

林姮蓓, 韦加奇, 王佳丽, 等. 1 种鉴别草地贪夜蛾性别的分子标记引物的开发 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(4): 70-74.
LIN Jinbei, WEI Jiaqi, WANG Jiali, et al. Development of a molecular marker for sex identification of *Spodoptera frugiperda*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 70-74.

1 种鉴别草地贪夜蛾性别的分子标记引物的开发

林姮蓓, 韦加奇, 王佳丽, 朱 剑, 李 茂, 徐汉虹, 林 菲

(华南农业大学 植物保护学院/天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】开发用于草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 性别鉴定的分子标记引物。【方法】依据草地贪夜蛾雌、雄性信息素结合蛋白 (Pheromone-binding protein, PBP) 基因片段序列的差异设计特异性性别鉴定引物; 利用引物对经过形态学鉴定的草地贪夜蛾雌、雄样本进行 PCR 验证。【结果】2 对引物分别对对应的雌、雄虫样本均扩增出 450 bp 左右的特异性条带。【结论】开发的分子标记引物可以快速有效地对各个时期的草地贪夜蛾进行性别鉴定, 为研究草地贪夜蛾雌、雄个体差异提供一种有效工具。为制定基于性别鉴定的草地贪夜蛾的有效治理防控策略提供参考。

关键词: 草地贪夜蛾; 性信息素结合蛋白; 性别鉴定; 分子标记引物

中图分类号: S511; S502

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)04-0070-05

Development of a molecular marker for sex identification of *Spodoptera frugiperda*

LIN Jinbei, WEI Jiaqi, WANG Jiali, ZHU Jian, LI Mao, XU Hanhong, LIN Fei

(College of Plant Protection, South China Agricultural University/Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To develop molecular marker primers for sexual identification of *Spodoptera frugiperda*. 【Method】Based on the difference in pheromone-binding protein (PBP) gene sequences of male and female *S. frugiperda*, the primers were designed for distinguishing sexual distinction specifically. Using the primers, the male and female *S. frugiperda* samples already identified by morphology were further verified by PCR. 【Result】Specific bands of about 450 bp for the corresponding female and male samples were amplified by two pairs of primers respectively. 【Conclusion】The molecular marker primers can be used to discriminate the sex of *S. frugiperda* in various developmental stages efficiently, and provide an effective tool for the study of the individual distinction between different sexual insects. This study provide a reference for formulating the strategy to control *S. frugiperda* effectively based on sexual distinction.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; pheromone-binding protein; sex identification; molecular marker primer

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 为鳞翅目夜蛾科灰翅夜蛾属, 该虫源自北美, 2019 年 1 月入侵我国云南省, 并迅速扩展到全国 26 个省份^[1-3]。作为联合国粮农组织全球预警的跨国界迁飞性重大害

收稿日期: 2020-12-29 网络首发时间: 2021-06-02 08:50:43

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20210601.1115.002.html>

作者简介: 林姮蓓 (1997—), 女, 硕士研究生, E-mail: 3463797385@qq.com; 通信作者: 徐汉虹 (1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: hxxu@scau.edu.cn; 林 菲 (1977—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: resistanc@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B02022400)

虫, 草地贪夜蛾具有寄主范围宽、适生区域广、增殖能力强、扩散速度快、突发危害重等特点^[4-5]。

与其他鳞翅目昆虫一样, 草地贪夜蛾主要在幼虫时期为害。目前草地贪夜蛾雌、雄幼虫为害行为性别差异的研究较少, 因为缺乏幼虫性别鉴定的快速简便的手段。与许多鳞翅目昆虫一样, 草地贪夜蛾在蛹和成虫时期不再取食, 因此幼虫时期的取食量对其化蛹、羽化、产卵、迁飞等行为具有重要影响, 不同性别的幼虫取食量存在差异。林玉英等^[5]对椰子织蛾 *Opisina arenosella* 1 龄幼虫取食量的研究表明, 雌虫取食量显著大于雄虫, 结合幼虫取食量可作为其龄期的判断依据之一, 从而为制定椰子织蛾防控措施奠定基础; 同时, 大量研究表明, 昆虫幼虫在抵抗高温、抗核型多角体病毒等方面有性别差异^[6-8], 成虫在感光、触角结构等方面也存在显著的性别差异^[9], 昆虫在取食、感光、抗病等行为上的性别差异研究, 可为农业害虫的精准防控提供理论支持。因此, 性别鉴定可以作为研究昆虫雌、雄行为差异的一种便捷有效的工具, 有助于制定更加精准高效的农业害虫防控治理策略。

目前, 草地贪夜蛾的性别主要是通过蛹期和成虫时期的外露生殖器及翅上的斑纹差异进行区分^[10-11]。草地贪夜蛾入侵中国后, 性信息素诱捕、高空灯诱捕在虫情预测预报中发挥了非常重要的作用。由于缺乏对幼虫形态学有效的判断标准, 而田间捕捉的草地贪夜蛾成虫非常活跃, 鳞羽容易掉落, 给性别鉴定造成了困难, 影响了测报结果的准确性。对于鳞羽掉落的草地贪夜蛾样本和未经过性别鉴定的 DNA 样本, 也缺乏有效的性别鉴定手段。因此, 根据雌、雄虫性信息素结合蛋白 (Pheromone-binding

protein, PBP) 基因的序列差异, 开发简便、准确的功能性分子标记, 对鉴定幼虫期乃至成虫期的草地贪夜蛾的性别具有理论和实际应用意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

草地贪夜蛾为实验室饲养种群, 饲养条件参考王世英等^[12]方法, 温度为 (26.0±0.5) °C; 相对湿度为 65%±5%; 光周期为 16 h 光:8 h 暗。

1.2 试验方法

1.2.1 草地贪夜蛾雌、雄虫分子标记引物的设计
通过在线网站 (<https://pfam.xfam.org>) 寻找并下载 PBP 隐马尔科夫模型, 使用 Bio-Linux 软件进行生物信息学分析得到草地贪夜蛾 PBP 基因家族的氨基酸序列, 通过在线网站 (<http://www.omicsclass.com/article/681>) 手动确认每个蛋白的结构域, 总共筛选得到 21 个 PBP, 使用 Bio-Linux 软件进行生物信息学分析获得对应蛋白的 CDS 序列等相关信息, 所得序列与 NCBI 上已发表的 PBP 基因序列进行比对, 比对结果为本研究的 PBP 基因的 CDS 序列与已发表的 4 个 PBP 基因 (*SfruPBP1*、*SfruPBP2*、*SfruPBP3*、*SfruPBP4*)^[13] 的 CDS 序列不存在相似性 (结果未显示)。对获得的各基因片段进行 PCR 测序, 结果发现 *Sf-10911* 基因序列在雌、雄个体中存在较大差异。通过多个已知雌、雄样本检测后, 确认该基因为性别差异基因, 针对草地贪夜蛾雌、雄虫 *Sf-10911* 基因的差异区段设计了 3 对引物 (表 1), 开发雌、雄性别鉴定的特异标记, 引物设计见图 1。利用设计合成的引物, 对鉴别过已知性别的草地贪夜蛾虫蛹样本进行 PCR 扩增, 筛选得到分子标记。

表 1 引物序列表
Table 1 List of primer sequence

引物名称 ¹⁾ Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
Sf-F	TAGCCGTGAGTTTGAATAGGGT
Sf-female-R-1	CCTGCCAGTGCCTTATTAATTAA
Sf-male-R-1	TTTTGGCAGTGCCTTATTGATTA
Sf-female-R-2	CTCAGAGGTTTTTGATATGGTTT
Sf-male-R-2	TGTATTCTTCTCAGTGCGAAGAC
Sf-female-R-3	TTAACAACGCTCCATAATAACCT
Sf-male-R-3	TAAGAACCAGTTCTTATAAACAC

1) F、R 分别表示正、反向引物
1) F and R respectively represents forward and reverse primers

1.2.2 草地贪夜蛾蛹期 DNA 提取及 PCR 扩增
根据草地贪夜蛾蛹期雌、雄虫形态差异区分出雌、雄后 (图 2), 利用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒进

行 DNA 的提取。采用雌、雄特异性引物对提取的 DNA 样本进行 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选分子标记。PCR 扩增的体系为:

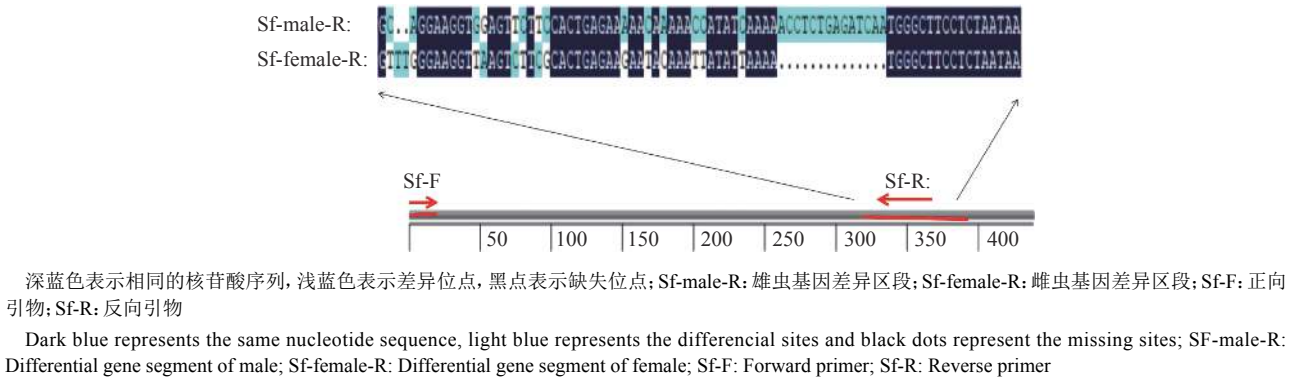


图 1 草地贪夜蛾性别鉴定引物设计

Fig. 1 Primers design for sexual identification of *Spodoptera frugiperda*

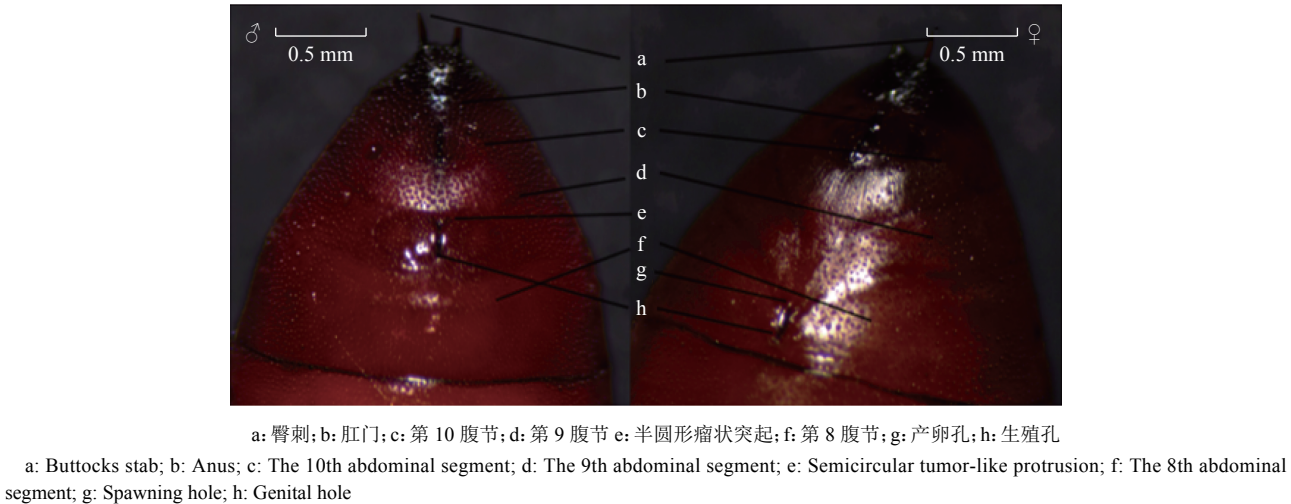


图 2 草地贪夜蛾蛹期雌、雄虫腹部末端差异对比

Fig. 2 Distinction between abdomen ends of male and female of *Spodoptera frugiperda* at pupal stage

PrimerSTAR Max 6.25 μL, 上游和下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 15 μL. PCR 扩增的反应程序为: 98 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。

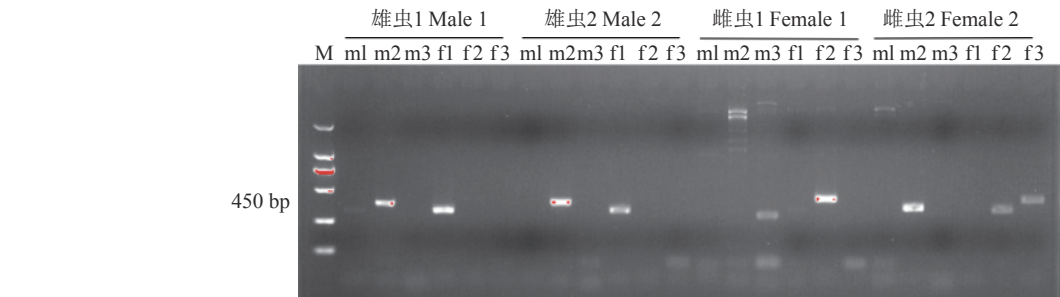
2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾性别鉴定引物的开发及筛选

针对草地贪夜蛾雌、雄虫 *Sf-10911* 基因的性别

差异区段设计了 3 对引物, 开发性别鉴定的特异标记。利用设计合成的 3 对引物, 对已知性别的草地贪夜蛾样本进行 PCR 扩增, 筛选得到分子标记, 该分子标记可以扩增出 450 bp 左右的条带。之后, 利用筛选出的分子标记对经过形态鉴定的雌、雄虫样本再次进行 PCR 扩增。

首先, 利用 3 对标记引物扩增草地贪夜蛾的雌、雄虫 DNA 样本, 所用样本为经过测序鉴定的雌、雄虫 DNA 样本; 图 3 表明, 引物 Sf-female-R-1、



M: 2000 DNA marker; m1: Sf-F/ Sf-male-R-1; m2: Sf-F/Sf-male-R-2; m3: Sf-F/Sf-male-R-3; f1: Sf-F/Sf-female-R-1; f2: Sf-F/Sf-female-R-2; f3: Sf-F/Sf-female-R-3

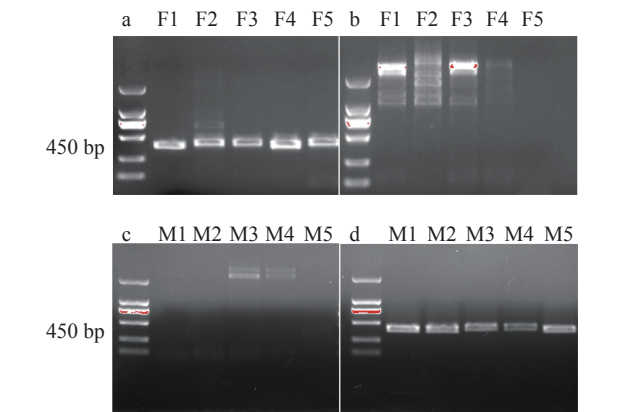
图 3 3 对引物对草地贪夜蛾雌、雄虫样本的扩增

Fig. 3 Amplification of different sexual samples of *Spodoptera frugiperda* by three pairs of primers

Sf-male-R-3 搭配 Sf-F 均不能扩增出特异条带; 搭配引物 Sf-F 扩增时, 其中雄性样本可以用雄性特异性引物 Sf-male-R-2 扩增得到特异条带, 而雌性样本只有雌性特异性引物 Sf-female-R-2 可以扩增得到特异条带, 与测序结果一致。因此, 选择 Sf-female-R-2 和 Sf-male-R-2 作为草地贪夜蛾雌、雄虫特异性引物。

2.2 性别分子标记引物对草地贪夜蛾的鉴定

为进一步验证筛选出的标记引物的准确性, 对经过形态鉴定的雌、雄虫蛹进行 PCR 检测 (图 4)。从图 4 可以看出, 利用雌虫标记引物 Sf-female-R-2 扩增雌、雄虫 DNA 样本时, 只有雌虫才能扩增出 450 bp 左右的特异性条带; 用雄虫标记引物 Sf-male-R-2 扩增雌、雄虫 DNA 样本时, 只有雄虫才能扩增出 450 bp 左右的特异性条带。检测结果与形态鉴定结果一致, 说明筛选出的引物适用于草地贪夜蛾的性别鉴定。



F1~F5: 雌虫蛹 DNA; M1~M5: 雄虫蛹 DNA; a, c: 雌虫标记引物对 Sf-F/Sf-female-R-2; b, d: 雄虫标记引物对 Sf-F/Sf-male-R-2
F1~F5: DNA of female pupae; M1~M5: DNA of male pupae; a and c: Pair of female marker primers of Sf-F/Sf-female-R-2; b and d: Pair of male marker primers of Sf-F/Sf-male-R-2

图 4 基于 PCR 扩增对草地贪夜蛾雌、雄虫蛹性别鉴定
Fig. 4 Sex identification of male and female pupae of *Spodoptera frugiperda* based on PCR amplification

3 讨论与结论

农业害虫的性别鉴定对于害虫的有效防治和农业生产具有重要意义。不同性别的昆虫在虫体形态上往往存在差异, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner、桉袋蛾 *Acanthopsyche subferalbata* Hampson 以及凤凰木夜蛾 *Pericyma cruegri* 在其蛹及成虫时期的形态存在明显的性别差异^[14-16], 利用这种形态上的差异, 研究人员可以快速简便地鉴定雌、雄虫, 及时为田间种群动态的监测和预测预报提供数据。

利用雌、雄虫形态差异鉴定性别的方法虽然简

单快捷, 但却无法对一些不存在性别形态差异或是生长发育早期无形态差异的昆虫进行鉴定。牛宝龙等^[17]以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 雌、雄虫基因组 DNA 为模板, 筛选了 1 条雌特异随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD), 根据该特异性分子标记的核苷酸序列设计雌性特异引物, 并对棉铃虫基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 雌性棉铃虫可以扩增出目的条带, 可将此标记用于棉铃虫幼虫乃至胚胎的性别鉴定; 王慧超等^[18]也早在 2004 年运用 RADP 技术对家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 上得到的雌特异性片段设计引物并进行了 PCR 验证。此外, 张利娜^[19]从外部形态学、血清生化指标建立了鳗鲡 *Anguilla japonica* 的性别判定函数, 用 SRAP 分子标记获得 F5R2 雌性特异 DNA 序列, 根据测序结果设计序列特定扩增区域 (Sequence characterized amplified regions, SCAR) 特异引物并进行性别鉴定; Masaru 等^[20]用日本青鳉 *Oryzias latipes* 的雄性 Y 特异性 DM 结构域基因开发引物鉴定了弓背青鳉 *Oryzias curvinotus* 的遗传性别; 中国大鲵 *Andrias davidianus*、双须骨舌鱼 *Osteoglossum bicirrhosum* 的性别鉴定也利用雌、雄虫基因差异序列开发分子标记引物并进行了有效的验证^[21-22]。

PBP 在草地贪夜蛾的信息素识别过程中发挥着重要作用, 雄虫通过触角感受雌虫性腺释放的性信息素, 寻找合适的交配对象。PBP 的功能特征决定了其基因序列以及表达模式在雌、雄虫之间必然存在差异, 具有明显的性二型性^[23]。牛小慧^[24]对甜菜夜蛾的不同 PBP 进行 RT-PCR 检测发现, PBP 在雌、雄虫之间的表达量存在显著差异; 刘苏等^[13]通过对草地贪夜蛾 4 个 PBP 基因的克隆及表达模式分析发现, 定位于成虫触角上的 SfruPBP1 和 SfruPBP2 蛋白在雄虫中具有更高的表达量。本研究发现草地贪夜蛾雌、雄虫中的 PBP 基因 *Sf-10911* 存在核苷酸序列差异, 进而根据该差异设计了针对雌、雄虫扩增的引物对, 通过琼脂糖凝胶电泳检测出 450 bp 左右的特异条带, 作为其性别鉴定的分子标记, 以期为研究草地贪夜蛾某些性状可能存在的性别差异提供快速有效的手段。

参考文献:

[1] TODD E L, POOLE R W. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1980, 73(6): 722-738.
[2] 姜玉英, 刘杰, 吴秋琳, 等. 我国草地贪夜蛾冬繁区和越冬区调查[J]. 植物保护, 2021, 47(1): 212-217.

[3] UZAYISENGA B, WAWERU B, KAJUGA J, et al. First record of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), in Rwanda[J]. *African Entomology*, 2018, 26(1): 244-246.

[4] 王磊, 陈科伟, 钟国华, 等. 重大入侵害虫草地贪夜蛾发生危害、防控研究进展及防控策略探讨[J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41(3): 479-487.

[5] 林玉英, 金涛, 金启安, 等. 椰子织蛾幼虫龄数及取食量的雌雄差异[J]. *环境昆虫学报*, 2017, 39(4): 912-918.

[6] 覃吕高. 家蚕抗核型多角体病毒相关蛋白及雌雄差异蛋白质组学分析[D]. 镇江: 江苏大学, 2012.

[7] 王华, 方妍, 王立鹏, 等. 高温对家蚕雌雄脂肪体基因表达差异的 Digital gene expression(DGE) 分析[C]//中国蚕学会、国家蚕桑产业技术体系. 第十二届家(柞)蚕遗传育种暨良种繁育学术研讨会论文集(摘要汇编). 中国蚕学会、国家蚕桑产业技术体系: 中国蚕学会, 2016: 41.

[8] 李爽. 雌雄意大利蝗耐高温差异及其生理生化响应对策研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2016.

[9] 刘振兴. 粘虫和棉铃虫趋光行为、复眼结构及光受体基因差异研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.

[10] 董前进, 周金成, 朱凯辉, 等. 一种快速鉴别草地贪夜蛾蛹及成虫雌雄的简易方法[J]. *植物保护*, 2019, 45(5): 96-98.

[11] 冯波, 郭前爽, 王浩杰, 等. 草地贪夜蛾的准确鉴定[J]. *应用昆虫学报*, 2020, 57(4): 877-888.

[12] 王世英, 朱启旋, 谭煜婷, 等. 草地贪夜蛾室内人工饲料群体饲养技术[J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41(4): 742-747.

[13] 刘苏, 蒋兴川, 蒋秀云, 等. 草地贪夜蛾 4 个性信息素结合蛋白基因的克隆及表达模式分析[J]. *环境昆虫学报*, 2020, 42(3): 583-592.

[14] 陆雪雷, 朱诚棋, 秦文权, 等. 凤凰木夜蛾蛹和成虫的雌雄形态鉴定[J]. *中国森林病虫*, 2017, 36(4): 34-36.

[15] 赵晓峰, 杨安嶂, 张茂新, 等. 一种快速鉴别甜菜夜蛾蛹及成虫雌雄的简易方法[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(5): 1066-1070.

[16] 张媛媛, 沈婧, 孙朝辉, 等. 桉袋蛾蛹和成虫的雌雄形态鉴定[J]. *河北林业科技*, 2016(3): 8-9.

[17] 牛宝龙, 翁宏飏, 孟智启, 等. 棉铃虫雌性特异性分子标记的筛选及棉铃虫幼虫的性别快速鉴定[C]//浙江省人事厅、浙江省科协、浙江省蚕桑学会. “家蚕生理、病理和生物技术”学术研讨会论文选集. 浙江省人事厅、浙江省科协、浙江省蚕桑学会: 浙江省科学技术协会, 2006: 3.

[18] 王慧超, 朱勇. 家蚕雌特分子标记筛选、克隆及其序列分析[J]. *蚕业科学*, 2004(1): 34-37.

[19] 张利娜. 长江口降海鳗鲡雌雄判别方法及雌性特异 SCAR 标记的建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.

[20] MASARU M, TADASHI S, YOTA T, et al. *Oryzias curvinotus* has DMY, a gene that is required for male development in the Medaka, *O. latipes*[J]. *Zoolog*, 2003, 20(2): 159-161.

[21] 曲彬. 中国大鲵性别特异性 DNA 标记的鉴定及雌雄性腺差异表达基因的分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.

[22] 田媛. 双须骨舌鱼雌雄鉴别与性腺发育研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.

[23] 田志强, 孙丽娜, 李艳艳, 等. 昆虫性信息素结合蛋白功能研究进展[J]. *农学学报*, 2017, 7(9): 14-20.

[24] 牛小慧. 甜菜夜蛾信息素结合蛋白的表达动态及其受交配和钟基因沉默的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.

【责任编辑 霍 欢】