氰菊酯 (Du *et al.*, 2024)。上述这些研究表明 CYP9 亚家族在昆虫解毒代谢中发挥重要作用。然而, 关于番茄潜叶蛾 CYP9 亚家族还少有研究。课题组前期对番茄潜叶蛾乙基多杀菌素抗敏品系进行比较转录组分析, 以 $|\log_2(\text{fold change})| > 1.5$ 且

$P < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因, 显示 *CYP9A304v2* 在抗性种群中的表达量较敏感种群上调 1.81 倍, 该结果与 Campos 等 (2015) 在乙基多杀菌素抗性品系中检测到的 P450 酶活性显著升高相印证。然而, 关于番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因对乙基多杀菌素的响应特征及时空表达规律仍缺乏系统解析。

本研究对番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因进行克隆和生物信息学分析, 并利用 RT-qPCR 技术分析 *CYP9A304v2* 基因在番茄潜叶蛾幼虫不同发育阶段和不同组织内的表达水平, 使用 LC_{50} 浓度的乙基多杀菌素对番茄潜叶蛾进行胁迫, 来探究 *CYP9A304v2* 基因对乙基多杀菌素的表达响应, 最后通过建模及分子对接研究该基因与乙基多杀菌素的结合能力和结合模式, 以期为后续解析番茄潜叶蛾对多杀菌素类杀虫剂的代谢调控提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄潜叶蛾于 2021 年采自新疆伊犁鲜食番茄大田。所有试虫均用 $45\text{ cm} \times 45\text{ cm} \times 45\text{ cm}$ 的养虫笼于室内饲养, 日间温度 (27 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 夜间温度 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光周期 14 L : 10 D, 湿度 $60\% \pm 5\%$, 笼内放入土培 5 周龄 (从长出真叶算起) 的粉红 908 番茄植株, 并以浸润 10% 蜂蜜水的脱脂棉球饲喂成虫。

1.2 主要试剂

乙基多杀菌素原药 (Spinetoram, 纯度 98%, 购自科迪华农业科技中国有限公司) 用丙酮溶解配制母液备用。TransZol Up Plus RNA 试剂盒、PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒、pEASY-T1 Simple Vector 试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans1-T1 感受态细胞, 均购自北京全式金生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 克隆 采用液氮研磨结合试剂法, 收集 5 头番茄潜叶蛾 4 龄幼

虫, 冷冻研磨后提取总 RNA。加试剂震荡、离心, 取上层水相, 加乙醇后转入离心柱, 经 CB9、WB9 洗涤, 离心除乙醇后洗脱 RNA。用 TransScript 试剂盒合成第一链 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, 采用 20 μL PCR 反应体系, 含 2 $\times$ TransDirect[®] PCR SuperMix (+Dye) 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 *CYP9A304v2_F* 和 *CYP9A304v2_R* 各 0.5 μL 、cDNA 模板 1 μL 、ddH₂O 8 μL , 按 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、46 $^{\circ}\text{C}$ 温度退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s 循环 35 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min 的程序进行扩增, 以 ddH₂O 作阴性对照 (表 1)。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶并利用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行胶回收, 将胶回收产物与克隆载体 pEASY-T1 Simple Vector 连接, 转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取 20 个单个菌落, 接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 6 h。以菌液为模板进行 PCR 扩增鉴定, 反应体系与程序同上, 以 ddH₂O 为阴性对照。选取阳性克隆菌送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序分析。

1.3.2 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的生物信息学分析 基于课题组转录组数据获得番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的开放阅读框及编码氨基酸序列。利用 BioEdit 7.2.1 软件对 *CYP9A304v2* 氨基酸序列的保守区域进行分析; 通过 NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对, 下载同源性较高的其他昆虫 CYP 氨基酸序列, 采用 MEGA 12 软件中的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 为 1 000 次。

1.3.3 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的时空表达谱 为满足 RNA 提取试剂盒对样本起始量的要求 (约 50 mg/样品), 并兼顾不同发育阶段的个体质量差异, 样本收集数量设定如下: 番茄潜叶蛾卵 100 粒, 1 龄幼虫 30 头, 2 龄幼虫 20 头, 3 龄和 4 龄幼虫及蛹各 6 头, 雌成虫 3 头, 所有样品总质量均控制在 50 mg 左右, 以确保 RNA 提取效率及后续 qPCR 分析的一致性。同时用昆

虫解剖镊取 6 头 4 龄幼虫的头部、体壁、脂肪体及中肠组织样品, 用于分析番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因在幼虫不同组织中的表达量。收集样品后将其放入 -80°C 冰箱中保存备用。提取总 RNA 进行反转录合成 cDNA, 并将其作为模板用于荧光定量 PCR 扩增。根据番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF) 序列, 利用 Primer Primer 5.0 软件设计番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的荧光定量 PCR 扩增引物 *CYP9A304v2_F* 和 *CYP9A304v2_R*, 并以 *RPL23A*、*RpL5* 和 *rRNA* 基因为内参基因进行 qPCR (表 1)。20 μL qPCR 反应体系: RNase-free ddH₂O 7.8 μL 、2 $\times$ Perfect - StartTM Green qPCR SuperMix 10 μL 、ROX 校正液 0.4 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 *CYP9A304v2_F* 和 *CYP9A304v2-R* 各 0.4 μL 、cDNA 1 μL 。qPCR 反应程序: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个生物学重复, 不同发育阶段和不同组织番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的表达量分别以卵和头部中的表达量进行归一计算。

1.3.4 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因对乙基多杀菌素的响应 作者课题组前期研究显示, 本研究所用番茄潜叶蛾敏感品系对乙基多杀菌素的 LC₅₀ 值为 0.044 mg/L (Xie *et al.*, 2025a)。毒力测定参照国际杀虫剂抗性行动委员会 (IRAC) 推荐的浸叶法 (略有修改) 进行测定: 准备装有 3% 琼脂的塑料杯, 放入圆形滤纸, 分别标记为 ddH₂O、乙基多杀菌素。选取新鲜采集的番茄叶片将其剪成 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 的大小。将其放入 LC₅₀ 浓度 (0.044 mg/L) 的乙基多杀菌素溶液中充分浸泡 15 s 后取出晾干, 之后放入 10 头 2 龄的番茄潜叶蛾幼虫饲喂 48 h, 并以等同的 ddH₂O 处理为对照。每个处理设置 3 个生物学重复。每次处理的 2 龄幼虫被收集到 2 mL 的 EP 管中, 立即储存在 -80°C 下。随后, 按照 TransZol Up Plus RNA 试剂盒说明书提取样品总 RNA 并反转录获得 cDNA 后, 乙基多杀菌素处理的表达水平以 ddH₂O 处理的表达量进行归一计算。

1.3.5 同源建模与分子对接 本研究采用

AlphaFold 3 对 *CYP9A304v2* 蛋白进行三级结构建模, 输入氨基酸序列并添加配体分子血红素 (heme, HEM)。随后, 利用 SAVES v6.1 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 中的 ERRAT、VERIFY3D 和 PROCHECK 等程序对所构建的模型进行评估, 确保其结构可靠性。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取乙基多杀菌素 (包括 Spinetoram-L 与 Spinetoram-J 两种构型) 的分子结构文件, 利用 CORINA Classic 在线服务平台 (<https://demos.mn-am.com/corina.html>) 对二维结构进行三维化转换, 借助 Open Babel 软件将生成的三维结构文件转换为 PDB 格式, 用于后续分子模拟研究。利用 AutoDockTools 1.5.7 软件对 *CYP9A304v2* 蛋白进行能量优化、去水加氢、赋予原子电荷及力场, 并为配体分子设置可旋转键, 最终将准备好的受体与配体保存为 PDBQT 格式文件。使用 AutoDock Vina 对蛋白与乙基多杀菌素进行分子对接分析, 研究其结合模式与结合能力。结合 Proteins Plus 服务器 (<https://proteins.plus/>) 的结合位点预测结果 (常延斌等, 2023), 设定了对接口袋的搜索空间 (Grid box)。具体参数为: 盒子中心位于 *CYP9A304v2* 蛋白活性位点中心 ($X=1.107$, $Y=0.476$, $Z=1.101$); 格点间距为 0.375 Å; 网格大小为 60 Å $\times$ 60 Å $\times$ 60 Å。对接结果输出多个最佳构象, 进一步根据自由结合能及复合物构象的合理性进行评估与排序, 选取结合位点合理且自由结合能最小的构象进行分析。最后, 通过 PLIP 网站 (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 分析蛋白与乙基多杀菌素之间的非共价相互作用及关键氨基酸残基, 并通过 PyMOL v3.2.0 进行可视化处理。

1.4 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算番茄潜叶蛾不同发育阶段和不同组织中 *CYP9A304v2* 基因的相对表达量, 使用 Excel (Microsoft 365 MSO 版本 2604, 64 位) 整理数据, 以及 SPSS 20.0 软件对试验数据进行单因素方差分析, 再利用 Duncan 氏多重比较 ($P <$

0.05) 进行不同组织和不同龄期番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因表达量的差异显著性分析。乙基多杀菌素胁迫处理 (LC_{50} 处理组与对照组) 的基因表达量比较采用 Student's *t* 检验进行差异显著性分析 ($P < 0.001$), 所有数据以为平均值±标准误表示。

表 1 用于 *CYP9A304v2* 基因全长测序和 qRT-PCR 分析的引物
Table 1 Primers used for full-length sequencing and qRT-PCR analysis of *CYP9A304v2* gene

基因 Gene	用途 Purpose	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5' → 3')
<i>CYP9A304v2</i>	PCR	F: ATGATGCTATGGCTGGTCTG R: TCAAGCCCTAACTTTAAATCG
	qRT-PCR	F: CTCTACATCTTTCCCTTGTTG R: AAGTTTTCTTTCTTAGCCTCC
<i>RpL23A</i>	qRT-PCR	F: TGACGCCATAACGTGGCAGT R: CGCAAACGCCTGACTGTTCA
<i>RpL5</i>	qRT-PCR	F: CAGTCGTCGAGCCAGCAACA R: TCCCGCATTGAAGGAGACCA
<i>rRNA</i>	qRT-PCR	F: TATGTTGTGAGGCGACGATG R: GATCCACCGTCCAGGGTAAT

2 结果与分析

2.1 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的克隆

以番茄潜叶蛾 4 龄幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物在 1 000-2 000 bp 之间呈现单一条带(图 1), 该长度约为 1 500 bp, 与 *CYP9A304v2* 基因的理论大小一致, 无明显非特异性扩增。将扩增产物连接至 pUC18T 载体并转化入感受态细胞后, 进行菌液 PCR 验证, 结果显示 19-21 号克隆均能扩增出目的基因大小一致的条带, 鉴定并挑选出正确的阳性单克隆进行测序。

番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的 ORF 为 1 596 bp, 编码了 531 个氨基酸, 该基因编码的蛋白质在 C 端含有一个昆虫细胞色素 P450 蛋白典型的血红素结合区域 (图 2), 说明该蛋白质属于细胞色素 P450 CYP6 亚家族。该蛋白质经过 P450 命名委员会命名为 *CYP9A304v2*。

2.2 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 蛋白质系统进化树构建

将番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 分别与草地贪

夜蛾 *Spodoptera frugiperda* CYP6B2 (XP 035444666.2)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* CYP6B2 (XP 022829978.1)、东方黏虫 *Mythimna separata* CYP6AB142 (AXJ21602.1)、棉铃虫 CYP6AB10 (AID54885.1)、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* CYP6B2 (XP 047026703.1)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* CYP6B2 (XP 026732404.1)、野桑蚕 *Bombyx mandarina* CYP6B6 (XP

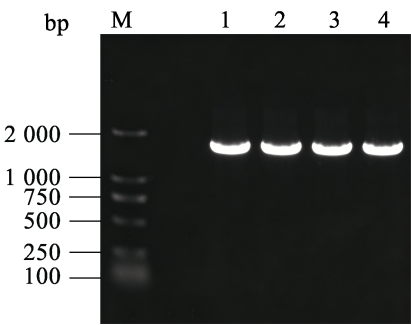


图 1 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of the *CYP9A304v2* from the *Tuta absoluta*
M: DNA 分子质量标准物; 1: 阴性对照 (ddH₂O);
1-4: 45、46、47 和 48 °C。
M: DNA marker; 1: Negative control (ddH₂O);
1-4: 45, 46, 47 and 48 °C.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	ATGATGCTATGGCTGGTCTGGACTGTAGGGCTGCTAGTAGCTCTTGTGATGACTTCCACAACGTATATTCCAAGTTCGACAGACAAGGGGTGAAGACTGAATCC									
1	M M L W L V W T V G L L V A L V M Y F H N V Y S K F D R Q G V K T E S									
	115	125	135	145	155	165	175	185	195	205
106	GTGGTCCCTTTCTCGGCTCCATGATGAGGATCGTTCTACGGTTGGACCATCTAGTTGACAGCTTGAATAGAACTTATTTCAAGTTTCTCTGAAGAAAGGTTTGTT									
36	V V P F F G S M M R I V L R L D H L V D S L N R T Y F K F P E E R F V									
	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310
211	GGAAGATTGAGTTACAAAGCCACTGCTGATAGTGAAGACTTGGAGCTGATTAAGAGGATCACCATTAAAGATTTCGAGCATTCTTGGATCATCGAGTCTTT									
71	G R F E F T K P L L I V K D L E L I K R I T I K D F E H F L D H R V F									
	325	335	345	355	365	375	385	395	405	415
316	GTCAATACGGATGCTGATCCTCTGTTTGGCAGAAACCTCTTCTCTATGAAAGGACAAGAAATGGAAGGACATGCGATCGACACTGAGCCCCGCGTTTACTAGTTCCG									
106	V N T D A D P L F G R N L F S M K G Q E W K D M R S T L S P A F T S S									
	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
421	AAGATAAGTTGATGGTCCCCTTCATGGTAAATGTTGGAGACCAGATGATACTTAACCTTAAAAAGAAATGAAAGAGAGCGGTACCTCACACCTGGATCTCGAA									
141	K I R L M V P F M V N V G D Q M I L N L K K E M K E S G T S H L D L E									
	535	545	555	565	575	585	595	605	615	625
526	ACAAAAGACTTGATGACTCGTTACGCATGTGACGTAATCGCTTCTTGGCCCTTGGTTTAAAGGTAGACTCTCACAGTAACAGGAAAAACGACTTCTACACCCAG									
176	T K D L M T R Y A C D V I A S C A F G L K V D S H S N R K N D F Y T Q									
	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730
631	GGTCTTAATGCTTCTACATTCAAGTTTAAACAACATAATGTTGTTCTTTCATCTCTACATCTTTCCTTGGTTGATGAACCTGCTCAAACCTTAAATTATTGGCGTT									
211	G L N A S T F K F K Q L M L F F I S T S F P W L M N L L K L K L F G V									
	745	755	765	775	785	795	805	815	825	835
736	GAAGCTCAACACTTCTTCAAGAACTAGTCATGTCCACAATGCAAGAGAGAGACAAATACAACATTACTCGCCCGGATATGATCCACATCTTGATGGAGGCTAAG									
246	E A Q H F F R N L V M S T M Q E R D K Y N I T R P D M I H I L M E A K									
	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940
841	AAAGAAAACTTTGTCATGACGAGAAAACTGAAGACGACAATGCAGGCTTTCGCAACAGTTGAAGAATCTGCGCTCGGCAAGAAGACAGTAACGAGAGCTTGGAGT									
281	K G K L L H D E K T E D D N A G F A T V E E S A V G K K T V T R A W S									
	955	965	975	985	995	1 005	1 015	1 025	1 035	1 045
946	GAAGATGACTTAATTGCTCAAGCCGTCCTTTTCTTTATCGCTGGCTTCGAGACCGTTGCTTCTTCAATGACGTTTCTTCTTTACGAGCTTGGCGTTAATCCCGAT									
316	E D D L I A Q A V L F F I A G F E T V A S S M T F L L Y E L A V N P D									
	1 060	1 070	1 080	1 090	1 100	1 110	1 120	1 130	1 140	1 150
1 051	GTCCAAGAAAAGCTGGTTCAAGAGATAAGAGAGACGGAAGAAAAGTATGGAGAGAAGTTTGACTTCAATGCTGTGCAGAAGATGGCCTATATGGATATGGCTGTT									
351	V Q E K L V Q E I R E T E E K Y G E K F D F N A V Q K M A Y M D M A V									
	1 165	1 175	1 185	1 195	1 205	1 215	1 225	1 235	1 245	1 255
1 156	TCTGAACCTTTGAGGAAGTATCCTCCGGCAGTCGACTAGACCGTATGTGCACCAAGGATTACAATTGGGGAAACCAACGATTACCGACGCCAAAGATTACATA									
386	S E L L R K Y P P A V G L D R M C T K D Y N L G K P N D Y A A K D Y I									
	1 270	1 280	1 290	1 300	1 310	1 320	1 330	1 340	1 350	1 360
1 261	ATTCGTAAGGGGACGGTCTTCAAATCCCAGTGTGGGCGATGCACCGAGACCGTGAAGTCTTCCCTAACCCAGACAAATTCGACCTGAAAGGTTCTCCGAGGAA									
421	I R K G D G L Q I P V W A M H R D P E F F P N P D K F D P E R F S E E									
	1 375	1 385	1 395	1 405	1 415	1 425	1 435	1 445	1 455	1 465
1 366	AATAAGCACAAATCAAGCCGTTACATATTACCGCTTTGGTTTAGGGCCAGGAAGTGCATTGGGTCCAGATTGCTCTTTGTGAGATTAAAGTATGGCATA									
456	N K H N I K P F T Y S P F G L G P R N C I G S R F A L C E I K V M A Y									
	1 480	1 490	1 500	1 510	1 520	1 530	1 540	1 550	1 560	1 570
1 471	ATGCTGCTGCGCCACATGGAAGTGTCTCCATGTCTCGCACCACAATTCCCGCTCAGCTCGCCACAGGAACCTTCAATATCTTAATGAAAGGAGGACACTGGCTT									
491	M L L R H M E V S P C P R T T I P A Q L A T G T F N I L M K G G H W L									
	1585	1595								
1 576	CGATTTAAAGTTAGGGCTTGA									
526	R F K V R A *									

图 2 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequences of *CYP9A304v2* gene in *Tuta absoluta*

黄色标注为血红素结合区域: FXXGXXXCXG-FGLGPRNCIG。

The heme-binding region is highlighted in yellow: FXXGXXXCXG-FGLGPRNCIG.

028030488.1)、烟草天蛾 *Manduca sexta* CYP6B5 (XP 030035152.2)、金凤蝶 *Papilio machaon* CYP6B2 (XP 045536235.1)、柑桔凤蝶 *Papilio xuthus* CYP6B2 (KPI91745.1)、海波斯莫科马属蛾 *Hypsmocoma kahamanoa* CYP6B2 (XP 026325017.1)、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* CYP6B2 (XP 049874738.1)、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* CYP6B2 (XP 028178012.1)、脐橙螟蛾 *Ectomyelois ceratoniae* CYP6B7 (XP 013190663.1) 和印度谷螟 *Plodia interpunctella* CYP6B2 (XP 053606273.1) 15 个鳞翅目昆虫 CYP 家族氨基酸序列构建系统进化树, 系统发育分析表明, 番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 (O0L34_g18022) 和棉红铃虫 CYP6B2 (XP 049874738.1) 的亲缘关系较近 (图 3)。

2.3 番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 基因的时空表达规律

RT-qPCR 检测结果显示, CYP9A304v2 基因在番茄潜叶蛾的整个生长发育过程中均有表达。

以卵期表达量进行归一, 在 1-3 龄幼虫期, CYP9A304v2 基因的表达水平相对稳定, 与卵期相比无明显差异 ($P > 0.05$)。随着幼虫的发育, 4 龄幼虫期、蛹期和成虫期 CYP9A304v2 基因的表达量分别上调至卵期的 4.089、4.936、3.683 倍, 均显著高于卵期和 1-3 龄幼虫期 ($P < 0.05$), 并在蛹期时表达量达到峰值 (图 4: A)。同时, 对 4 龄幼虫不同组织中 CYP9A304v2 基因的表达量进行检测, 显示其表达具有显著的组织特异性。以头部表达量进行归一, 体壁、脂肪体和中肠的相对表达量分别为头部的 3.448、2.362、2.024 倍。其中, 表达量在体壁中最高, 头部最低, 各组织间差异达显著水平 ($P < 0.05$) (图 4: B)。

2.4 乙基多杀菌素处理后的番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 基因相对表达量

经 LC_{50} 浓度乙基多杀菌素处理 2 龄幼虫 48 h 后, 番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 基因相对表达水平较 ddH₂O 处理的对照组显著上调 ($P < 0.001$) (图 5), 以丙酮溶液处理的对照组表达量

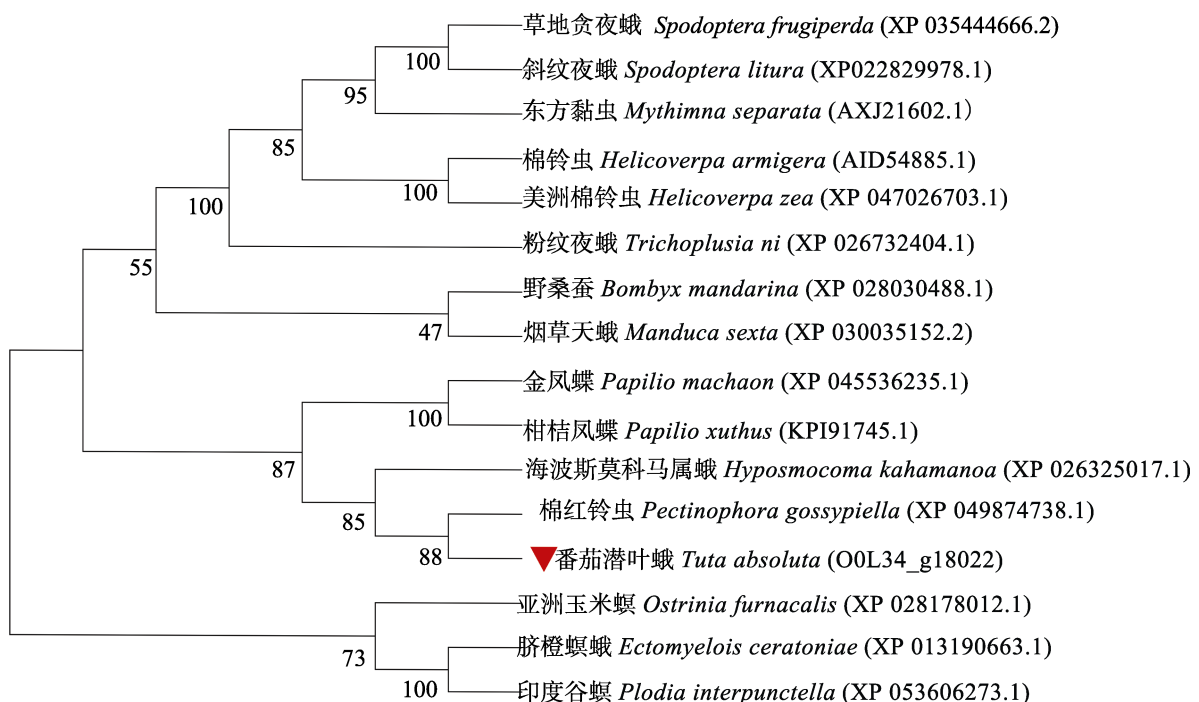


图 3 基于番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 氨基酸序列采用邻接法构建番茄潜叶蛾与其它鳞翅目昆虫系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Tuta absoluta* and other lepidopterans constructed based on the CYP9A304v2 acid sequences by using neighbor-joining method

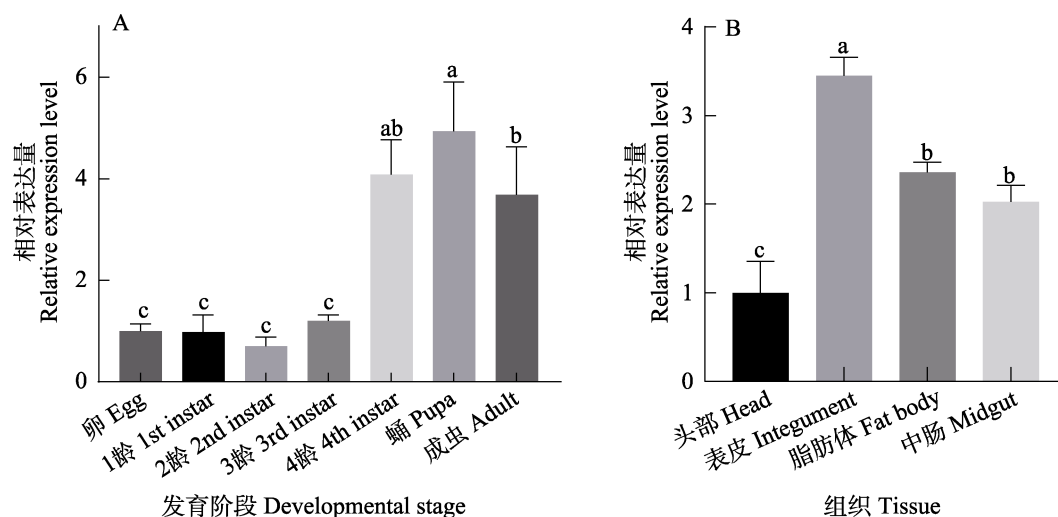


图 4 *CYP9A304v2* 基因在番茄潜叶蛾不同发育阶段 (A) 及不同组织 (B) 中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *CYP9A304v2* gene in different developmental stages (A) and different tissues (B) of *Tuta absoluta*

数据均为平均值±标准误 ($n=3$), 柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较)。

Data are mean $\pm$ SE ($n=3$), and different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's multiple range test).

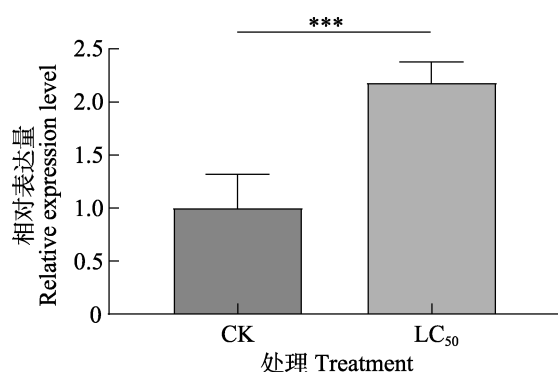


图 5 LC_{50} 浓度乙基多杀菌素处理 48 h 后番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 基因的相对表达量

Fig. 5 The relative expression level of *CYP9A304v2* gene in *Tuta absoluta* after 48 h treatment with spinetoram at LC_{50} concentration

CK: 以丙酮溶液处理的对照组; LC_{50} : 以 LC_{50} 浓度 (0.044 mg/L) 乙基多杀菌素丙酮溶液处理的处理组, 处理时间为 48 h。数据为平均值±标准误 ($n=6$), 星号表示差异极显著 (***) ($P < 0.001$, Student's t 检验)。

CK: Control group treated with acetone solution; LC_{50} : Treatment group treated with spinetoram acetone solution at the LC_{50} concentration (0.044 mg/L) for 48 h. Data are mean $\pm$ SE ($n=6$), asterisks above bars indicate extremely significant difference (***) ($P < 0.001$, Student's t -test).

进行归一, LC_{50} 处理后该基因的表达量上调至 CK 的 2.179 倍。显示 *CYP9A304v2* 可能参与番

茄潜叶蛾对乙基多杀菌素的解毒代谢过程。

2.5 *CYP9A304v2* 同源建模及与乙基多杀菌素分子对接分析

采用 AlphaFold 3 预测 *CYP9A304v2* 蛋白三级结构。该模型整体评分较高 (pTM 值=0.93, ipTM=0.95), 平均 pLDDT 为 89.62, 其中 96.23% 的残基 pLDDT ≥ 70 , 表明该模型可信度高。PAE (Predicted aligned error) 热图显示, 平均误差约 5.17 Å, 表明结构域间相对位置预测合理。SAVES v6.1 服务器验证结果进一步支持模型质量: ERRAT 值为 95.53%, VERIFY3D 通过率为 85.69%, PROCHECK 分析显示, 仅有 0.4% 的残基位于不合理区。以上结果表明该模型构象合理, 可用于后续分子对接模拟。利用 AutoDock Vina 对乙基多杀菌素的两种异构体 (Spinetoram-J 和 Spinetoram-L) 进行分子对接, 结果表明, 二者均能稳定结合于蛋白活性口袋。Spinetoram-J 的最佳结合构象自由能为 -38.1 kJ/mol, Spinetoram-L 为 -38.9 kJ/mol, 表明其具有较强的结合亲和力。结合模式分析显示, 乙基多杀菌素主要结合于血红素环附近的疏水性口袋。PLIP

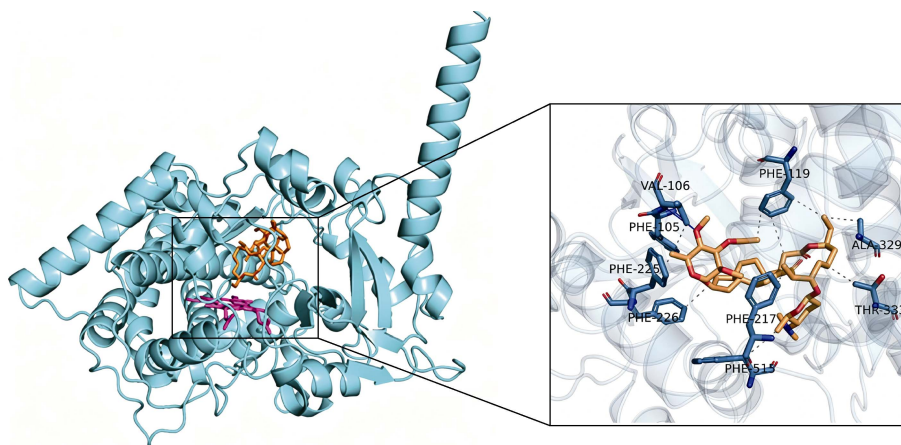


图 6 CYP9A304v2 蛋白与 Spinetoram-J 分子对接

Fig. 6 Molecular docking of CYP9A304v2 protein with Spinetoram-J

左侧为 CYP9A304v2 蛋白整体三维结构与配体结合位置；右侧为活性中心放大图，展示 Spinetoram-J 与蛋白关键氨基酸残基的结合位点及氢键相互作用。氨基酸三字母缩写代表对应残基，数字为氨基酸位点序号。图 7 同。

The left shows the overall three-dimensional structure of CYP9A304v2 protein and ligand binding site; The right is the enlarged view of active center, showing the binding sites and hydrogen-bond interactions between Spinetoram-J and key amino acid residues of the protein. The three-letter abbreviations represent corresponding residues, and the numbers indicate amino acid site numbers. The same for Fig. 7.

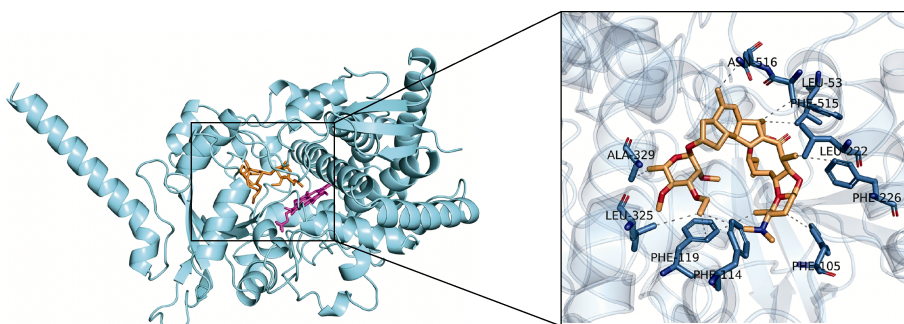


图 7 CYP9A304v2 蛋白与 Spinetoram-L 分子对接

Fig. 7 Molecular docking of CYP9A304v2 protein with Spinetoram-L

左侧为 CYP9A304v2 蛋白整体三维结构与配体结合位置；右侧为活性中心放大图，展示 Spinetoram-L 与蛋白关键氨基酸残基的结合位点及氢键相互作用。

The left shows the overall three-dimensional structure of CYP9A304v2 protein and ligand binding site; The right is the enlarged view of active center, showing the binding sites and hydrogen-bond interactions between Spinetoram-L and key amino acid residues of the protein.

分析结果表明，Spinetoram-J 与残基 PHE-105 和 VAL-106 形成 2 个氢键，并与 PHE-105、VAL-106、PHE-119 等多个疏水残基相互作用实现稳定结合（图 6）。相比之下，Spinetoram-L 与 LEU-325、PHE-515、PHE-226 等疏水残基相互作用实现稳定结合（图 7）。这些多重非共价相互作用共同维持了复合物的稳定性。PyMOL 可视化显示，乙基多杀菌素嵌入蛋白活性口袋内，与血红素环及周围关键氨基酸残基紧密接触。该

结合模式表明 CYP9A304v2 蛋白可能参与乙基多杀菌素进行的代谢反应。

3 结论与讨论

本研究围绕番茄潜叶蛾 CYP9 亚家族基因 CYP9A304v2，通过基因克隆、时空表达分析、胁迫诱导及分子对接等手段，探究该基因在番茄潜叶蛾生长发育及代谢乙基多杀菌素过程中的潜在功能。番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 基因，其开

放阅读框长 1 596 bp, 编码 531 个氨基酸, 其 C 端含有保守的血红素结合域, 这一特征与棉铃虫 *CYP9A12* 等鳞翅目昆虫 CYP 基因高度一致 (Zhou *et al.*, 2010), 证实其属于功能性细胞色素 P450 酶系。系统发育分析显示, 番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 和棉红铃虫的 *CYP6B2* 亲缘关系最近, 已有研究表明, CYP6 亚家族基因可能通过羟基化作用参与新烟碱类杀虫剂的解毒代谢, 例如褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *CYP6ER1* 可能通过氧化代谢参与吡虫啉解毒 (Pang *et al.*, 2016), 因此推测 *CYP9A304v2* 可能参与番茄潜叶蛾对特定外源化合物的解毒代谢过程。

时空表达分析作为解析基因功能与调控网络的核心手段, 通过揭示基因在特定发育阶段及组织或器官的表达动态, 为阐明其生物学作用提供关键线索。在昆虫解毒代谢研究中, CYP 基因的时空表达模式常与其生理功能及环境适应性紧密关联 (Hu *et al.*, 2019)。例如, 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* *CYP9A* 亚家族基因在幼虫期中肠特异性高表达, 并通过功能冗余代谢 λ -氯氟氰菊酯, 形成对化学杀虫剂的抗性防御 (Li *et al.*, 2023)。这些研究表明, 解毒基因的时空表达可塑性是昆虫协调发育需求与环境胁迫的重要进化策略。与上述集中于中肠的表达模式不同, 本研究发现番茄潜叶蛾 *CYP9A304v2* 呈现蛹期和体壁双高表达的特征, 提示在番茄潜叶蛾的防御策略中, 体壁屏障可能比中肠解毒具有更独特的作用。蛹期是幼虫向成虫转变的关键阶段, 体壁经历旧表皮降解、新表皮合成与鞣化等重塑过程, 角质层组分的代谢活动显著增强。*CYP9A304v2* 在此时期高表达, 暗示其可能参与了体壁重塑过程中的内源代谢调控, 例如蜕皮激素的降解或新表皮组分的合成 (Namiki *et al.*, 2005)。体壁作为昆虫抵御外源物质的第一道屏障, 其 P450 的富集表达可通过直接代谢穿透表皮的杀虫剂或强化表皮碳氢化合物渗透屏障来增强化学防御能力, 如家蝇 *Musca domestica* *CYP6A36* 在表皮中高表达并介导拟除虫菊酯抗性 (Zhu *et al.*, 2008), 锥蝱 *Triatoma infestans* 体壁高表达的 CYP4 家族基因通过调控表皮碳氢化合物合成形

成渗透屏障 (Dulbecco *et al.*, 2018)。因此, *CYP9A304v2* 在蛹期与体壁的高表达, 可能正是在体壁结构重塑中发挥关键作用。值得注意的是, 近期 Guo 等 (2024) 在草地贪夜蛾中发现 *CYP337B5* 同时参与氯虫苯甲酰胺解毒与保幼激素合成, 其表达模式与 *CYP9A304v2* 高度相似, 进一步支持了 P450 基因兼具发育调控与外源解毒双重功能的推论。然而, 二者的组织表达模式存在显著差异, *CYP337B5* 主要在中肠和头部高表达, 而 *CYP9A304v2* 在体壁的表达更为突出, 这可能反映了不同害虫 P450 在发挥功能时的组织差异。这种 P450 双功能特性或为昆虫在抗药性进化中平衡生存与生殖代价的分子基础。

尽管发育阶段的表达特征暗示了 *CYP9A304v2* 可能参与内源发育稳态, 但昆虫 P450 基因的表达常具有高度的环境可塑性。解毒酶基因的本底高表达往往预示着其在应对环境毒素胁迫时具备快速响应的潜力。为明确 *CYP9A304v2* 在外源乙基多杀菌素压力下的应答模式, 研究进一步检测了药剂胁迫后的表达。本研究发现, 经 LC_{50} 浓度乙基多杀菌素处理 48 h 后, *CYP9A304v2* 表达量较对照组显著上调。这一结果与白背飞虱 *Sogatella furcifera* *SfCYP4DE1* 基因对阿维菌素的急性胁迫响应 (贾泽艳等, 2020) 具有相似性, 推测 *CYP9A304v2* 基因可能在番茄潜叶蛾应对乙基多杀菌素胁迫的早期阶段发挥解毒功能, 其表达可能受剂量依赖的诱导特性调控, 如家蝇 *CYP6A36* 对拟除虫菊酯的响应模式 (Zhu *et al.*, 2008)。然而, 转录水平的显著上调仅能说明该基因具备胁迫响应能力, 其编码蛋白是否能直接识别并结合乙基多杀菌素, 仍需从酶-底物分子互作的结构层面加以验证。为此, 研究进一步借助建模与分子对接技术进行评估。

在本研究中, 首先利用 AlphaFold 3 对 *CYP9A304v2* 蛋白进行了结构预测与模型验证, 结果表明该模型在整体拓扑和局部残基水平均具有较高的可信度, 能够为后续的分子对接研究提供可靠基础。进一步的分子对接结果显示, 乙基多杀菌素的两种异构体 (Spinetoram-J 和 Spinetoram-L) 均能够稳定结合于 *CYP9A304v2*

的活性口袋, 结合自由能均低于 -37.7 kJ/mol , 表明二者与该酶具有较强的结合亲和力。结合模式分析发现, 乙基多杀菌素主要结合于铁卟啉环附近的疏水性口袋, 并通过氢键与疏水相互作用共同维持复合物的稳定性。这一结合特征与 P450 蛋白常见的配体结合模式一致。例如, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* CYP9A11 与毒死蜱等杀虫剂的结合同样依赖氢键与疏水相互作用的协同 (邓培渊等, 2016); 番茄潜叶蛾 TabsGSTs2 与 α -番茄碱的稳定结合亦由氢键和疏水作用力共同介导, 对接打分为 -8.39 (周昕雨等, 2025)。本研究中 CYP9A304v2 与乙基多杀菌素的结合模式与上述报道相似。这些结果提示, 乙基多杀菌素可能通过占据 CYP9A304v2 的活性口袋并干扰底物通道进入, 从而影响其催化效率。这不仅为理解 CYP9A304v2 在乙基多杀菌素代谢中的作用提供了结构基础, 也为后续开展分子动力学模拟和实验验证奠定了理论依据。

综合时空表达、诱导响应及分子对接的多维证据, 本研究成功克隆并鉴定了番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 基因, 并结合时空表达分析、乙基多杀菌素胁迫处理及分子对接等技术手段, 探讨了该基因在番茄潜叶蛾对乙基多杀菌素解毒代谢中的潜在作用。时空表达分析结果显示, CYP9A304v2 在番茄潜叶蛾所有发育阶段和不同组织中均有表达, 且在蛹期和体壁组织中表达水平最高; 在乙基多杀菌素 LC_{50} 浓度处理 48 h 后, 该基因表达量较对照组显著上调, 提示其可能通过氧化代谢途径参与杀虫剂的解毒过程。分子对接结果进一步支持了 CYP9A304v2 与乙基多杀菌素之间存在较强的结合能力, 揭示其在农药代谢中的潜在功能。综上, 本研究不仅为阐明番茄潜叶蛾 CYP9A304v2 的生物学功能提供了基础数据, 也为进一步解析番茄潜叶蛾抗药性形成的分子机制提供了重要候选基因和理论依据。同时需要指出的是, 本研究尚存在以下不足: 诱导实验仅采用单一浓度, 未设置梯度以明确剂量-效应关系; 基因功能缺乏 RNAi 或体外代谢的直接验证; 也未涉及田间种群的关联分析。后续研究将围绕 RNAi 功能验证、田间抗性种群表达量检测

及与其他 CYP 基因的协同关系展开。上述结果表明, 番茄潜叶蛾在变态发育关键期通过上调体壁 CYP9A304v2 基因以强化对外源毒素的防御, 这一策略为理解害虫抗药性进化中“发育-防御”的协同提供了新视角。在生产实际方面, 基于该基因在蛹期和体壁高表达的特征, 田间施药时建议在低龄幼虫高峰期用药以提高防效, 并将乙基多杀菌素与作用机制不同的杀虫剂轮换使用, 以延缓体壁屏障抗性的发展。

参考文献 (References)

- Biondi A, Guedes RNC, Wan FH, Desneux N, 2018. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 63: 239–258.
- Campos MR, Silva TBM, Silva WM, Silva JE, Siqueira HA, 2015. Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science*, 88(2): 405–412.
- Chang YB, Wang GY, Xi JQ, Yang MM, Guo JH, Li YE, Liang W, Song JZ, 2023. Molecular docking between odorant-binding proteins of *Lasioderma serricorne* and repellent ligands. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 46(4): 688–697. [常延斌, 王桂瑶, 奚家勤, 杨萌萌, 郭建华, 李玉娥, 梁伟, 宋纪真, 2023. 烟草甲气味结合蛋白与驱避配体的分子对接. *南京农业大学学报*, 46(4): 688–697.]
- Chen C, Pi W, Zhang Y, Nie CX, Liang J, Ma X, Wang YQ, Ge WX, Zhang WJ, 2019. Effect of a functional recombinant cytochrome P450 enzyme of *Helicoverpa armigera* on gossypol metabolism co-expressed with NADPH-cytochrome P450 reductase in *Pichia pastoris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155: 15–25.
- Chen YM, Cen YJ, Liu Y, Peng YN, Lin YG, Feng QL, Xiao Y, Zheng SC, 2025. P450 gene CYP321A8 is responsible for cross-resistance of insecticides in field populations of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Science*, 32(1): 227–242.
- Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys KAG, Burgio G, Arpaia S, Narváez-Vasquez CA, González-Cabrera J, Ruescas DC, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T, Urbaneja A, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: Ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83(3): 197–215.
- Deng PY, Li YH, Yuan W, Wang LQ, Li CK, 2016. Study on binding mechanisms of cytochrome P450 (CYP9A11) with three pesticides in *Spodoptera exigua*. *Chinese Journal of Pesticide*

- Science*, 18(2): 158–164. [邓培渊, 李玉华, 袁伟, 王林青, 李长看, 2016. 甜菜夜蛾细胞色素 P450 (CYP9A11) 与 3 种杀虫剂的结合机理研究. *农药学报*, 18(2): 158–164.]
- Du JJ, Yin HT, Li JZ, Zhang WX, Ding GS, Zhou D, Sun Y, Shen B, 2024. Transcription factor B-H2 regulates *CYP9J34* expression conveying deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Pest Management Science*, 80(4): 1991–2000.
- Dulbecco AB, Moriconi DE, Calderón-Fernández GM, Lynn S, McCarthy A, Roca-Acevedo G, Salamanca-Moreno JA, Juárez MP, Pedrini N, 2018. Integument CYP genes of the largest genome-wide cytochrome P450 expansions in triatomines participate in detoxification in deltamethrin-resistant *Triatoma infestans*. *Scientific Reports*, 8(1): 10177.
- Feng KL, Li H, Cao MY, Zhang JH, Xue YT, Luo ML, Li Y, Ma DF, Patima Wumuerhan, Huang C, Zhang GF, Zhang YB, 2025. Research progress on insecticide resistance and its mechanisms in the major invasive pest *Tuta absoluta*: Research progress on insecticide resistance and its mechanisms. *Journal of Environmental Entomology*, 47(4): 1015–1029. [冯科力, 李寒, 曹梦宇, 张静航, 薛延韬, 罗明磊, 李艳, 马东方, 帕提玛·乌木尔汗, 黄聪, 张桂芬, 张毅波, 2025. 重大外来入侵害虫番茄潜叶蛾抗药性及其机制研究进展. *环境昆虫学报*, 47(4): 1015–1029.]
- Feyereisen R, 2011. Insect CYP genes and P450 enzymes. *Insect Molecular Biology*, 8: 236–316.
- Guo XX, Hou JG, Zhang WJ, Zhang YH, Li HL, Cao WJ, Li HH, Li XS, 2024. A cytochrome P450 monooxygenase (*CYP337B5*) plays a key role in regulating juvenile hormone biosynthesis and degrading chlorantraniliprole in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 27(4): 102298.
- Hu B, Zhang SH, Ren MM, Tian XR, Wei Q, Mburu DK, Su JY, 2019. The expression of *Spodoptera exigua* P450 and UGT genes: Tissue specificity and response to insecticides. *Insect Science*, 26(2): 18.
- Ishak IH, Kamgang B, Ibrahim SS, Riveron JM, Irving H, Wondji CS, 2017. Pyrethroid resistance in Malaysian populations of dengue vector *Aedes aegypti* is mediated by CYP9 family of cytochrome P450 genes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1): e0005302.
- Jia ZY, Zhou C, Zeng QH, Shi M, Yang H, Jin DC, 2020. Cloning and sequence analysis of two P450 genes and expression of the genes in *Sogatella furcifera* under insecticides stress. *Chinese Journal of Biological Control*, 36(1): 87–96. [贾泽艳, 周操, 曾庆会, 石敏, 杨洪, 金道超, 2020. 白背飞虱两个 P450 基因的克隆、序列分析及杀虫剂胁迫下的表达分析. *中国生物防治学报*, 36(1): 87–96.]
- Li PR, Shi Y, Ju D, Liu YX, Wang W, He YS, Zhang YY, Yang XQ, 2023. Metabolic functional redundancy of the CYP9A subfamily members leads to P450-mediated lambda-cyhalothrin resistance in *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 79(4): 1452–1466.
- Li W, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR, 2004. Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Insect Molecular Biology*, 13(6): 603–613.
- Liang L, Li J, Jin L, Yan K, Pan Y, Shang Q, 2024. Identification of inducible CYP3 and CYP4 genes associated with abamectin tolerance in the fat body and malpighian tubules of *Spodoptera litura*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 198: 105751.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Ma LJ, Yang D, Wang J, Zhang Y, Ding XH, Fu KY, Wang XW, Tuexun-Ahemaiti, Jia ZZ, Guo WC, 2025. Occurrence, damage and control measures of *Tuta absoluta* in Xinjiang. *Xinjiang Farmland Science and Technology*, 48(1): 6–8. [马丽娟, 杨栋, 王俊, 张煜, 丁新华, 傅开赞, 王小武, 吐尔逊·阿合买提, 贾尊尊, 郭文超, 2025. 番茄潜叶蛾在新疆的发生危害及防控措施. *新疆农垦科技*, 48(1): 6–8.]
- Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai KI, Takeuchi H, Kataoka H, 2005. Cytochrome P450 *CYP307A1/Spook*: A regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1): 367–374.
- Pang R, Chen M, Liang ZK, Yue XZ, Ge H, Zhang WQ, 2016. Functional analysis of *CYP6ER1*, a P450 gene associated with imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Scientific Reports*, 6(1): 34992.
- Qu C, Huang JL, Che WN, Xie ZL, Fang Y, Deng QY, 2024. Resistance monitoring and risk assessment of tomato *Tuta absoluta* to spinetoram. *Acta Entomologica Sinica*, 67(12): 1634–1642. [渠成, 黄建雷, 车午男, 谢振良, 方勇, 邓群英, 2024. 番茄潜叶蛾对乙基多杀菌素的抗性监测及抗性风险评估. *昆虫学报*, 67(12): 1634–1642.]
- Qu C, Luo C, Mu CQ, 2023. Identification and control of *Tuta absoluta*. *Vegetables*, 2023(1): 81–83, 85. [渠成, 罗晨, 穆常青, 2023. 番茄潜叶蛾的识别与防治. *蔬菜*, 2023(1): 81–83, 85.]
- Shi Y, Jiang QQ, Yang YH, Feyereisen R, Wu YD, 2021. Pyrethroid metabolism by eleven *Helicoverpa armigera* P450s from the CYP6B and CYP9A subfamilies. *Insect Biochemistry and*

- Molecular Biology*, 135: 103597.
- Shi Y, Liu QQ, Lu WJ, Yuan J, Yang YH, Oakeshott J, Wu YD, 2023. Divergent amplifications of CYP9A cytochrome P450 genes provide two noctuid pests with differential protection against xenobiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(37): e2308685120.
- Stevens JL, Snyder MJ, Koener JF, Feyereisen R, 2000. Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(7): 559–568.
- Xie JG, Turak R, Liu N, Zhuang ZY, Liu XN, Song Y, 2025a. Spinetoram resistance in *Tuta absoluta*: Selection, inheritance, biochemical mechanism and fitness cost. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 215: 106659.
- Xie JG, Wang SY, Zhuang ZY, Wang XH, Lin MH, Liu XN, 2025b. Exploring the role of *CYP6AB328* in spinetoram resistance and growth and development of *Phthorimaea absoluta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 208: 106316.
- Zhang GF, Ma DY, Wang YS, Gao YH, Liu WX, Zhang R, Fu WJ, Xian XQ, Wang J, Kuang M, Wan FH, 2020. First report of the South American tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(7): 1912–1917.
- Zhang K, Li JR, Liu HL, Wang HY, Lamusi A, 2018. Semi-synthesis and insecticidal activity of spinetoram J and its D-forosamine replacement analogues. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14(1): 2321–2330.
- Zhou XJ, Ma CX, Li M, Sheng CF, Liu HX, Qiu XH, 2010. *CYP9A12* and *CYP9A17* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: Sequence similarity, expression profile and xenobiotic response. *Pest Management Science*, 66(1): 65–73.
- Zhou XY, Li JP, Huang C, Xu B, Cui JC, Wan FH, Zhang YB, Gui FR, Zhang GF, 2025. Gene cloning of glutathione S-transferase (*TabsGSTs2*) in *Tuta absoluta* and its molecular docking analysis with α -tomatine. *Journal of Environmental Entomology*, 47(1): 56–65. [周昕雨, 李金萍, 黄聪, 许博, 崔建臣, 万方浩, 张毅波, 桂富荣, 张桂芬, 2025. 番茄潜叶蛾谷胱甘肽 S-转移酶基因 *TabsGSTs2* 的克隆及与 α -番茄碱的分子对接分析. 环境昆虫学报, 47(1): 56–65.]
- Zhu F, Feng JN, Zhang L, Liu N, 2008. Characterization of two novel cytochrome P450 genes in insecticide-resistant house-flies. *Insect Molecular Biology*, 17(1): 27–37.