

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.02.002

冯伟, 周勇, 张玉娟. 中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因的变异和进化研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(2): 17-30.

中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因的变异和进化研究

冯伟, 周勇, 张玉娟, 陈斌

重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331

摘要: 中华按蚊是我国疟疾传播的主要媒介蚊虫之一, 其对拟除虫菊酯类杀虫剂产生的抗药性已成为疟疾防控工作的重要挑战。基于 36 个中华按蚊样本的重测序数据和参考基因组数据, 使用伯勒斯-惠勒比对器 (Burrows-Wheeler Aligner, BWA) 和基因组分析工具包 (Genome Analysis Toolkit, GATK) 进行变异检测, 提取 *P450* 基因的 SNPs (单核苷酸多态性) 数据, 并对 *P450* 基因的 SNPs 数据进行进化树分析、主成分分析、遗传结构分析、遗传变异分析。在基因组水平上探究中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关的 *P450* 基因的单核苷酸多态性和进化特征。结果表明: 中华按蚊 *P450* 基因的 SNPs 和 InDels (插入/缺失) 主要分布在基因间区; 群体结构分析显示 36 个样本分为 3 个遗传群组, 3 个种群间可能存在地理隔离; 重庆种群样本聚类比较分散; 发生遗传变异的 *P450* 基因有 *CYP6P3v1*、*CYP9J10*、*CYP9K1*, 主要集中在 *CYP6* 和 *CYP9* 家族。*CYP6P3v1* 存在编码区同义替换 (L118L) 和内含子区 SNPs; *CYP9J10* 存在编码区非同义替换 (S162N); *CYP9K1* 主要存在基因间区 SNPs。36 个中华按蚊样本的聚类结果与地理区域一致, 不同种群间可能存在地理隔离现象。*CYP6P3v1*、*CYP9J10* 和 *CYP9K1* 的遗传变异可能与拟除虫菊酯抗性相关。

关键词: 中华按蚊; *P450* 基因; 单核苷酸多态性; 插入/缺失

中图分类号: Q969.44⁺2.2 文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2026)02-0017-14

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Variation and Evolution of *P450* Genes Associated with Pyrethroid Resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)

FENG Wei, ZHOU Yong, ZHANG Yujuan, CHEN Bin

College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: *Anopheles sinensis* is one of the primary malaria vector mosquitoes responsible for malaria trans-

收稿日期: 2025-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672363, 31872262); 国家科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300)。

作者简介: 冯伟, 硕士研究生, 主要从事媒介蚊虫杀虫剂抗性分子机制研究。

通信作者: 陈斌, 二级教授, 博士研究生导师。

mission in China, and its resistance to pyrethroid insecticides has become a major challenge for malaria control efforts. Based on the resequencing data from 36 *An. sinensis* samples and reference genome data, variant detection was performed using BWA and GATK software. Single nucleotide polymorphism (SNPs) data of *P450* genes were extracted, followed by phylogenetic tree analysis, principal component analysis (PCA), population structure analysis, and genetic variation analysis. This study explored the single nucleotide polymorphisms and evolution of *P450* genes associated with pyrethroid resistance in *An. sinensis* at the genomic level. The results showed that SNPs and InDels in the *P450* genes of *An. sinensis* were mainly distributed in intergenic regions. Population structure analysis revealed that the 36 samples could be divided into three genetic groups, with potential geographical isolation among the populations. The Chongqing population exhibited a scattered clustering pattern. Genetic variations were identified in the *P450* genes *CYP6P3v1*, *CYP9J10*, and *CYP9K1*, primarily concentrated in the *CYP6* and *CYP9* families, as corroborated by previous expression profiling and RNA interference experiments. Specifically, *CYP6P3v1* contained a synonymous SNP (L118L) in the coding region and intronic SNPs, *CYP9J10* exhibited a nonsynonymous SNP (S162N) in the coding region, and *CYP9K1* mainly had SNPs in intergenic regions. The clustering of the 36 *An. sinensis* samples in this study aligned with their geographic distribution, suggesting potential geographic isolation among different populations. Furthermore, the genetic variations in *CYP6P3v1*, *CYP9J10*, and *CYP9K1* identified in this study may be associated with pyrethroid resistance.

Key words: *Anopheles sinensis*; *P450* gene; SNPs; InDels

中华按蚊 *Anopheles sinensis* 隶属节肢动物门(Arthropod)、昆虫纲(Insecta)、双翅目(diptera)、蚊科(Culicidae)、按蚊属 *Anopheles*, 是疟疾、马来丝虫病、乙型脑炎等疾病的重要媒介蚊虫, 在我国和东南亚国家广泛分布^[1-3]。目前, 在媒介蚊虫防控中化学防治是主要手段。由于拟除虫菊酯杀虫剂具有高效、低毒等优势, 成为了防控疟疾媒介蚊虫最常用的杀虫剂^[4-6]。但随着拟除虫菊酯杀虫剂被长期广泛使用, 学者们发现其药效明显降低, 蚊虫对该类药剂产生了不同程度的抗性^[7-10]。

细胞色素 P450 酶是参与代谢外源性、内源性化合物以及各种杀虫剂的重要解毒酶系^[11], 可以与拟除虫菊酯杀虫剂分子基团发生氧化、脱氨、羟基化等化学反应, 从而使拟除虫菊酯杀虫剂失去毒性, 因此细胞色素 P450 酶在拟除虫菊酯杀虫剂抗性机制中起着重要作用^[12]。先前研究发现, 蚊虫 *CYP6*、*CYP9*、*CYP4* 亚家族成员与杀虫剂抗性有关, 其中 *CYP6* 亚家族成员被认为与抗性密切相关^[13]。例如: 冈比亚按蚊的 *CYP6P3* 和 *CYP6M2* 基因与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性密切相关^[14]; 淡色库蚊的 *CYP6AA9* 基因在溴氰菊酯抗性品系中上调表达, 其被 RNAi(RNA 干扰)沉默之后导致淡色库蚊的死亡率增加^[15]; 埃及伊蚊的 *CYP6BB2*、*CYP6M11*、*CYP9J23* 基因在拟除虫菊酯类杀虫剂抗性中上调表达^[16]。Yan 等^[17]通过 RNA-seq 和 RT-qPCR 验证发现, *CYP6Z2*、*CYP6P3v1*、*CYP6P3v2*、*CYP9J5*、*CYP306A1* 基因在拟除虫菊酯抗性中显著上调表达, 可能与拟除虫菊酯抗性相关。在实验室前期研究中, Guo 等^[18]发现 3 个 (*CYP9K1*、*CYP6P3v1*、*CYP9J10*)*P450* 基因被 RNAi 沉默之后, 降低了中华按蚊对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性, 证实了这 3 个 *P450* 基因与拟除虫菊酯抗性相关。研究表明, *P450* 基因上调表达可能源于其调控区 DNA 序列发生核苷酸插入、缺失或者碱基替换等变异, 这些变异可能会增强调控元件和转录因子的结合能力, 或者促使新的调控元件产生, 或者破坏沉默子的功能性结合位点^[19-20]。解毒酶基因编码区的变异可以修饰蛋白酶结构, 增强解毒酶活性, 从而提高其对杀虫剂的代谢解毒效率^[21-23]。目前, 昆虫 *P450* 基因

编码区变异对杀虫剂产生抗性的报道较少, 之前在牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 抗苜蓿菊酯品系中, 发现 *CYP6X1* 基因编码区存在大量的核苷酸变异, 其变异与抗性的关联性需进一步研究^[24]。在褐飞虱的吡虫啉抗性品系中, 发现 *CYP6ER1* 编码区存在突变, 这可能是褐飞虱对杀虫剂产生抗性的重要因素^[25]。

SNP 是物种适应环境变化和进化的重要分子基础, 特定的 SNP 可能影响基因表达, 从而影响生物对环境的适应能力。目前, 全基因组水平检测蚊虫抗性相关的单核苷酸多态性研究较少^[26]。

本研究对 36 个中华按蚊个体进行遗传变异检测, 并对 *P450* 基因的 SNPs 数据进行进化树分析、主成分分析、遗传结构分析、遗传变异分析。其中, 重点分析了中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因的遗传变异特征, 为深入解析中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因表达调控和解毒酶活性机制奠定了数据基础。

1 材料与方法

1.1 蚊虫来源

在重庆、云南、安徽 3 个省(市)的稻田中采集 4 龄按蚊幼虫^[27], 并在当地养蚊室内饲养至成虫。室内饲养条件为 27 °C、相对湿度 80%。随后, 提取蚊虫足部进行物种的分子鉴定^[28]。雌性成蚊羽化 72 h 后, 采用世界卫生组织(WHO)推荐的药膜生物测定法进行抗性检测, 将雌性成蚊暴露在含有 0.05% 溴氰菊酯药膜接触桶中 60 min, 随后将其转移到恢复桶中, 若蚊虫在 60 min 内死亡或者机械刺激无反应, 则判定为拟除虫菊酯敏感个体; 24 h 后统计蚊虫的死亡率, 存活个体判定为拟除虫菊酯抗性个体。敏感品系成蚊的相对敏感基线 LC_{50} (半致死浓度)为 0.006 7 mg/L, 云南抗性品系(YN-FR)、重庆抗性品系(CQ-FR)、安徽抗性品系(AH-FR)的抗性倍数分别为 500 倍、800 倍、800 倍, 均达到国家标准的高抗水平^[29]。最终, 从重庆、云南、安徽 3 个省(市)分别收集 6 只拟除虫菊酯抗性成蚊(Field Pyrethroid-Resistant Strain, FR)和 6 只拟除虫菊酯敏感成蚊(Field Pyrethroid-Susceptible Strain, FS), 共 36 个样本用于后续分析。

1.2 数据来源

将 36 个中华按蚊野外样本送往华大公司进行测序, 并采用 Illumina HiSeq2000 平台测序获得重测序数据, 中华按蚊的参考基因组(GCA-000441895.2)由重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所提供^[30-31]。

1.3 低质量数据过滤和序列比对

使用 fastp 软件^[32]对原始测序数据(Raw reads)进行质量控制与过滤, 获得高质量测序读段(Clean reads)。然后, 使用 BWA 软件^[33]将 36 个中华按蚊样本的高质量测序读段与参考基因组进行比对。通过 SAMtools(处理高通量测序比对数据的软件集)^[34]将比对生成的 SAM(存储测序序列与参考基因组比对结果的文本格式)文件转换为排序后的 BAM(SAM 的二进制压缩格式)文件, 并去除 PCR(聚合酶链式反应)重复序列, 最终获得用于后续分析的比对结果文件。

1.4 群体 SNPs 和 InDels 变异检测及注释

使用 GATK^[35]对 36 个中华按蚊样本的比对结果进行 SNPs 和 InDels 变异检测。为确保数据质量, 对原始变异位点进行过滤, 并使用 ANNOVAR 软件^[36]进行注释分析。

1.5 群体结构分析的 SNPs

前期基于中华按蚊基因组注释蛋白库, 使用 BLASTP 和 Hmsearch 两种方法, 获得中华按蚊 *P450* 基因^[17]。再使用 VCFtools 软件^[37]对 GATK 过滤后的变异结果进一步筛选, 剔除次要等位基因频率(maf) < 0.05 的位点、去除基因组型缺失率超过 20% 的位点, 同时仅保留二等位 SNPs 变异位点。基于中华按蚊基因组注释文件, 使用 Python 脚本提取 *P450* 基因家族成员的注释信息。最后, 根据 *P450* 基因在基因组中的起始和终止位置, 使用 VCFtools(参数: -bed)提取 All.filtered.vcf 文件中的变异位

点^[38], 作为 *P450* 基因家族成员的 SNPs 数据, 用于后续群体结构分析。

1.6 进化树分析

使用 PHYLIP 软件中的邻近法(Neighbor-Joining Methods)构建系统发育树(F84 模型, 100 次 Bootstrap 重复), 并使用 Ggtree 进行可视化展示。

1.7 主成分分析

基于 36 个中华按蚊样本的遗传变异数据, 使用 GCTA 软件^[39]进行主成分分析, 并根据主成分聚类结果将 36 个中华按蚊样本划分为不同的遗传亚群。

1.8 群体遗传结构分析

使用 Admixture 软件^[40]进行群体遗传结构分析。通过最大似然估计法确定最优群体数目 K (预设范围 2- N), 并使用贝叶斯算法计算每个 K 值下的群体分群。

1.9 筛选中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因的差异 SNPs

36 个样本分为 6 个组, 即安徽抗性组 AH-FR、安徽敏感组 AH-FS、重庆抗性组 CQ-FR、重庆敏感组 CQ-FS、云南抗性组 YN-FR、云南敏感组 YN-FS。每组 6 个样本, 且相同地区的抗性组和敏感组比较, 如安徽抗性组 AH-FR 与安徽敏感组 AH-FS 比较, 另外两个地区也是如此。将组内基因型一致, 但组间基因型存在差异的位点定为差异位点。筛选差异位点的标准为: 在安徽抗性组(AH-FR)中, 6 个样本中有 80% 的样本(即 5 个样本)具有一致的基因型(记为该组的优势基因型 A); 同时在安徽敏感组(AH-FS)中, 6 个样本中也要有 80% 的样本(即 5 个样本)具有一致的基因型(记为该组的优势基因型 B)。仅当 A 与 B 不同时, 该位点才被定义为差异位点。然后, 对这些位点进行注释, 确定其所在基因位置及突变类型。

2 结果与分析

2.1 序列比对结果分析

序列比对结果如表 1 所示。由表 1 可知, 36 个样本的比率为 78.26%~98.64%, 平均测序深度为 $8.769 \times \sim 27.817 \times$, 说明样本建库良好; 参考基因组的覆盖度为 89.73%~97.31%, 说明比对情况良好, 可用于下一步群体遗传结构分析。

表 1 序列比对结果统计

样品	比对去重后的 读段数	比对上调基因组的 总读段数	比率/ %	测序深度/ \times	覆盖度/ %
AH-FR-17	65 010 762	62 395 764	95.98	22.066	97.04
AH-FR-1	52 181 990	50 995 079	97.73	18.207	96.47
AH-FR-2	27 019 364	26 320 752	97.41	9.346	95.02
AH-FR-3	34 243 877	32 740 733	95.61	11.647	95.81
AH-FR-4	63 046 400	60 362 293	95.74	21.473	96.74
AH-FR-5	54 203 658	53 346 091	98.42	19.138	90.65
AH-FS-11	74 441 670	72 344 572	97.18	25.766	96.92
AH-FS-12	68 897 297	66 431 577	96.42	23.586	97.14
AH-FS-13	80 261 092	78 325 728	97.59	27.817	97.31
AH-FS-14	73 964 362	64 830 802	87.65	23.004	97.06
AH-FS-1	56 620 637	55 211 440	97.51	19.692	96.77

续表 1

样品	比对去重后的 读段数	比对上调基因组的 总读段数	比对率/ %	测序深度/ ×	覆盖度/ %
AH-FS-3	58 772 540	57 973 416	98.64	20.793	89.73
CQ-FR-1	76 720 593	73 123 323	95.31	26.025	97.20
CQ-FR-2	26 523 585	24 614 692	92.80	8.769	94.97
CQ-FR-3	79 404 019	75 506 780	95.09	26.874	97.01
CQ-FR-4	47 625 696	45 492 028	95.52	16.206	96.64
CQ-FR-5	49 093 580	46 585 791	94.89	16.618	96.44
CQ-FR-6	51 942 815	49 846 210	95.96	17.633	96.38
CQ-FS-1	50 796 795	49 117 655	96.69	17.480	96.55
CQ-FS-2	38 353 985	35 653 092	92.96	12.618	96.19
CQ-FS-3	56 418 351	53 227 469	94.34	18.854	96.55
CQ-FS-4	45 576 826	35 667 903	78.26	12.679	96.04
CQ-FS-5	53 559 538	51 880 708	96.87	18.448	96.56
CQ-FS-6	49 491 730	46 726 580	94.41	16.600	96.62
YN-FR-1	54 920 991	53 469 849	97.36	19.029	91.85
YN-FR-2	69 190 074	67 043 811	96.90	23.923	92.72
YN-FR-3	62 633 817	59 380 102	94.81	21.061	94.54
YN-FR-4	65 412 469	63 314 844	96.79	22.582	92.16
YN-FR-5	40 306 708	37 746 911	93.65	13.415	95.55
YN-FR-6	54 063 197	51 510 311	95.28	18.284	96.35
YN-FS-1	70 248 502	67 962 907	96.75	24.238	94.92
YN-FS-2	43 831 094	41 479 755	94.64	14.745	96.17
YN-FS-3	50 972 104	48 639 968	95.42	17.326	91.95
YN-FS-4	70 618 491	68 151 487	96.51	24.313	92.25
YN-FS-5	58 683 556	57 357 700	97.74	20.512	92.17
YN-FS-6	39 060 558	36 966 126	94.64	13.055	95.40

注: AH-FR: 安徽抗性品系; AH-FS: 安徽敏感品系; CQ-FR: 重庆抗性品系; CQ-FS: 重庆敏感品系; YN-FR: 云南抗性品系; YN-FS: 云南敏感品系。下同。

2.2 *P450* 基因的 SNPs 和 InDels 变异鉴定结果与注释分析

P450 基因的变异数量统计结果如表 2 所示。36 个中华按蚊样本的 *P450* 基因家族共检测到 59 070 个变异位点, 其中 SNPs 数量为 46 952 个, 平均每 kb 区间内鉴定出 0.68 个 SNPs 位点; InDels 数量为 12 118 个, 平均每 kb 区间内鉴定出 0.19 个 InDels 位点。

P450 基因 SNPs 和 InDels 的注释统计结果如表 3 所示。SNPs 被注释到基因间区 (intergenic regions) 的数量为 62 011 个, 内含子区域数量为 45 750 个, 下游区域 SNPs 数量为 11 416 个, 上游区域 SNPs 数量为 11 795 个, 外显子区域 SNPs 数量为 13 971 个, 5' 端非翻译区 (5'UTR) SNPs 数量为 1 085 个, 3' 端非翻译区 (3'UTR) SNPs 数量为 1 478 个, 剪切位点区域 (splicing) SNPs 数量为 25 个。InDels 被注释到基因间区 (intergenic regions) 的数量为 9 238 个, 内含子区域 InDels 数量为 7 487 个, 上游区域 InDels 数量为 1 976 个, 3' 端非翻译区 (3'UTR) InDels 数量为 248 个, 外显子区域 InDels 数量为 224 个, 下游

区域 InDels 数量为 1 831 个, 5' 端非翻译区(5'UTR)InDels 数量为 152 个, 剪切位点区域(splicing)InDels 数量为 13 个。由此可见, 中华按蚊 *P450* 基因的 SNPs 和 InDels 主要分布在基因间区(intergenic regions), 其次是内含子区。

表 2 *P450* 基因的变异数量统计结果

染色体编号	染色体长度/b	SNPs 数量	InDels 数量	每 kb 区间内 SNPs 数量	每 kb 区间内 InDels 数量
Chr3	111881490	15 043	3 369	0.13	0.03
Chr2	98772142	25 233	6 709	0.26	0.07
ChrX	22998972	6 676	2 040	0.29	0.09

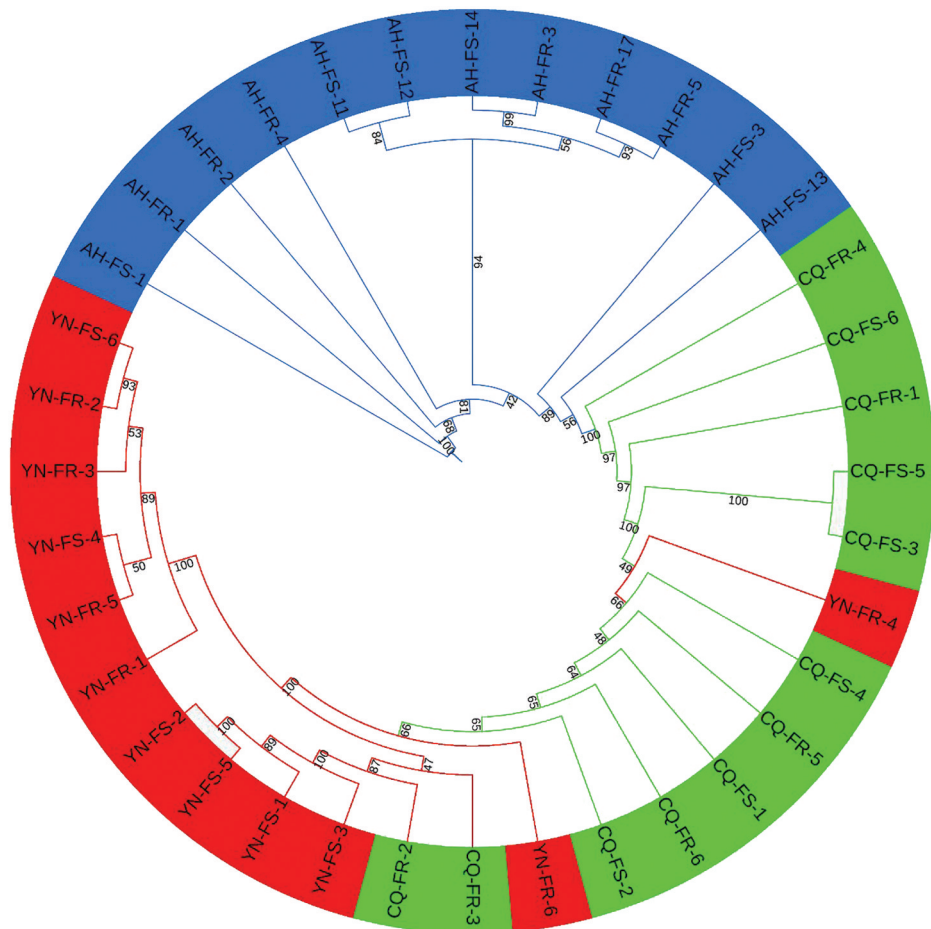
表 3 *P450* 基因的 SNPs 和 InDels 注释统计结果

染色体编号	变异位置	SNPs 数量	InDels 数量	变异总数
Chr3	downstream	6 148	1 033	7 181
Chr3	exonic	7 425	119	7 544
Chr3	intronic	10 694	1 855	12 549
Chr3	upstream	5 956	1 025	6 981
Chr3	intergenic regions	13 564	2 232	15 796
Chr3	UTR5	440	57	497
Chr3	UTR3	840	149	989
Chr3	splicing	13	3	16
Chr2	upstream	4 879	789	5 668
Chr2	UTR5	504	59	563
Chr2	exonic	5 309	81	5 390
Chr2	UTR3	285	39	324
Chr2	downstream	4 017	541	4 558
Chr2	intergenic regions	38 643	5 361	44 004
Chr2	intronic	27 668	4 338	32 006
Chr2	splicing	10	10	20
ChrX	downstream	1 251	257	1 508
ChrX	UTR3	353	60	413
ChrX	intronic	7 388	1 294	8 682
ChrX	exonic	1 237	24	1 261
ChrX	splicing	2	0	2
ChrX	upstream	960	162	1 122
ChrX	intergenic regions	9 804	1 645	11 449
ChrX	UTR5	141	36	177

注: exonic(外显子区域): 变异位于编码基因的外显子区域; intronic(内含子区域): 变异位于编码基因的内含子区域; UTR5(5' 端非翻译区): 变异位于编码基因的 5' 端非翻译区; UTR3(3' 端非翻译区): 变异位于编码基因的 3' 端非翻译区; splicing(剪切位点区域): 变异位于编码基因的剪切位点区域; downstream(下游区域): 变异位于编码基因的下游区域; upstream(上游区域): 变异位于编码基因的上游区域; intergenic regions(基因间区): 变异位于编码基因的基因间区。下同。

2.3 进化树分析结果

基于 *P450*-SNP 的中华按蚊系统进化树分析结果如图 1 所示。36 个中华按蚊样本按照地理种群聚类为 3 组, 种群间的遗传差异和地理区域相对应。安徽 12 个样本中 AH-FS-13、AH-FR-2 自展值较低 (<70%); 而其他样本以较高的自展值聚类 (>80%), 说明这些样本可能来自共同祖先。云南 12 个样本中 YN-FR-5、YN-FR-4、YN-FS-4、YN-FR-3 自展值较低 (<70%); 而其他样本都以较高的自展值聚类 (>80%), 说明这些样本可能来自共同祖先。重庆 12 个样本中 CQ-FR-3、CQ-FS-2、CQ-FR-6、CQ-FS-1、CQ-FR-5、CQ-FS-4 自展值较低 (<70%); 而其他样本都以较高的自展值聚类 (>80%), 说明这些样本可能来自共同祖先。CQ-FS-5 与 CQ-FS-3 以自展值 100% 聚类在一起, 说明它们可能来自共同祖先。CQ-FR-2 和 CQ-FR-3 与重庆种群其他样本显著分离, 表明重庆种群的群内遗传差异较大, 含有不同的祖先来源。



进化分支上的数值代表 bootstrap 值, 默认为百分比; 蓝色代表安徽样本; 红色代表云南样本; 绿色代表重庆样本; AH-FR: 安徽抗性品系; AH-FS: 安徽敏感品系; CQ-FR: 重庆抗性品系; CQ-FS: 重庆敏感品系; YN-FR: 云南抗性品系; YN-FS: 云南敏感品系。下同。

图 1 基于 *P450*-SNP 的中华按蚊进化树分析结果

2.4 主成分分析结果

主成分分析结果如图 2 所示。36 个中华按蚊样本聚类与地理分布基本一致, 其中云南 (YN) 和安徽 (AH) 种群各自形成独立聚类, 而重庆 (CQ) 种群内部个体分散, 表明其遗传多样性较高。此外, 图 2 中

PC1、PC2 和 PC3 分别代表第一、第二和第三主成分, 其后方括号内的百分比 (16.422%、5.991%、4.661%) 为各主成分的方差贡献率, 由 *eigenval.xls* 特征值文件计算得出。由此可知, 主成分分析结果与系统进化树的分析结果一致。

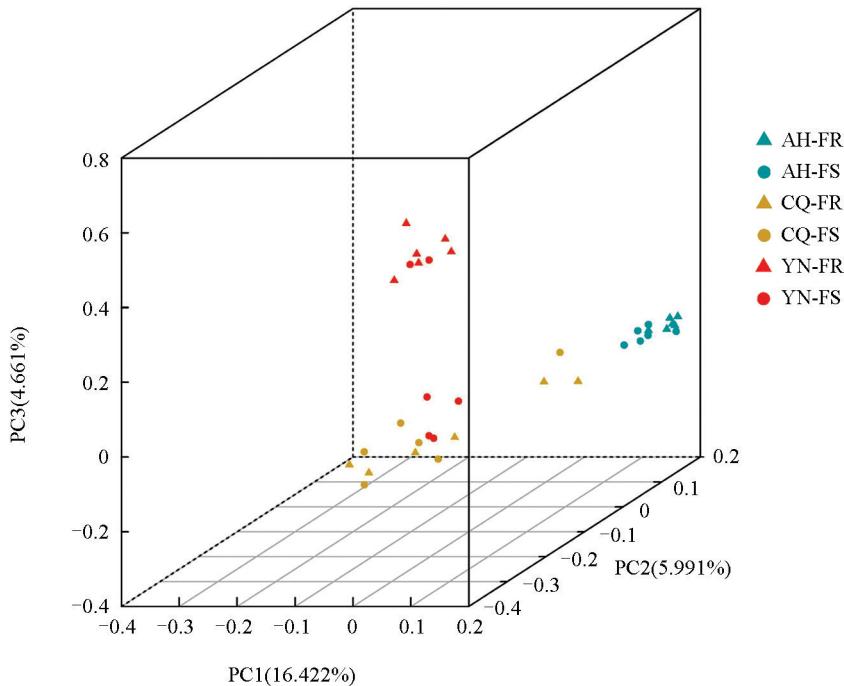


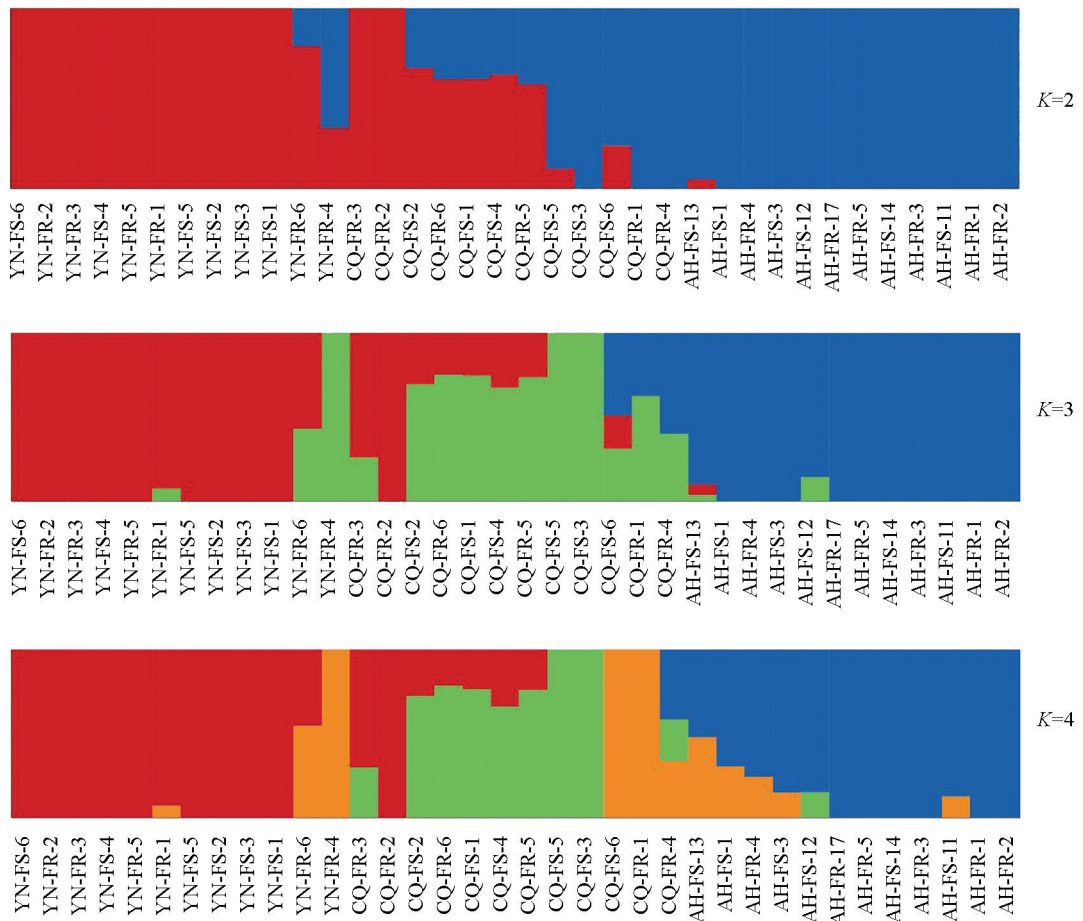
图 2 基于 *P450*-SNP 的中华按蚊主成分分析结果

2.5 群体遗传结构分析结果

群体遗传结构分析结果如图 3 所示。随着设定的祖代群体数 K 从 2 逐步提高至 4, 中华按蚊 36 个样本的群体结构呈现相应的动态变化。当 $K=2$ 时, 36 个中华按蚊可划分为两个群体; 当 $K=3$ 时, 重庆种群个体从云南和安徽种群中分化出来, 36 个中华按蚊样本可划分为 3 个群体; 当 $K=4$ 时, 重庆种群的群内差异较大, 产生了一个亚群。综上, 群体遗传结构分析结果与系统进化树分析和主成分分析结果一致。

2.6 中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关 *P450* 基因的差异 SNPs

中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关的 *P450* 基因在重庆、云南、安徽抗性种群中的差异 SNPs 分别如表 4、表 5、表 6 所示。结合实验室前期研究发现的 3 个 (*CYP9K1*、*CYP6P3v1*、*CYP9J10*) *P450* 基因被 RNAi 干扰后, 降低了中华按蚊对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性。基于此, 本研究重点分析这 3 个基因的遗传变异。*CYP9K1* 基因在重庆、云南、安徽抗性种群中检测到 21 个差异 SNPs 位于基因间区, 1 个同义替换 (L493L) 位于外显子区域。*CYP6P3v1* 基因在云南抗性种群中检测到 1 个同义替换 (L118L) 和 1 个差异 SNPs, 分别位于外显子区域和内含子区域。*CYP9J10* 基因在重庆抗性种群中检测到 1 个非同义替换 (S162N), 位于外显子区域。综上, *CYP6P3v1* 存在外显子区域同义替换 (L118L) 和内含子区域 SNPs; *CYP9J10* 存在外显子区域非同义替换 (S162N); 而 *CYP9K1* 主要存在基因间区 SNPs。此外, 这些基因均属于 *CYP6* 和 *CYP9* 家族成员。



每个直方柱代表一个样本, 红色、蓝色、绿色分别代表一个祖代群体, 橙色代表一个亚群, 直方柱中颜色部分的长短代表祖代群体的遗传贡献; K 为假设的祖代群体数目。

图 3 基于 *P450*-SNP 的中华按蚊群体遗传结构分析结果

表 4 中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关的 *P450* 基因在重庆抗性种群中的差异 SNPs

基因名	变异位置	注释信息	染色体	起始/终止	碱基置换
<i>CYP9J10</i>	exonic	Asin03G5682.1; exon2; c. G485A; p. S162N	Chr3	79816587	G→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=2619), AsinXG1124(dist=16716)	ChrX	16363022	C→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=2622), AsinXG1124(dist=16713)	ChrX	16363025	G→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=3198), AsinXG1124(dist=16137)	ChrX	16363601	A→G
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=4614), AsinXG1124(dist=14721)	ChrX	16365017	G→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=4720), AsinXG1124(dist=14615)	ChrX	16365123	G→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=4856), AsinXG1124(dist=14479)	ChrX	16365259	C→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=4902), AsinXG1124(dist=14433)	ChrX	16365305	G→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=4934), AsinXG1124(dist=14401)	ChrX	16365337	T→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=5239), AsinXG1124(dist=14096)	ChrX	16365642	A→G
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=5386), AsinXG1124(dist=13949)	ChrX	16365789	A→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=5504), AsinXG1124(dist=13831)	ChrX	16365907	A→C

续表 4

基因名	变异位置	注释信息	染色体	起始/终止	碱基置换
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=5627), AsinXG1124(dist=13708)	ChrX	16366030	A→G
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=6813), AsinXG1124(dist=12522)	ChrX	16367216	G→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=7083), AsinXG1124(dist=12252)	ChrX	16367486	C→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=7083), AsinXG1124(dist=12252)	ChrX	16367486	C→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=7257), AsinXG1124(dist=12078)	ChrX	16367660	T→C
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=9280), AsinXG1124(dist=10055)	ChrX	16369683	G→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=9452), AsinXG1124(dist=9883)	ChrX	16369855	T→C

表 5 中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关的 *P450* 基因在云南抗性种群中的差异 SNPs

基因名	变异位置	注释信息	染色体	起始/终止	碱基置换
<i>CYP6P3v1</i>	exonic	Asin03G2512.1: exon1: c. T352C; p. L118L	Chr3	35118399	T→C
<i>CYP6P3v1</i>	intronic	Asin03G2512	Chr3	35121616	G→T
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=11517), AsinXG1124(dist=7818)	ChrX	16371920	G→A
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=11639), AsinXG1124(dist=7696)	ChrX	16372042	G→T
<i>CYP9K1</i>	exonic	AsinXG1124.1: exon2: c. T1477C; p. L493L	ChrX	16382751	T→C

表 6 中华按蚊拟除虫菊酯抗性相关的 *P450* 基因在安徽抗性种群中的差异 SNPs

基因名	变异位置	注释信息	染色体	起始/终止	碱基置换
<i>CYP9K1</i>	intergenic	AsinXG1122(dist=3183), AsinXG1124(dist=16152)	ChrX	16363586	C→T

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究通过全基因组重测序分析发现,中华按蚊 *P450* 基因的 SNPs 和 InDels 主要分布于基因间区,这可能与基因间区在基因组中所占比例较高有关。通过进化树分析、主成分分析、群体遗传结构分析,发现 36 个中华按蚊的聚类关系与其地理分布基本一致。种群间的遗传差异与地理区域相对应,这与以往的研究结果一致,即中华按蚊的遗传距离和地理距离呈正相关,可能存在地理隔离现象^[41]。

本研究首次发现, *CYP6P3v1* 存在外显子区域同义替换(L118L)和内含子区域 SNPs, *CYP9J10* 存在外显子区域非同义替换(S162N),而 *CYP9K1* 主要存在基因间区 SNPs。此外,这些基因均属于 *CYP6* 和 *CYP9* 家族成员,该结果与埃及伊蚊差异 SNPs 检测结果一致^[26]。

Dusfour 等^[42]报道埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)*CYP9J10*、*CYP9J9*、*CYP6BB2*、*CYP6M11* 和 *CYP6N12* 基因的表达与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性相关。Yan 等^[17]通过 RNA-seq 转录组测序和 RT-qPCR 验证发现,中华按蚊 *CYP9K1* 基因在重庆和安徽 2 个地理种群的拟除虫菊酯抗性品系中上调表达;中华按蚊

CYP6P3v1 基因在重庆、云南、安徽 3 个地理种群的拟除虫菊酯抗性品系中均呈现上调表达。已有报道催命按蚊 *CYP9K1* 与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性相关^[43]。中华按蚊的 *CYP6P3v1* 已被证实与拟除虫菊酯类杀虫剂抗性有关^[18]。

以往的研究报道, *P450* 基因的代谢抗性主要是由基因上调表达和解毒酶活性增加所致^[44-45]。蚊虫对拟除虫菊酯的抗性是由解毒酶基因编码区变异产生的^[46]。昆虫 *P450* 基因编码区的遗传变异可导致杀虫剂抗性, 例如埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)抗性品系中的 *CYP6*、*CYP9* 和 *CYP12* 基因家族均存在与抗性相关的突变位点^[47]。非翻译区的突变能调控基因表达, 进而导致杀虫剂抗性^[48]。研究表明, 同义替换 SNP 可通过影响 mRNA 稳定性、翻译效率或剪接过程参与基因表达调控^[49]。内含子区域的突变可能改变内含子的剪切形式, 产生不同的剪切体, 由于这些剪切体稳定性不同, 从而影响基因表达水平^[23]。Amichot 等^[50]在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的双对氯苯基三氯乙烷(DDT)中发现 3 个非同义替换(R335S、L336V、V476L)位于 *CYP6A2* 活性位点附近, 这些突变位点与 DDT 的代谢抗性有关。本研究发现重庆和安徽抗性种群的 *CYP9K1* 仅存在一种变异类型(即基因间区 SNPs); 云南抗性种群的 *CYP6P3v1* 存在两种变异类型(即外显子区域同义替换、内含子区域 SNPs); 重庆抗性种群的 *CYP9J10* 存在一种变异类型(即外显子区域非同义替换)。

本研究外显子区域同义替换(L118L)、内含子区域及基因间区 SNPs 可能正向调控 *CYP6P3v1* 和 *CYP9K1* 的表达, 进而介导拟除虫菊酯抗性; 而外显子区域非同义替换(S162N)可能通过修饰 *CYP9J10* 基因编码的蛋白结构, 增强其解毒酶活性, 进而介导拟除虫菊酯抗性。以上这些 *P450* 基因的遗传变异与拟除虫菊酯杀虫剂抗性的关联性, 还需进一步通过荧光素酶基因报告实验和解毒酶活性代谢实验来验证 SNPs 位点是否参与基因表达调控或者介导解毒酶活性。此外, 本研究可能遗漏低频变异, 后续需进一步扩大野外样本采集数量, 以验证遗传变异的可靠性和发生频率。

3.2 结论

本研究综合进化树分析、主成分分析、群体遗传结构分析结果, 发现 36 个中华按蚊样本的聚类结果与地理分布一致, 不同种群间可能存在地理隔离现象。*CYP9K1*、*CYP6P3v1*、*CYP9J10* 的遗传变异可能介导拟除虫菊酯抗性。上述 *P450* 基因遗传变异与拟除虫菊酯抗性的关联, 仍需通过荧光素酶报告基因实验和解毒酶活性代谢实验进一步验证, 以明确相关 SNPs 能否调控基因表达或影响解毒酶活性。本研究结果为深入解析中华按蚊对拟除虫菊酯的抗性机制, 特别是 *P450* 基因的表达调控与解毒酶活性提供了关键的数据基础。

参考文献:

- [1] 郭小连, 杨坤. 中华按蚊的媒介效能研究进展 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2023, 34(3): 440-446.
- [2] CHANG X L, ZHONG D B, FANG Q, et al. Multiple Resistances and Complex Mechanisms of Anopheles Sinensis Mosquito: A Major Obstacle to Mosquito-Borne Diseases Control and Elimination in China [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2014, 8(5): e2889.
- [3] QIN Q, LI Y J, ZHONG D B, et al. Insecticide Resistance of Anopheles Sinensis and An. Vagus in Hainan Island, a Malaria-Endemic Area of China [J]. Parasites & Vectors, 2014, 7(1): 92-100.

- [4] 陈小宇, 孙树洲, 周国英, 等. 山东省农田土壤中拟除虫菊酯类农药污染特征与风险评价 [J]. 环境化学, 2020, 39(7): 1851-1859.
- [5] SAPANA DEVI M, GUPTA A. Sublethal Toxicity of Commercial Formulations of Deltamethrin and Permethrin on Selected Biochemical Constituents and Enzyme Activities in Liver and Muscle Tissues of *Anabas testudineus* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2014, 115: 48-52.
- [6] DENG J L, GUO Y J, SU X H, et al. Impact of Deltamethrin-Resistance in *Aedes Albopictus* on Its Fitness Cost and Vector Competence [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2021, 15(4): e0009391.
- [7] FANE M, CISSÉ O, TRAORE C S F, et al. *Anopheles gambiae* Resistance to Pyrethroid-Treated Nets in Cotton versus Rice Areas in Mali [J]. Acta Tropica, 2012, 122(1): 1-6.
- [8] 师伟芳, 田珍灶, 周敬祝, 等. 2018—2020 年贵州省中华按蚊抗药性调查研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2023, 41(1): 108-111, 116.
- [9] 贺志权, 胡亚博, 王丹, 等. 河南省部分地区中华按蚊对杀虫剂抗药性的监测 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2023, 41(1): 117-120.
- [10] 曹自有, 田鹏, 戴雨琪, 等. 中缅边境地区中华按蚊杀虫剂抗药性调查研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2024, 35(2): 244-248.
- [11] NAUEN R. Insecticide Resistance in Disease Vectors of Public Health Importance [J]. Pest Management Science, 2007, 63(7): 628-633.
- [12] SCOTT J G, LIU N, WEN Z. Insect Cytochromes *P450*: Diversity, Insecticide Resistance and Tolerance to Plant Toxins [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology, 1998, 121(1/3): 147-155.
- [13] FEYEREISEN R. Evolution of Insect *P450* [J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(6): 1252-1255.
- [14] MATOWO J, JONES C M, KABULA B, et al. Genetic Basis of Pyrethroid Resistance in a Population of *Anopheles Arabiensis*, the Primary Malaria Vector in Lower Moshi, North-Eastern Tanzania [J]. Parasites & Vectors, 2014, 7(1): 274-282.
- [15] LV Y, WANG W J, HONG S C, et al. Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-Susceptible and -Resistant *Culex Pipiens* Pallens by RNA-Seq [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291(1): 309-321.
- [16] GOINDIN D, DELANNAY C, GELASSE A, et al. Levels of Insecticide Resistance to Deltamethrin, Malathion, and Temephos, and Associated Mechanisms in *Aedes Aegypti* Mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin Islands (French West Indies) [J]. Infectious Diseases of Poverty, 2017, 6(1): 38-52.
- [17] YAN Z W, HE Z B, YAN Z T, et al. Genome-Wide and Expression-Profiling Analyses Suggest the Main Cytochrome *P450* Genes Related to Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector, *Anopheles Sinensis* (Diptera Culicidae) [J]. Pest Management Science, 2018, 74(8): 1810-1820.
- [18] GUO Y G, SI F L, HAN B Z, et al. Identification and Functional Validation of *P450* Genes Associated with Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles sinensis* (Diptera Culicidae) [J]. Acta Tropica, 2024, 260: 107413-107421.
- [19] FEYEREISEN R, DERMAUW W, VAN LEEUWEN T. Genotype to Phenotype, the Molecular and Physiological Dimensions of Resistance in Arthropods [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2015, 121: 61-77.
- [20] LIU N N, LI M, GONG Y H, et al. Cytochrome *P450*s-Their Expression, Regulation, and Role in Insecticide Resist-

- ance [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015, 120: 77-81.
- [21] HEMINGWAY J, RANSON H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease [J]. *Annual Review of Entomology*, 2000, 45: 371-391.
- [22] HEMINGWAY J, HAWKES N J, MCCARROLL L, et al. The Molecular Basis of Insecticide Resistance in Mosquitoes [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(7): 653-665.
- [23] LI X C, SCHULER M A, BERENBAUM M R. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics [J]. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52: 231-253.
- [24] ZHU Y C, SNODGRASS G L. Cytochrome *P450* CYP6X1 cDNAs and mRNA Expression Levels in Three Strains of the Tarnished Plant Bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae) Having Different Susceptibilities to Pyrethroid Insecticide [J]. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12(1): 39-49.
- [25] ZIMMER C T, GARROOD W T, SINGH K S, et al. Neofunctionalization of Duplicated *P450* Genes Drives the Evolution of Insecticide Resistance in the Brown Planthopper [J]. *Current Biology*, 2018, 28(2): 268-274.
- [26] FAUCON F, DUSFOUR I, GAUDE T, et al. Identifying Genomic Changes Associated with Insecticide Resistance in the Dengue Mosquito *Aedes Aegypti* by Deep Targeted Sequencing [J]. *Genome Research*, 2015, 25(9): 1347-1359.
- [27] FFRENCH-CONSTANT R H, DABORN P J, LE GOFF G. The Genetics and Genomics of Insecticide Resistance [J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20(3): 163-170.
- [28] JOSHI D, PARK M H, SAEUNG A, et al. Multiplex Assay to Identify Korean Vectors of Malaria [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(4): 748-750.
- [29] 中华人民共和国卫生部. 蚊虫抗药性检测方法生物测定法: GB/T 26347-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [30] CHEN B, ZHANG Y J, HE Z B, et al. De Novo Transcriptome Sequencing and Sequence Analysis of the Malaria Vector *Anopheles Sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7: 314-325.
- [31] ZHANG Y J, LAN Y, CHEN B. ASDB: A Comprehensive Omics Database for *Anopheles sinensis* [J]. *Genomics*, 2021, 113(3): 976-982.
- [32] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884-890.
- [33] LI H, DURBIN R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [34] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [35] LI H. A Statistical Framework for SNP Calling, Mutation Discovery, Association Mapping and Population Genetical Parameter Estimation from Sequencing Data [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2987-2993.
- [36] WANG K, LI M Y, HAKONARSON H. ANNOVAR: Functional Annotation of Genetic Variants from High-Throughput Sequencing Data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): e164.
- [37] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce Framework for Analyzing Next-Generation DNA Sequencing Data [J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [38] 徐清腾, 吴昊天, 江丽华, 陆颖. 水产群体基因组重测序数据分析软件包的开发 [J]. *水产学报*, 2023, 47(6): 19-31.
- [39] YANG J, LEE S H, GODDARD M E, et al. GCTA: A Tool for Genome-Wide Complex Trait Analysis [J]. *The*

American Journal of Human Genetics, 2011, 88(1): 76-82.

- [40] ALEXANDER D H, NOVEMBRE J, LANGE K. Fast Model-Based Estimation of Ancestry in Unrelated Individuals [J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1655-1664.
- [41] 常雪莲. 中华按蚊抗药性及种群遗传研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2014.
- [42] DUSFOUR I, ZORRILLA P, GUIDEZ A, et al. Deltamethrin Resistance Mechanisms in Aedes Aegypti Populations from Three French Overseas Territories Worldwide [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(11): e0004226.
- [43] RIVERON J M, IBRAHIM S S, CHANDA E, et al. The Highly Polymorphic CYP6M7 Cytochrome *P450* Gene Partners with the Directionally Selected CYP6P9a and CYP6P9b Genes to Expand the Pyrethroid Resistance Front in the Malaria Vector Anopheles Funestus in Africa [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 817.
- [44] JOUÛEN N, AGNOLET S, LORENZ S, et al. Resistance of Australian Helicoverpa Armigera to Fenvalerate Is Due to the Chimeric *P450* Enzyme CYP337B3 [J]. PNAS, 2012, 109(38): 15206-15211.
- [45] IBRAHIM S S, RIVERON J M, BIBBY J, et al. Allelic Variation of Cytochrome *P450*s Drives Resistance to Bednet Insecticides in a Major Malaria Vector [J]. PLoS Genetics, 2015, 11(10): e1005618.
- [46] LIU N N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions [J]. Annual Review of Entomology, 2015, 60: 537-559.
- [47] DAVID J P, FAUCON F, CHANDOR-PROUST A, et al. Comparative Analysis of Response to Selection with Three Insecticides in the Dengue Mosquito Aedes Aegyptiusing mRNA Sequencing [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 174.
- [48] BARRETT L W, FLETCHER S, WILTON S D. Regulation of Eukaryotic Gene Expression by the Untranslated Gene Regions and Other Non-Coding Elements [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(21): 3613-3634.
- [49] WANG D X, JOHNSON A D, PAPP A C, et al. Multidrug Resistance Polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) Variant 3435C>T Affects mRNA Stability [J]. Pharmacogenetics and Genomics, 2005, 15(10): 693-704.
- [50] AMICHOT M, TARÈS S, BRUN-BARALE A, et al. Point Mutations Associated with Insecticide Resistance in the Drosophila Cytochrome *P450* Cyp6a2 Enable DDT Metabolism [J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(7): 1250-1257.

责任编辑 夏娟

崔玉洁