

甜菜夜蛾雄蛾触角内 2 个细胞色素 P450 cDNA 片段的克隆与组织表达分析

邵刚锋,董双林*,贺鹏

(南京农业大学植保学院农业部病虫害监测与治理重点开放试验室,南京 210095)

摘要:采用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)技术,从甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)雄蛾触角内扩增得到 2 个 P450 基因 cDNA 片段 CYP4L15 和 CYP4L16。序列分析表明,两个片段均具有 P450 的保守区序列,并且与几种已知参与气味降解的 P450 具有较高的同源性。通过 RT-PCR 方法进行的组织表达谱分析表明,2 个基因在雄蛾触角和足内高量表达,在头部和胸部低量表达;此外,CYP4L15 在腹部还有少量表达。多组织分布特点暗示两个基因可能担负包括气味降解在内的多种功能。

关键词:甜菜夜蛾;触角;气味降解酶;细胞色素 P450;组织表达

中图分类号:Q965.8 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2010)01-0030-06

Molecular Cloning and Tissue Expression of Two Cytochrome P450 cDNA Fragments in the Antennae of Male *Spodoptera exigua* (Hübner)

SHAO Gang-feng, DONG Shuang-lin*, HE Peng

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: By reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method, two cDNA fragments of P450 genes CYP4L15 and CYP4L16 were cloned using a pair of degenerate primers. The two fragments had the conserved I-helix and heme-binding domains of P450, and shared high identities with several putative insect odorant-degrading P450s. Further tissue expression analysis of the two genes showed that two genes might function as odorant-degrading enzymes, as they were highly expressed in antennae. However, their low expression in head and thorax for both genes, as well as in abdomen for CYP4L15 suggested that these genes had other functions besides the odorant degradation.

Key words: *Spodoptera exigua* (Hübner); antennae; odorant-degrading enzyme (ODE); cytochrome P450; tissue expression

昆虫依靠触角等器官上的嗅觉感器来感受和识别外界气味,从而引发定位配偶、寻找食物和搜索产卵场所等行为。嗅觉感器腔里的淋巴液中含有高浓度的气味结合蛋白^[1-5]和气味降解酶(odorant-degrading enzyme, ODE)^[6-10]。当疏水性的信息素或其它气味分子进入感器后,即被气味结合蛋白结合并穿过亲水性的感器淋巴液抵达嗅觉神经元树突膜上的受体,进一步与受体作用,启动级联反应,完成化学信号向电信号的转换^[1]。气味分子在完成和嗅觉受体的相互作用后,必须被气味降解酶迅速降解,从而恢复感器的敏感

性。同昆虫气味结合蛋白和气味受体相比,气味降解酶的研究比较少。最早是从多声大蚕蛾(*Antheraea polyphemus*)中鉴定出一种分子量为 55 kDa 的雄性触角特异性酯酶(Apo1SE)^[11-12]。随后,在烟草天蛾(*Manduca sexta*)^[11]、多声天蚕和家蚕(*Bombyx mori*)^[12]中又相继鉴定出了醛氧化酶。此外,分布在感器支持细胞中的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)^[13]和细胞色素 P450 (cytochrome P450)^[14-20],也被认为参与了对渗透入细胞内少量气味分子的降解。

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* (Hübner))属于

收稿日期:2009-06-11 作者简介:邵刚锋(1982-),男,硕士研究生;*通讯作者:sldong@njau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(30770278)

鳞翅目夜蛾科,是世界性分布的多食性农业害虫。该虫在我国南方为常发型害虫,在北方近年也上升为重要害虫,并且在棉花上普遍发生,应引起高度重视。由于过分依赖化学农药进行防治,甜菜夜蛾已对多种杀虫剂产生抗性^[21-22]。针对昆虫的气味感受机制,对 ODE 进行研究,不仅可以揭示昆虫气味通讯分子机制,而且对于针对嗅觉相关蛋白,开发更有效的行为调控技术进行害虫防治也具有重要价值^[1]。本文报道了甜菜夜蛾触角内 2 个 P450 基因 cDNA 片段的分子克隆、序列分析及其组织表达谱。

1 材料和方法

1.1 实验材料

甜菜夜蛾幼虫于 2008 年采自南京农业大学江浦农场大豆田,带回室内用人工饲料继代饲养,饲养温度为 26 °C,光/暗为 14 h/10 h。蛹期分雌雄,成虫羽化后第 3 天将雄蛾触角从基部剪下,并立即放入液氮中冷冻,-70 °C 保存备用。

1.2 试剂与仪器

Trizol Total RNA Isolation System Kit、rTaq DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、Wizard PCR Preps DNA 纯化试剂盒和 pGEM-T easy vector 均为 Promega 公司产品,PCR 引物由上海 Invitrogen 公司合成,PCR 扩增仪 (PTC-200 Thermocycler) 为 MJ Research 公司产品。其它试剂为国产 AR 级或进口分装 AR 级产品。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取。取 300 头雄蛾触角液氮下研磨后,用 Trizol Total RNA Isolation System Kit 进行 RNA 提取。所有操作按试剂盒说明书进

行,最后所得总 RNA 于 -70 °C 保存备用。

1.3.2 单链 cDNA 的合成。将 1 μg 总 RNA 和 2 μL Oligo-dT18 引物(500 μg·mL⁻¹)混匀于 PCR 管中,70 °C 水浴 5 min,然后立即冰浴 10 min。再往 PCR 管中加入 5 μL 5×RT 缓冲液、2 μL dNTP(10 mmol·L⁻¹)、1 μL Rnasin (40 U·μL⁻¹)、9 μL ddH₂O 和 1 μL M-MLV 反转录酶(200 U·μL⁻¹)。将上述混合物于 PCR 仪中完成反转录过程:42 °C 保温 60 min,95 °C 灭活 5 min,4 °C 保持。

1.3.3 PCR 扩增 cDNA 片段。根据已报道夜蛾科昆虫触角内具气味降解活性的 P450 保守区序列,设计一对简并引物:上游引物为 CYP4F1,下游引物为 CYP4R1(表 1)。PCR 反应体系 25 μL: 1.5 μL 第一链 cDNA 产物,2.5 μL PCR 10× Buffer,1.5 μL cDNA 模板,1.5 μL Mg²⁺,1 μL dNTP (10 mmol·μL⁻¹),上、下游引物各加 2 μL(10 mmol·μL⁻¹),rTaq 聚合酶 0.25 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。采用降落 PCR:94 °C,3 min;94 °C,40 s,55~45 °C,每个循环下降 0.5 °C,每个温度 40 s,72 °C,40 s,35 个循环;72 °C,10 min;4 °C 保持。扩增完毕后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收目标片段。

1.3.4 PCR 产物克隆及测序。PCR 产物经胶回收纯化后连接到 pGEM-T easy 载体上(按试剂盒说明书操作),然后转化到大肠杆菌 DH5α,经蓝、白斑筛选,挑取白色菌落放入含有 Amp^r 100 μg·μL⁻¹ 的 LB 培养基中培养,取质粒用 EcoRI 酶切鉴定。随机选取 5 个阳性克隆样品送上海博亚公司测序。

1.3.5 序列分析。序列分析由 Vector NTI 软件完成,Blast 同源性搜索在 NCBI 网站进行,用 Gene-

表 1 引物序列

Table 1 Oligonucleotide primer sequences

引物用途	名称	序列
片段克隆	CYP4-F	5'-GAYACNTTYATGTTYRARGGNCAYG-3'
	CYP4-R	5'-GCRAAYTTYTGNCDDATRCARTT-3'
表达谱分析	CYP4L15-F	5'-TATCTTCGGGAACGAAATGC-3'
	CYP4L15-R	5'-TGAAGGGATTCTTCAATGGC-3'
	CYP4L16-F	5'-AACGAAATGCACAGAGACCC-3'
	CYP4L16-R	5'-TGAAGGGATTCTTCAATGGC-3'
	β-actin-F	5'-ATCTGGCACACCTTCTACAACGA-3'
	β-actin-R	5'-TCACGCACGATTTCCCTCTCA-3'

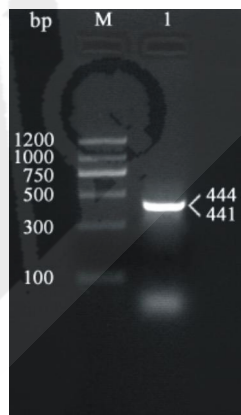
Doc 软件进行多序列同源性比对和结果输出。

1.3.6 RT-PCR 分析。根据已获得的 P450 基因片段分别设计两对特异引物:F1,R1;F2,R2,并设计一对甜菜夜蛾持家基因引物 β -actinF 和 β -actinR (表 1)。选择雄蛾的触角、头、胸、腹、足、翅进行组织表达分析。RT-PCR 扩增反应采用降落 PCR: 94 °C, 3 min; 94 °C, 40 s, 60~50 °C, 每个循环下降 0.5 °C, 每个温度 40 s, 72 °C, 40 s, 35 个循环; 72 °C, 10 min; 4 °C 保持。扩增完毕后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。持家基因 RT-PCR 扩增反应体系为: 94 °C, 3 min; 94 °C, 40 s, 49 °C, 40 s, 72 °C, 40 s, 35 个循环; 72 °C, 10 min; 4 °C 保持。扩增完毕后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果与分析

2.1 P450 cDNA 片段扩增

以甜菜夜蛾雄蛾触角 cDNA 为模板,用一对简并引物,通过 RT-PCR 扩增出 450 bp 左右的条带(图 1)。将 cDNA 纯化后克隆到 pGEM-Teasy 载体上,然后转化到大肠杆菌 DH5 α , 经蓝、白斑筛选,随机选取 10 个阳性克隆测序,得到 2 个长度分别为 444 bp 和 441 bp 的片段,经推导分别由 148 和 147 个氨基酸残基组成。2 个片段均具有 P450 基因的 I 螺旋和亚铁血红素结合域(图 2)。将 2 个片段分别命名为 CYP4L15 和 CYP4L16。



M: DNA 标准, DNA maker; I: PCR 产物, PCR product.

图 1 甜菜夜蛾触角内 P450 cDNA 片段的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of P450 cDNA fragments in *S. exigua*

2.2 序列同源性比较

利用 NCBI、GeneDoc 等分析软件,将两个甜

菜夜蛾 P450 cDNA 片段推导的氨基酸序列与已知其它参与气味降解的 P450 进行同源性对比分析(图 3)。结果表明,CYP4L15 的氨基酸序列与甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 触角 CYP4L4 基因的同源性最高,为 94%;与斜纹夜蛾 (*S. litura*) cytochrome P450 CYP4L9v1、斜纹夜蛾 cytochrome P450 CYP4L9v2、金龟子 *Phyllopertha diversa* 性信息素降解酶和赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 性信息素降解酶的同源性分别为 86%、86%、48% 和 47%。CYP4L16 的氨基酸序列也与甘蓝夜蛾触角 CYP4L4 基因的同源性最高,为 93%;与斜纹夜蛾 cytochrome P450 CYP4L9v1、斜纹夜蛾 cytochrome P450 CYP4L9v2、金龟子性信息素降解酶和赤拟谷盗性信息素降解酶的同源性分别为 85%、86%、46% 和 48%。2 个甜菜夜蛾 P450 cDNA 片段间的氨基酸序列的同源性为 97%。

2.3 P450 基因组织表达谱

根据 CYP4L15 和 CYP4L16 的 cDNA 序列,分别设计了一对特异引物(表 1),并选用甜菜夜蛾肌动蛋白基因 β -actin 作为参照基因,通过 RT-PCR 方法调查了甜菜夜蛾雄蛾不同组织内 2 种 P450 基因的表达情况。结果表明,两种基因都在触角和足内表达,且表达量较高。此外,CYP4L15 基因在头、胸、腹及翅均有表达;CYP4L16 基因在头、胸、翅均有表达,翅内表达量最低,但在腹部没有表达(图 4)。

3 讨论

细胞色素 P450 酶是广泛存在于几乎所有生物体的一类代谢酶系,具有底物广泛性和功能多样性的特点。它不仅在杀虫剂的分解代谢中起着重要作用,而且参与了蜕皮激素、保幼激素、信息素及植物次生性化合物的代谢。Leal W S 等首先从多音天蚕和日本金龟子触角内克隆了触角特异表达的 P450 基因,并通过生化实验证明,该基因参与了性信息素的降解^[15-17]。随后,Marbèche C M 等在甘蓝夜蛾触角内成功克隆出 CYP4S4 和 CYP4L4 基因,进一步研究表明,前者在触角内特异表达,并主要集中在毛形感器内,由此推测它参与性信息素的降解^[9]。本研究通过 RT-PCR 技

```

1  GAC ACG TTC ATG TTT GAG GGG CAT GAT ACA ACC ACT TCG GGC ATC GTT TAT ACC CTC TTT
   D T F M F E G H D T T T S G I V Y T L F
61 TGT CTA TCT AAG CGA AGA GAT GTT CAA GAG AAA ATC TAC GAA GAA CTG AAG ATT ATC TTC
   C L S K R R D V Q E K I Y E E L K I I F
121 GGG AAC GAA ATG CAC AGA GAC CCG ACT TAT CAT GAA CTA GCT CAA ATG AAA TAC TTG GAG
   G N E M H R D P T Y H E L A Q M K Y L E
CYP4L15 181 CTG GTC ATC AAG GAG TCG ATG CGG TTA TTC CCA CCT GTG CCT CTG ATT GAG CGA AGA ATC
   L V I K E S M R L F P P V P L I E R R I
241 ATG AAA GAT TGT GAG GTA GGA GGT CTG AAG CTA TTG AAA GGT ACT TTA GTA GTA ATG AAC
   M K D C E V G G L K L L K G T L V V M N
301 ATC TAC CAG ATC CAG CGG CAG CCG GAT TTG TAT GAT GAC CCG TTG GAG TTC CGC CCT GAA
   I Y Q I Q R Q P D L Y D D P L E F R P E
361 AGG TTT GAG GCG CCA TTG AAG AAT CCC TTC AGC CGG TTG GCG TTC AGT GCT GGT CCT AGG
   R F E A P L K N P F S R L A F S A G P R
421 AAC TGC ATC GGT CAG AAG TTC GCA
   N C I G Q K F A

1  GAC ACT TTC ATG TTT AAG GGG CAC GAT ACA ACC ACT TCG GGC ATC GTT TAT ACC CTC TTT
   D T F M F K G H D T T T S G I V Y T L F
61 TGT CTA TCT AAG CGA AGA GAT GTT CAA GAG AAA ATC TAC GAA GAA CTG AAG ACT ATC TTC
   C L S K R R D V Q E K I Y E E L K T I F
121 GGG AAC GAA ATG CAC AGA GAC CCG ACT TAT CAT GAA CTA GCT CAA ATG AAA TAC TTG GAG
   G N E M H R D P T Y H E L A Q M K Y L E
CYP4L16 181 CTG GTC ATC AAG GAG TCG ATG CGG TTA TTC CCA CCT GTG CCT CTG ATT GAG CGA AGA ATC
   L V I K E S M R L F P P V P L I E R R I
241 ATG AAA GAT TGT GAG GTA GGA GGT CTG AAG CTA TTG AAA GGT ACT TCA GTA GTA ATG AAC
   M K D C E V G G L K L L K G T S V V M N
301 ATC TAC CAG ATC CAG CGG CAG CCG GAT TTG TAT GAT GAC CCG TTG GAG TTC CGC CCT GAA
   I Y Q I Q R Q P D L Y D D P L E F R P E
361 AGG TTT GAG GCG CCA TTG AAG AAT CCC TTC AGC TGG TTG GCG TTC AGT GCT GGT CCT AGG
   R F E A P L K N P F S W L A F S A G P R
421 AAC TGC ATC GGC CAG AAG TTC GCA
   N C I G Q K F A

```

下划线的序列为引物序列;加框部分分别表示: I 螺旋和亚铁血红素结合域。

图 2 CYP4L15 和 CYP4L16 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence of CYP4L15 and CYP4L16

```

*          20          *          40          *          60          *          80
CYP4L15 : DTFMFKGHDTTTSGIVYTLFCLSKRRDVQEKIYEELKTI FGNEMHRDPTYHELQMKYLELVIKESMRLFPVPLIERRIMKD : 83
CYP4L16 : DTFMFEHGDTTTSGIVYTLFCLSKRRDVQEKIYEELKTI FGNEMHRDPTYHELQMKYLELVIKESMRLFPVPLIERRIMKD : 83
CYP4L4 : DTFMFEHGDTTTSGIVYTLHCLSKRRDVQEKIYEELKTI FGNEMHRDPTYHELQMKYLELVIKESMRLFPVPLIERRIMKD : 83
CYP4L9v1 : DTFMFEHGDTTTSGISYTYLCLSKRRDVQEKVYEELKTI FGDMMERDPTYQELGQMKYLELVKESMRLFPVPLIERRITKD : 83
CYP4L9v2 : DTFMFEHGDTTTSGISYTYLCLSKRRDVQEKVYEELKTI FGDMMERDPTYQELGQMKYLELVKESMRLFPVPLIERRITKD : 83
Pd-PDE : DTFMFEHGDTTTATSITFALYALAMNPHIQEKAYAEKEIFSNNSKRHASRYDLQEMKYLEMVIKETLRIYTTVPFYSRLEED : 83
Tc-PDE : DTFMFEHGDTTASGISFALYCLANNPEAQEKAYEEQVALFGKEKKPVSYSDLQEMKYLELVIKELRLYPSVFPFYARETNQE : 83
DTFMFeGHDTT 3gI 5 L cL QEK YeElk 6Fg r 3Y L 2MKYLE6V6KE 6R65p VP R d

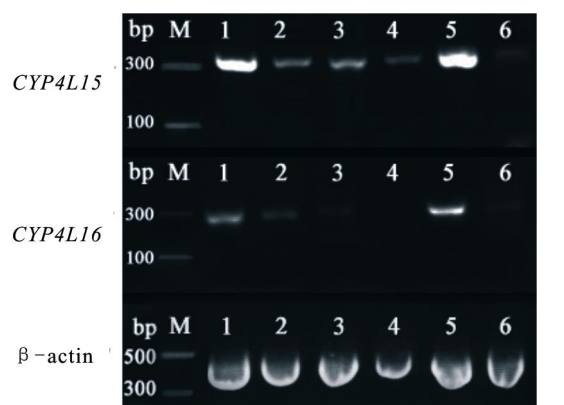
*          100          *          120          *          140          *          160
CYP4L15 : CEV-GGLKLLKGTSVVMNIYQIQRPDLDDPLEFRPERFE---APLKNPFSWLAFA SAGPRNCIGQKFA----- : 148
CYP4L16 : CEV-GGLKLLKGTSVVMNIYQIQRPDLDDPLEFRPERFE---APLKNPFWLAFA SAGPRNCIGQKFA----- : 148
CYP4L4 : CEV-GGLKLVKGTSVVMNIYQIQRPDLDDPLEFRPERFE---APLKNPFSWLAFA SAGPRNCIGQKFAEMMELKITISEIVKN : 162
CYP4L9v1 : CEV-GGLKLVKGTSVVNIYQIQRPDMFEDPLEFRPERFE---ESLKNPFSWLAFA SAGPRNCIGQKFA----- : 148
CYP4L9v2 : CEV-GGLKLVKGTSVVNIYQIQRPDMFEDPLEFRPERFE---EPLKNPFSWLAFA SAGPRNCIGQ----- : 145
Pd-PDE : VNMNGQI-LPRGTMLNVFAYGVHHPKVIYKDPETFDPERFSIENSKERSPPAFIFPSAGPRNCIGQKFA----- : 151
Tc-PDE : VEF-GDIRIPKGVNITIFAYGHRDPKYPPEPKDFDGRFETIDGKL--PYAYIFPSAGPRNCIGQKFA----- : 149
e g 6k6 Kgt 6 5 6 r P 5 dP F PerFe 1 p5 56 F AGPRNCIGqk

```

CYP4L4、CYP4L9v1、CYP4L9v2、Pd-PDE、Tc-PDE 分别来自甘蓝夜蛾、斜纹夜蛾、斜纹夜蛾、日本金龟子、赤拟谷盗。

图 3 CYP4L15 和 CYP4L16 与其它几种昆虫 P450 的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of CYP4L15 and CYP4L16 with those of other insect species



M: DNA 标准;1:触角;2:去除触角的头;3:胸;4:腹;5:足;6:翅。

图 4 2 个甜菜夜蛾 P450 基因在雄蛾体内的组织表达
Fig. 4 Tissue expression of two P450 genes in the antennae of male *S. exigua*

术,从甜菜夜蛾雄蛾触角中克隆到 2 个 P450 基因 cDNA 片段 *CYP4L15* 和 *CYP4L16*,它们与已报道的具有气味降解功能的夜蛾科昆虫 P450 具有较高的同源性。推测这 2 个 P450 也可能参与了对气味分子的降解作用。

RT-PCR 分析表明,甜菜夜蛾的 2 个 P450 基因在触角、足和头部均有表达,这与 3 个组织担负的化学感受功能相一致。触角是昆虫最重要的化学感受器官,分布有众多的嗅觉器和味觉器;昆虫的足和头部的口器上也分布有不同类型的化感器,但以味觉器为主。除在上述化感组织表达外,*CYP4L15* 在不具化感功能的胸和腹部也有表达,说明该基因可能还担负降解气味物质以外的功能。P450 对随食物进入昆虫体内的植物次生物质或农药的代谢作用已有很多研究报道。当然,要明确 2 个基因的功能,还有赖于进一步的离体和活体功能研究,如进一步克隆基因全长并进行体外大量表达后进行生化实验,或应用 RNAi 等技术沉默这些基因后观察其表型反应。此外,需要指出的是,RT-PCR 是一种半定量技术,因此本文所得的不同组织的表达量,只是一种相对结果,更为精确的定量尚待应用定量 PCR 等技术进一步研究。

参考文献:

- [1] 修伟明,董双林,王荫长. 昆虫信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展[J]. 昆虫学报,2005,48(5):778-784.
- [2] 修伟明,董双林,苗慧,等. 2 个甜菜夜蛾信息素结合蛋白 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. 中国农业科学,2005,38(7):1501-1504.
- [3] XIU Wei-ming, Dong Shuang-lin, Miao Hui, et al. Molecular cloning and sequence analysis of two cDNA fragments of pheromone binding protein in male beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(7): 1501-1504.
- [4] BOHBOT J, Vogt R G. Antennal expressed genes of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti* L.): characterization of odorant-binding protein 10 and takeout[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35: 961-979.
- [5] CALLAHAN F E, Vogt R, Tucker M L, et al. High level expression of "male specific" pheromone binding proteins (PBP) in the antennae of female noctuid moths[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 30: 507-514.
- [6] MERLIN C, Rosell G, Carot-sans G. Antennal esterase cDNA from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odorant degradation[J]. Insect Molecular Biology, 2006, 16(1): 73-81.
- [7] MAÏBÈCHE C M, Merlin C, Francois M C. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae[J]. Chemical Senses, 2004, 29: 381-390.
- [8] ISHIDA Y, Leal W S. Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNA from the wild silkworm, *Antheraea polyphemus* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32: 1775-1780.
- [9] VOGT R G, Riddiford L M. Scale esterase: a pheromone-degrading enzyme from scales of silk moth *Antheraea polyphemus* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1986, 12(2): 469-482
- [10] VOGT R G, Riddiford L M, Prestwich G D. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*[J]. Proceedings of National Academy of Sciences in the United States of America, 1985, 82 (24): 8827-8831.
- [11] RYBCZYNSKI R, Reagan J, Lerner M R. A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*[J]. The Journal of Neuron, 1989, 9(4): 1341-1353.
- [12] RYBCZYNSKI R, Vogt R G, Lerner M R. Antennal-specific

- pheromone-degrading aldehyde oxidase from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(32): 19712-19715.
- [13] 王桂荣, 郭予元, 吴孔明. 一个棉铃虫触角特异表达基因 cDNA 片段的克隆[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11 (1): 49-54.
WANG Gui-rong, Guo Yu-yuan, Wu Kong-ming. Cloning of cDNA fragment of an antennal-specific gene in *Helicoverpa armigera*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11 (1): 49-54.
- [14] VOGT R G, Raddiford L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. *Nature*, 1981, 293(5828): 161-163.
- [15] LEAL W S, Wojtasek H, Picimbon J F, et al. Perireceptor events in pheromone perception in scarab beetles[J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1998, 1(1): 1-8.
- [16] MAÏBÈCHE C M, Nikonov A A, Ishida Y. Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by *in vivo* inhibition of a pheromone-degrading enzyme [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences in the United States of America*, 2004, 101 (31): 11459-11464.
- [17] ISHIDA Y, Leal W S. Rapid inactivation of a moth pheromone [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences in the United States of America*, 2005, 102(39): 14075-14079.
- [18] WOJTASEK H, Leal W S. Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phfloperttha diversa* (*Coleoptera; Scarabaeidae*) [J]. *FEBS Letters*, 1999, 458 (3): 333-336.
- [19] MAÏBÈCHE C M, Merlin C, Francois M C. P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae[J]. *Gene*, 2005, 346: 195-203.
- [20] MAÏBÈCHE C M, Jacquin-Joly E, Francois M C, et al. cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2002, 11(3): 273-281.
- [21] 刘永杰, 沈晋良. 甜菜夜蛾对四类杀虫剂的抗药性监测[J]. *棉花学报*, 2002, 14(6): 356-360.
LIU Yong-jie, Shen Jin-liang. Monitoring for four group of insecticides resistance in *Spodoptera exigua* (*Lepidoptera: Noctuidae*)[J]. *Cotton Science*, 2002, 14(6): 356-360.
- [22] 贾变桃, 沈晋良, 刘永杰. 甜菜夜蛾对虫酰肼的抗药性监测及抗性风险评估[J]. *棉花学报*, 2006, 18(3): 164-169.
JIA Bian-tao, Shen Jin-liang, Liu Yong-jie. Monitoring and risk assessment of resistance to tebufenozide in *Spodoptera exigua* [J]. *Cotton Science*, 2006, 18(3): 164-169
- [23] SCOTT J G. Cytochrome P450 and insecticide resistance [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29: 757-777. ●