

草地贪夜蛾卵黄原蛋白基因的分子特征及表达特性



赵 静¹ 邱之雨² 肖留斌^{1*} 谭永安¹ 姜义平¹ 柏立新¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为解析草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 生殖调控的分子机制, 利用反转录-聚合酶链式扩增 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆草地贪夜蛾生殖关键基因卵黄原蛋白 (vitellogenin, Vg) 全长序列, 通过实时荧光定量 PCR 检测其 Vg 基因在不同性别、发育阶段及组织中的表达水平, 并利用体视镜解剖观察不同日龄雌成虫的卵巢发育进度, 分析其与 Vg 基因表达的相关性。结果显示, 草地贪夜蛾 Vg 基因的 cDNA 序列全长为 5 727 bp, 开放阅读框长度为 5 250 bp, 编码 1 749 个氨基酸, 预测编码蛋白的分子量为 199.23 kD, N 端前 15 个氨基酸为信号肽。基于鳞翅目昆虫 Vg 构建的系统发育树显示草地贪夜蛾 Vg 与斜纹夜蛾 *S. litura* 的 Vg 亲缘关系最近。草地贪夜蛾 Vg 基因在雌成虫脂肪体中特异性高表达, 在雄成虫及雌成虫卵巢和表皮等其他组织中微表达; Vg 在幼虫和化蛹初期表达量极低, 从化蛹第 8 天起微弱表达, 进入成虫期后表达量迅速上升, 于羽化第 4 天雌成虫中达到表达峰值, 随后降低。草地贪夜蛾 Vg 在卵巢的乳白透明期和卵黄沉积期上调表达, 在成熟待产期达到峰值, 进入产卵盛期及末期后表达量快速下降, 表明草地贪夜蛾 Vg 在雌成虫期的表达动态与其卵巢发育进度紧密相关。
关键词: 草地贪夜蛾; 卵黄原蛋白; 基因克隆; 时空表达

Molecular and expression characteristics of vitellogenin gene in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*

Zhao Jing¹ Qiu Zhiyu² Xiao Liubin^{1*} Tan Yong'an¹ Jiang Yiping¹ Bai Lixin¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China;
2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Abstract: To analyze the molecular mechanism of reproductive regulation of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, the full-length sequence of *S. frugiperda* vitellogenin (Vg), a key gene for reproduction, was cloned by using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The Vg expression profiles at different genders, tissues and developmental stages of *S. frugiperda* were studied by quantitative real-time PCR (qPCR); the ovaries of female adults at different days after eclosion were dissected by stereoscope to observe ovary development progress, and their correlation with Vg expression were analyzed. The results showed that *S. frugiperda* Vg cDNA sequence was 5 727 bp in length. The open read frame (ORF) of Vg was 5 250 bp, which encoded 1 749 amino acids. The predicted molecular weight of the encoded protein was 199.23 kD, and the first 15 amino acids at the N-terminus were signal peptides. Phylogenetic tree based on Lepidoptera Vgs showed that *S. frugiperda* Vg was closely related to the Vg of *S. litura*. The qPCR results showed that Vg was specifically highly expressed in the fat bodies of female adults and weakly expressed in males and other female

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金(CX(19)2004), 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-15-19), 国家自然科学基金(31901889), 国家重点研发计划(2017YDF0201900)

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

收稿日期: 2020-10-21

adult tissues such as ovaries and epidermis. The *Vg* expression level was extremely low in larval and early pupal stage. *Vg* was weakly expressed from the 8th day of pupae, increased rapidly after entering the adult stage, reached a peak in the four-day-old female adult, and then decreased. The expression level of *Vg* gene increased rapidly at the opalescent transparent stage and yolk deposition stage of *S. frugiperda* ovaries, reached the peak in the egg maturation stage, and decreased rapidly after entering peak phase and terminal phase of oviposition. The results indicated that the expression dynamics of *Vg* in *S. frugiperda* female adults was closely related to ovarian development progress.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; vitellogenin; gene cloning; spatiotemporal expression

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 又称秋黏虫, 属于鳞翅目夜蛾科灰翅夜蛾属, 原产于美洲热带和亚热带地区, 是重大迁飞性害虫 (Early et al., 2018; Harrison et al., 2019)。该虫自 2019 年 1 月入侵我国云南省后, 凭着极强的迁飞能力快速蔓延, 目前已扩散到全国 26 省 (自治区、直辖市), 严重威胁我国玉米等作物的安全生产 (吴孔明, 2020)。该虫除了极强的迁飞能力外, 其生殖力也很强大, 1 年繁殖数代, 雌成虫可多次交配, 单雌产卵量可达千粒 (石旺鹏, 2020)。卵黄发生是昆虫生殖调控的关键, 与昆虫种群数量的消长密切相关 (戈林泉和吴进才, 2010)。因此, 开展草地贪夜蛾卵黄发生的研究可揭示其生殖机制, 为草地贪夜蛾种群测报与防治提供新途径。

卵黄原蛋白 (vitellogenin, *Vg*) 合成是卵黄发生的基础, 是卵子成熟与胚胎发育的关键。作为专门结合和转运如脂质、碳水化合物、金属离子和磷等母体资源供应卵母细胞的磷酸糖脂蛋白, *Vg* 可以为胚胎发育提供营养储备 (戈林泉和吴进才, 2010)。目前, 昆虫 *Vg* 的分子结构、表达特性、功能及调控机制是昆虫生理学的研究热点之一, 已有 7 个目 50 多种昆虫的 *Vg* 基因序列被克隆, 主要集中于鳞翅目 (Dong et al., 2007; Veerana et al., 2014)、双翅目 (Tufail & Takeda, 2009)、膜翅目 (Piulachs et al., 2003) 和半翅目 (梁慧芳等, 2015)。昆虫的 *Vg* 是由 6~7 kb 的 mRNA 编码形成的分子量约为 200 kD 的前体蛋白, 其氨基酸序列通常含有几个比较保守的结构域或氨基酸基序, 如 C 端的半胱氨酸、RXXR 基序和 GL/ICG 基序等 (Tufail & Takeda, 2008)。在大多数昆虫中, 雌成虫脂肪体是 *Vg* 合成的唯一场所, 但在草蛉 *Chrysopa pallens* 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 等少数昆虫中, 在脂肪体以外的组织以及雄成虫中也能合成 *Vg* (Guidugli et al., 2005; 冯彦姣等, 2021)。昆虫 *Vg* 基因的表达具有发育阶段特异性, 不同种类昆虫 *Vg* 的启动及表达高峰期不同, 如斜纹夜蛾 *S. litura* 的 *Vg* 于蛹末期启动表达, 于成虫羽化第 2 天达到高峰 (Shu et al., 2009); 而橘蚜 *Toxoptera citricidus*

的 *Vg* 在幼虫期就开始表达, 在成虫期达到高峰, 且有翅蚜和无翅蚜幼虫期 *Vg* 的表达趋势不同 (Shang et al., 2018)。*Vg* 不仅可为胚胎发育提供营养物质, 在褐飞虱 *Laodelphax striatellus* 和意大利蜜蜂等部分昆虫中被证实发挥着多重非营养功能, 如介导微生物垂直传播、免疫及介导隔代免疫和行为调节等 (Huo et al., 2014; Salmela et al., 2016; 霍岩等, 2018)。

Vg 作为一种重要的生殖蛋白, 是昆虫种群繁衍的关键因子, 但是目前对草地贪夜蛾 *Vg* 的分子特性、功能及调控机制还鲜有报道。本研究利用反转录-聚合酶链式扩增 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术对草地贪夜蛾的 *Vg* 基因进行克隆、测序和生物信息学分析, 同时通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 技术分析 *Vg* 基因在不同性别、组织以及发育阶段的表达情况, 结合卵巢解剖技术明确 *Vg* 基因的表达与不同日龄雌成虫卵巢发育进度的内在联系, 以期研究草地贪夜蛾 *Vg* 基因的调控与功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫: 供试草地贪夜蛾虫源采自云南省保山市, 于江苏省农业科学院植物保护研究所养虫室内用人工饲料对其进行继代培养, 饲养条件为温度 (27±1)℃、相对湿度 (65±5)%、光周期 14 L: 10 D, 成虫期补充 10% 蜂蜜水。

LB (Luria-Bertani) 培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、琼脂 12 g, 蒸馏水定容到 1 L。

试剂和仪器: RNA 提取试剂 Trizol, 美国 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶, 美国 Promega 公司; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、LA *Taq*、TB Green Premix Ex *Taq*TM、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞、克隆载体 pMD19-T 和 DNA Marker, 日本 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒及 DNA 回收试剂盒,

美国 Axygen 公司,其余试剂均为国产分析纯。T100 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;3K15 型离心机,美国 Sigma 公司;SZ61 型体视解剖镜,日本奥林巴斯公司;LightCycler[®] 480 型实时荧光定量 PCR 仪,瑞士 Roche 公司;D30 型紫外可见分光光度计,德国 Eppendorf 公司;DYY-6D 电泳仪,北京六一仪器厂;养虫笼长 30 cm、宽 30 cm、高 50 cm,南京断桥铝门窗公司。

1.2 方法

1.2.1 草地贪夜蛾 *Vg* 基因的克隆

取 3 头羽化 3 d 的草地贪夜蛾雌成虫虫体放入研钵中,加入少量液氮,充分研磨成粉,收集至离心管中加入 1 mL Trizol 试剂,采用 Trizol 法按照说明书提取总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带的完整性,并用紫外可见分光光度计确定 RNA 质量和浓度,当 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.1 之间,表明提取的 RNA 合格。通过 M-MLV 反转录酶将样品总 RNA 反转录合成 cDNA,于 -20℃ 保存备用。

通过 RT-PCR 和 RACE 技术扩增草地贪夜蛾 *Vg* 全长序列。根据草地贪夜蛾转录组数据注释到的候选 *Vg* 部分序列,设计特异性引物 *SFVg*-329F/*SFVg*-1588R、*SFVg*-3165F/*SFVg*-4052R、*SFVg*-1022F/*SFVg*-2482R 和 *SFVg*-3165F/*SFVg*-4052R (表 1) 来扩增 *Vg* 中间片段,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μL 反应体系: cDNA 2 μL、10× LA PCR Buffer (无 Mg^{2+}) 5 μL、 Mg^{2+} 5 μL、10 μmol/L 正反向引物各 1 μL、10 mmol/L dNTPs 4 μL、LA *Taq* 0.5 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。根据测得的 *Vg* 片段中间序列,设计两端引物 *SFVg*-RACE-3876F 和 *SFVg*-RACE-676R (表 1),通过 SMART[™] RACE cD-

NA Amplification Kit 扩增 *Vg* 的 3' 端和 5' 端 cDNA。50 μL PCR 反应体系: 10× Advantage 2 PCR Buffer 5.0 μL、10 mmol/L dNTP Mix 1.0 μL、50× Advantage 2 Polymerase Mix 1.0 μL、PCR-Grade Water 34.5 μL、5' RACE cDNA/3' RACE cDNA 2.5 μL、通用引物 UPM 5.0 μL、特异性引物 1.0 μL。反应程序: 94℃ 变性 10 s, 72℃ 延伸 3 min, 5 个循环; 94℃ 变性 30 s, 70℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 5 个循环; 94℃ 变性 30 s, 68℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 27 个循环。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鉴定,将目标扩增产物切胶并采用 DNA 回收试剂盒回收纯化。通过 pMD19-T 载体与目的片段连接并于 16℃ 过夜,将连接产物转化 DH5α 感受态细胞,涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上,于 37℃ 下培养过夜。通过菌落 PCR 筛选阳性克隆,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,通过序列拼接获得草地贪夜蛾 *Vg* 全长序列。

1.2.2 草地贪夜蛾 *Vg* 序列分析

为验证克隆得到的 *Vg* 序列的可靠性,利用 NCBI 的 BLAST 工具将其与 GenBank 数据库中的其他物种相关序列进行同源性序列比对。采用 DNAMAN 6.0 软件预测蛋白质分子量和等电点,采用 NCBI 的 CCD 在线程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行功能结构域预测,利用 SignalP 4.0 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽序列。使用 Clustal W 程序对鳞翅目夜蛾科昆虫 *Vg* 氨基酸序列进行比对,到目前为止,GenBank 数据库中显示有 18 条鳞翅目 *Vg* 序列。利用 MEGA 5 软件以双翅目昆虫为外群,采用邻接法对 NCBI 登录的所有鳞翅目昆虫 *Vg* 氨基酸序列构建系统进化树,进化树分支下的数值代表进行 1 000 个 bootstrap 重复运算的正确百分比。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
<i>SFVg</i> -329F	AAATCTCGGTTGAAGGAGGTC	基因克隆
<i>SFVg</i> -1588R	CAGGGCTCATAGCAAGGTCA	Molecular cloning
<i>SFVg</i> -3165F	ATTCGGTCAACAAGTCGGC	
<i>SFVg</i> -4052R	TTTCCGTCACCAACCTTCTTA	
<i>SFVg</i> -1022F	ATGAACACCTGAACCACGATG	
<i>SFVg</i> -2482R	TGTGATTGGCGTTGGACTT	
<i>SFVg</i> -2464F	AAGTCCAACGCCAATCACA	
<i>SFVg</i> -3406R	CTTCTTTTCAGTTCTCCGCC	
<i>SFVg</i> -RACE-3876F	GGCGGCTGCTCACAGAATGTTGATTAGG	
<i>SFVg</i> -RACE-676R	CGAAATGGTAAGCGACACGGTGGTGG	
<i>SFVg</i> -281F	CGAAGAACCTCAAATACGAAACTGT	荧光定量 PCR
<i>SFVg</i> -457R	TGGTGCTGGAGTGGGTAGATAA	qPCR
Sactin-F	TGAGACCTTCAACTCCCCCG	
Sactin-R	GCGACCAGCCAAGTCCAGAC	

1.2.3 草地贪夜蛾 *Vg* 的性别及时空表达试验

为明确草地贪夜蛾 *Vg* 在不同性别、组织和发育阶段的表达情况,首先分别收集草地贪夜蛾羽化3 d 的雌雄成虫和1~6龄幼虫、化蛹1~9 d 的雌蛹、羽化1~5、7、9 d 雌成虫脂肪体组织,立即于液氮中冷冻,于-80℃保存备用。在预冷的0.75% NaCl溶液中解剖分离草地贪夜蛾羽化第3天雌成虫的头、足、肌肉、表皮、卵巢、脂肪体组织,并快速转移至预冷EP管中于-80℃保存备用。上述所有材料的总RNA提取方法同1.2.1,并反转录合成cDNA,作为模板备用。

根据草地贪夜蛾 *Vg* 基因中一段保守序列设计qPCR引物(表1),以 *Actin* 为内参基因,采用TB Green为染料的荧光标记法进行qPCR检测。25 μL qPCR反应体系:TB Green® Premix Ex Taq™ II 12.5 μL、上下游引物各0.5 μL、模板cDNA 2 μL、ddH₂O 9 μL。反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性10 s,60℃退火10 s,72℃延伸10 s,40个循环。草地贪夜蛾不同性别、组织及发育时期样品各3个生物学重复和4个技术重复,每个生物学重复取3头试虫。采用2^{-ΔΔCt}法(Livak & Schmittgen, 2001)计算基因的相对表达量。

1.2.4 草地贪夜蛾羽化不同日龄雌成虫卵巢解剖

为明确草地贪夜蛾卵巢发育动态,在体视解剖镜下对羽化1~10 d 的草地贪夜蛾雌成虫进行卵巢解剖,同时将解剖镜连接奥林巴斯DP26相机及Cellsens Dimension软件进行拍照。将同一天羽化

的雌雄成虫以1.0:1.5的比例置于养虫笼饲养,每日以10%蜂蜜水饲喂。每个日龄的雌成虫解剖15头。

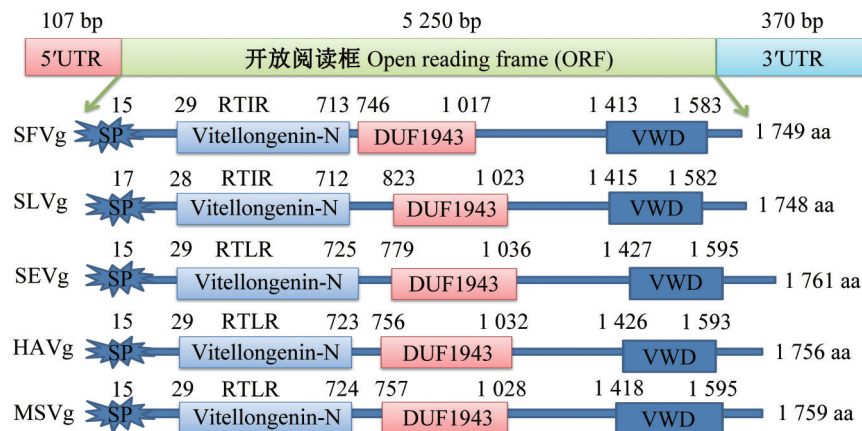
1.3 数据分析

采用SPSS 18.0软件对试验数据进行单因素方差分析,应用Tukey's HSD法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 草地贪夜蛾 *Vg* 基因的克隆及序列分析

本研究克隆获得的草地贪夜蛾 *Vg* 序列全长为5 727 bp, GenBank登录号为MT505383。 *Vg* 基因开放阅读框长度为5 250 bp, 编码1 749个氨基酸。5'端非编码区为107 bp, 3'端非编码区为370 bp。推导分子量为199.23 kD, 理论等电点为8.97。使用NCBI保守域搜索,在草地贪夜蛾 *Vg* 序列中存在3个相对保守的功能域,分别是Vitellogenin-N(29~713 aa)、DUF1943(746~1 017 aa)和Von Willebrand factor type D domain(VWD)(1 413~1 583 aa)(图1)。与鳞翅目夜蛾科其他昆虫 *Vg* 结构类似,草地贪夜蛾 *Vg* 的N端为含15个氨基酸的信号肽。鳞翅目夜蛾科保守的RXXR切割序列位于离氨基较近的草地贪夜蛾 *Vg* 的N端(521~524 aa)。草地贪夜蛾 *Vg* 在RTIR裂解点产生2个蛋白,分子量大小分别为57.03 kD和141.69 kD。通过比对鳞翅目夜蛾科 *Vg* 的3'端氨基酸序列发现存在DGXR和GICG保守区域及5个半胱氨酸残基(图2)。



SFVg: 草地贪夜蛾 *Vg* (MT505383); SLVg: 斜纹夜蛾 *Vg* (ABU6846.1); SEVg: 甜菜夜蛾 *Vg* (AQH73254.1); HAVg: 棉铃虫 *Vg* (AGL08685.1); MSVg: 东方黏虫 *Vg* (AHG29547.1)。SFVg: The *Vg* from *Spodoptera frugiperda* (MT505383); SLVg: the *Vg* from *S. litura* (ABU6846.1); SEVg: the *Vg* from *S. exigua* (AQH73254.1); HAVg: the *Vg* from *Helicoverpa armigera* (AGL08685.1); MSVg: the *Vg* from *Mythimna separata* (AHG29547.1)。

图1 鳞翅目夜蛾科昆虫的卵黄原蛋白结构比较

Fig. 1 Comparison of insect vitellogenins' structure in Noctuidae, Lepidoptera

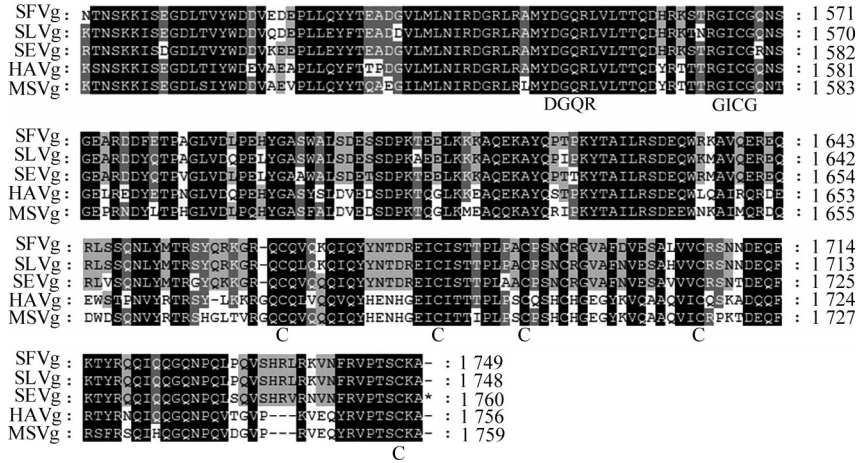
2.2 鳞翅目 *Vg* 系统发育分析

通过NCBI搜索比对,草地贪夜蛾的 *Vg* 氨基酸序列与斜纹夜蛾的 *Vg* 氨基酸序列相似度最高,为

91.48%,其次是与甜菜夜蛾 *S. exigua* (88.53%) 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (71.14%) 的 *Vg* 氨基酸序列相似度较高。系统发育树显示鳞翅目6个科的单

系性得到较高的支持率,大蚕蛾科与蚕蛾科、螟蛾科与草螟科分别聚为一个小分支后,又聚集在一个大分支上,两组间的亲缘关系较裳蛾科与夜蛾科所聚

集的分支更近。在夜蛾科中,草地贪夜蛾和斜纹夜蛾亲缘关系最近,以较高的支持率(97.00%)聚在一起(图3)。



SFVg: 草地贪夜蛾 Vg; SLVg: 斜纹夜蛾 Vg; SEVg: 甜菜夜蛾 Vg; HaVg: 棉铃虫 Vg; MSVg: 东方黏虫 Vg。DGXR 和 GICG 为保守区域; 黑色和灰色阴影分别为一致和保守的氨基酸序列; C 为半胱氨酸残基。SFVg: The Vg from *S. frugiperda*; SLVg: the Vg from *S. litura*; SEVg: the Vg from *S. exigua*; HaVg: the Vg from *Helicoverpa armigera*; MSVg: the Vg from *Mythimna separata*. DGXR and GICG are conserved regions; identical residues are in black shade while conservative residues are in grey shade; C is cysteine residue.

图2 草地贪夜蛾与其他鳞翅目夜蛾科昆虫的卵黄原蛋白部分氨基酸序列对比

Fig. 2 Alignment of partial amino acid sequence of *Spodoptera frugiperda* Vg with other insect Vg sequences in Noctuidae, Lepidoptera

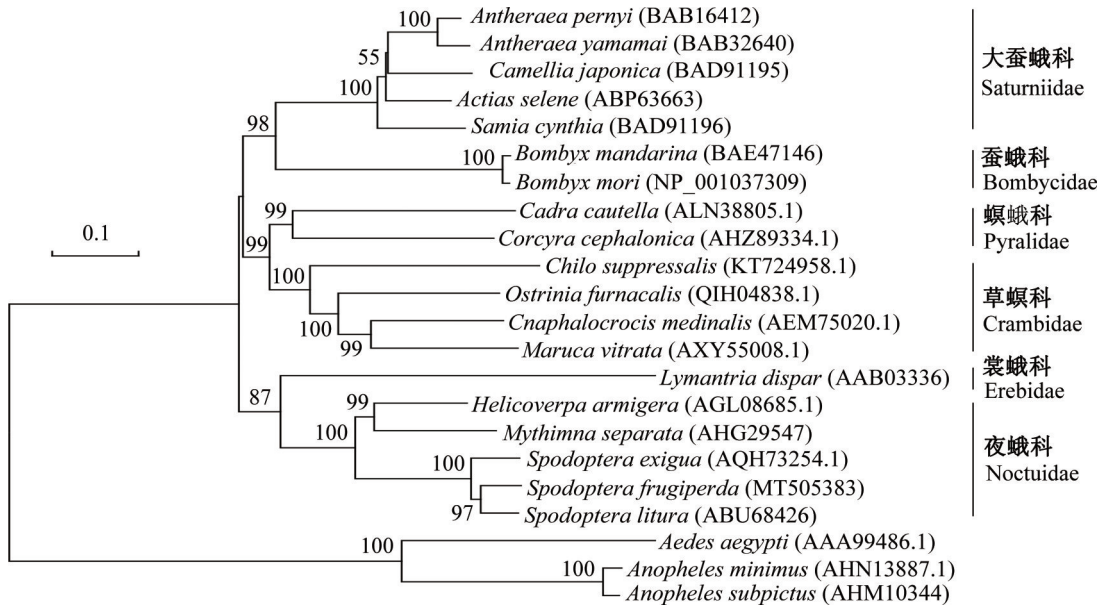


图3 基于卵黄原蛋白基因序列以邻接法构建草地贪夜蛾及其他鳞翅目昆虫的系统发育树

Fig. 3 A phylogenetic tree constructed based on Vg gene sequences of *Spodoptera frugiperda* and other lepidopteran insects by using neighbor-joining method

2.3 草地贪夜蛾 Vg 基因的表达特性分析

草地贪夜蛾 Vg 基因在雌成虫中特异性高表达,为雄成虫中表达量的 1 060 倍($P < 0.05$, 图 4-A)。Vg 基因在雌成虫不同组织中均有表达,但表达水平不一,相比其在头、足、肌肉、表皮和卵巢中的表达量, Vg 基因在脂肪体中显著高表达($P < 0.05$), Vg 基因在

雌成虫脂肪体中的表达量为卵巢中表达量的 60.5 倍,是表皮中表达量的 199.1 倍($P < 0.05$, 图 4-B)。Vg 基因主要在草地贪夜蛾雌蛹末期及成虫期表达, Vg 基因在除 1 龄幼虫外的幼虫期和化蛹初期表达量极低,仅为羽化 1 d 雌成虫中表达量的百万至千万分之几($P < 0.05$) (图 5)。

2.4 草地贪夜蛾 *Vg* 基因表达与其卵巢发育的关系

解剖结果显示,草地贪夜蛾雌成虫卵巢发育可分成5个阶段:乳白透明期(羽化1~2 d)、卵黄沉积期(羽化2~3 d)、成熟待产期(羽化4~5 d)、产卵盛期(羽化5~7 d)及产卵末期(羽化7~10 d)(图6)。*Vg* 基因在化蛹末期(化蛹第8天)微弱表达,于草地贪

夜蛾成虫卵巢的乳白透明期和卵黄沉积期迅速上升,在羽化第4天雌成虫的成熟待产期达到高峰,进入产卵盛期及末期后其表达量急剧降低(图5)。表明草地贪夜蛾 *Vg* 基因的相对表达量在雌成虫期呈现动态变化,与其卵巢发育进度紧密相关。

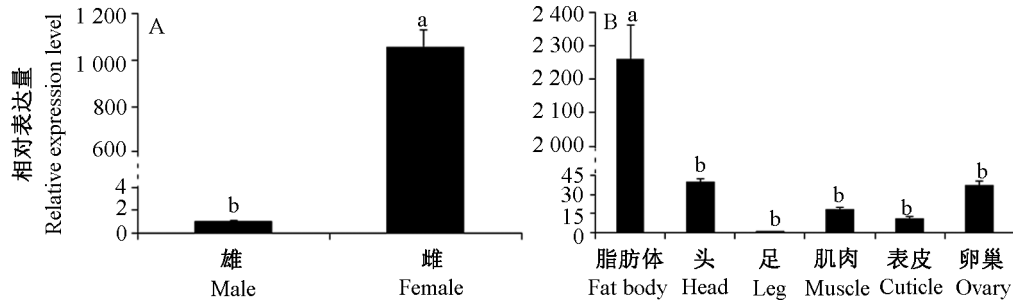
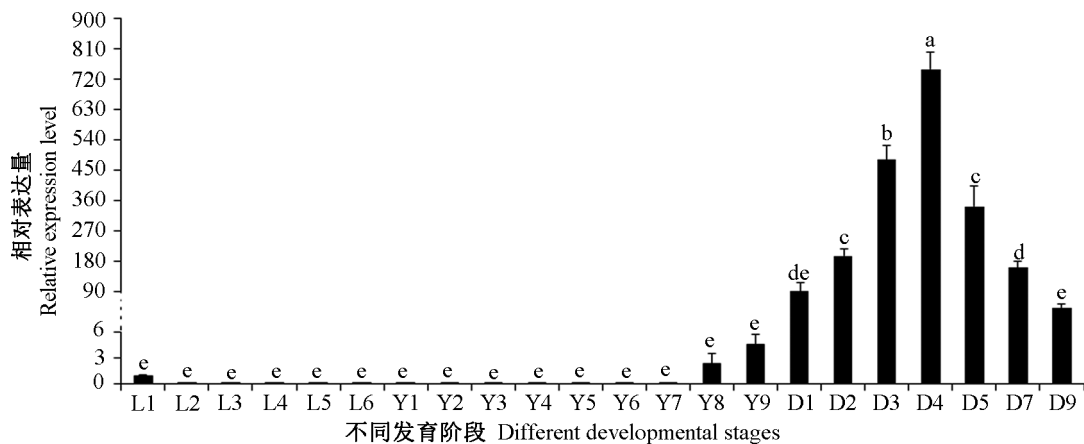


图4 草地贪夜蛾 *Vg* 基因在不同性别和组织中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression levels of *Vg* in different genders and tissues of *Spodoptera frugiperda*

图中数据均为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经 Tukey's HSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean ± SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey's HSD test.



L1~L6: 1~6龄幼虫; Y1~Y9: 化蛹1~9 d的蛹; D1~D9: 羽化1~9 d的雌成虫。

L1~L6: 1st~6th instar larvae; Y1~Y9: pupae of 1st~9th day; D1~D9: female adults of 1~9 days old.

图5 草地贪夜蛾 *Vg* 基因在不同发育时期的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *Vg* gene at different developmental stages of *Spodoptera frugiperda*

图中数据均为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经 Tukey's HSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean ± SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey's HSD test.

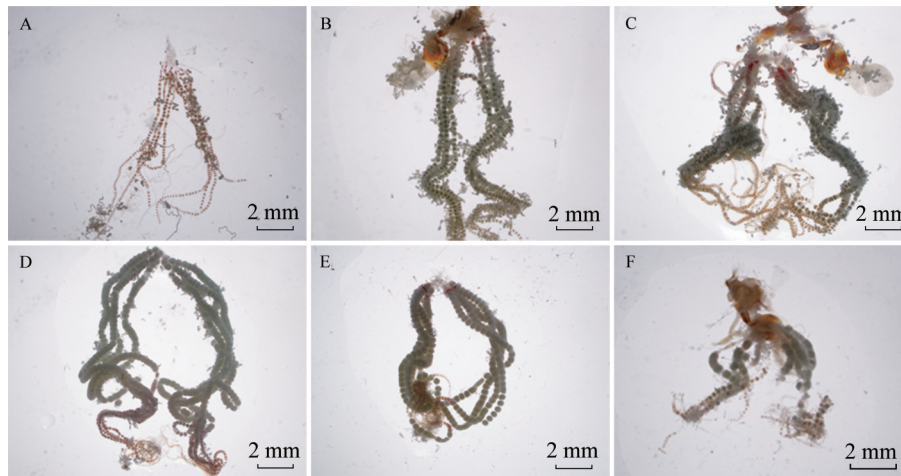
3 讨论

作为昆虫卵黄发生的关键物质, *Vg* 在卵母细胞和胚胎发育中起着至关重要的作用(Tufail & Takeda, 2008; Liu et al., 2015)。本研究通过 RACE 和 RT-PCR 技术确定了草地贪夜蛾 *Vg* 基因的全长序列, 是 GenBank 中登录的鳞翅目第 19 个昆虫的 *Vg* 序列。与鳞翅目其他昆虫 *Vg* 类似, 草地贪夜蛾 *Vg* 含有 3 大保守结构域: 具有脂质转运功能的 Vitellogenin-N, 开放 β 薄片结构组成的 DUF1943 及未知功能域 VWD。草地贪夜蛾 *Vg* 氨基酸序列结果分析表明, 从甲硫氨

酸开始的前 15 个氨基酸为信号肽, 而夜蛾科斜纹夜蛾 *Vg* 的 N 端前 17 个氨基酸为信号肽(Shu et al., 2009)。通过对鳞翅目夜蛾科昆虫 *Vg* 的 C 端氨基酸序列进行比对, 发现 GICG、半胱氨酸残基和 DGQR 基序高度保守。而 GL/ICG 和半胱氨酸残基被证实是脊椎动物 *Vg* 寡聚化反应的必要条件(Giorgi et al., 1999)。昆虫 *Vg* 通过寡聚化反应结合含有非活性的蜕皮激素脂类, 并在胚胎形成过程中释放蜕皮激素(Tufail et al., 2000)。草地贪夜蛾 *Vg* 氨基酸序列中存在酶切位点 RTIR, 将其切割成大、小 2 个亚

基,该酶切位点识别的氨基酸序列在昆虫中较为保守,一般为(R/K)X(R/K)R 或者 RXXR(Tufail & Takeda, 2008)。但也有例外,Nose et al.(1997)研究发现寄生蜂 Vg 保守的 RXXR 位点突变为 LYRR,且不被切割。基于鳞翅目 Vg 序列构建的系统发育树显示

草地贪夜蛾与斜纹夜蛾的亲缘关系最近,聚为一支,支持率为 97.00%,同属夜蛾科。这 2 种昆虫 Vg 的分子结构、氨基酸相似度(91.48%)及田间多食性特点都佐证了以上结论,表明两者的 Vg 可能来源于同一祖先,因自然选择压力而发生分化。



A: 乳白透明期; B~C: 卵黄沉积期; D: 成熟待产期; E: 产卵盛期; F: 产卵末期。A: Opalescent transparent stage; B~C: yolk deposition stage; D: egg maturation stage; E: peak phase of oviposition; F: terminal phase of oviposition.

图 6 不同日龄草地贪夜蛾雌成虫卵巢的发育动态

Fig. 6 Developmental dynamics of ovaries in *Spodoptera frugiperda* female adults at different days

对于大部分昆虫来说,脂肪体是 Vg 的唯一合成场所,但在意大利蜜蜂和草蛉等少数昆虫中,其雄成虫及雌成虫卵巢等其他组织中都能检测到 Vg 的表达。如在社会性昆虫意大利蜜蜂的表达模式中发现 Vg 不仅在蜂王的脂肪体中转录表达,在雄蜂和工蜂的脂肪体和蜂王的卵巢中也能被检测到(Piulachs et al., 2003; Guidugli et al., 2005)。在工蜂中 Vg 浓度的变化与其参与行为分化功能有关,高、低浓度的 Vg 能够分别对应工蜂的采粉和采蜜行为(Nelson et al., 2007)。冯彦姣等(2020)通过对大草蛉 *Chrysopa pallens* 雄虫 Vg 基因表达的检测发现其在雄成虫的头、胸和腹部中均有表达,且在腹部的表达量较高,同时头、胸组织中只检测到 Vg 的小亚基,推测 Vg 可能参与其生殖调控及行为调节。本研究测定的草地贪夜蛾 Vg 基因表达结果显示其除在雌成虫脂肪体中高表达之外,在雄成虫及雌成虫卵巢、表皮等组织中也能被检测到,但表达量极低。草地贪夜蛾 Vg 基因在雄成虫及雌成虫除脂肪体之外组织中的微量表达,最终能否在蛋白水平上合成 Vg 以及行使其他非营养功能还需要进一步深入研究。

不同昆虫 Vg 的表达具有发育阶段特异性,且启动时间并不相同。如家蚕 *Bombyx mori* 的 Vg 基因在幼虫末期开始表达(Yano et al., 1994),而斜纹夜蛾

Vg 基因表达开始于蛹后期(Shu et al., 2009)。在草地贪夜蛾中,从低龄幼虫到化蛹初期均可检测到 Vg 的微量表达,而其在这些时期的功能还有待进一步研究。与甜菜夜蛾和斜纹夜蛾等昆虫 Vg 的研究结果类似(Shu et al., 2009; Zhao et al., 2016),草地贪夜蛾 Vg 的表达量在蛹末期与成虫期的急速变化依赖于卵巢发育进程。结合本研究及赵胜园等(2019)对草地贪夜蛾卵巢的解剖分级结果,Vg 基因的表达量在草地贪夜蛾卵巢发育的乳白透明期(羽化 1~2 d)及卵黄沉积期(羽化 2~3 d)快速上升以满足卵巢中卵子形成对营养物质的需求,而进入成熟待产期(羽化 4~5 d)后卵巢中大部分卵粒已成熟,其对营养物质的需求下降,因此 Vg 表达量达到高峰期后进入下降期。

昆虫强大的生殖能力和特殊的生殖适应性是其能够快速定殖与扩张的重要因素。草地贪夜蛾作为我国的新入侵害虫,具有强大的繁殖力,单雌产卵量可达千粒,对我国玉米等农作物生产安全构成严重威胁。本研究明确了草地贪夜蛾繁殖关键因子 Vg 的分子特性及表达动态,一方面为进一步研究草地贪夜蛾 Vg 的功能及其调控机理研究奠定基础,另一方面可为准确测报及有效控制草地贪夜蛾种群暴发提供新靶标。

参 考 文 献 (References)

- Dong SZ, Ye GY, Zhu JY, Chen ZX, Hu C, Liu SS. 2007. Vitellin of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae), a pupal endoparasitoid of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae): biochemical characterization, temporal patterns of production and degradation. *Journal of Insect Physiology*, 53(5): 468–477
- Early R, González-Moreno P, Murphy ST, Day R. 2018. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. *NeoBiota*, 40: 25–50
- Feng YJ, Liu XP, Zhang TT, Chen HY, Wang MQ, Liu CX, Li YY, Zhang LS, Mao JJ. 2021. Identification and expression characteristics of vitellogenin gene in *Chrysopa pallens* males. *Chinese Journal of Biological Control*, 37(1): 77–85 (in Chinese) [冯彦姣, 刘小平, 张婷婷, 陈红印, 王孟卿, 刘晨曦, 李玉艳, 张礼生, 毛建军. 2021. 大草蛉雄虫卵黄原蛋白基因的鉴定和表达特征. *中国生物防治学报*, 37(1): 77–85]
- Ge LQ, Wu JC. 2010. Research progress in insect vitellin and its hormone regulation. *Entomological Knowledge*, 47(2): 236–246 (in Chinese) [戈林泉, 吴进才. 2010. 昆虫卵黄蛋白及其激素调控的研究进展. *昆虫知识*, 47(2): 236–246]
- Giorgi F, Bradley JT, Nordin JH. 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron*, 30(6): 579–596
- Guidugli KR, Piulachs MD, Bellés X, Lourenço AP, Simões ZLP. 2005. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(4): 211–218
- Harrison RD, Thierfelder C, Baudron F, Chinwada P, Midega C, Schaffner U, van den Berg J. 2019. Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) management: providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest. *Journal of Environmental Management*, 243: 318–330
- Huo Y, Chen XY, Fang RX, Zhang LL. 2018. Study on the production of vitellogenin and its non-nutritional functions. *Biotechnology Bulletin*, 34(2): 66–73 (in Chinese) [霍岩, 陈晓英, 方荣祥, 张莉莉. 2018. 卵黄蛋白原的产生及其非营养功能的研究现状. *生物技术通报*, 34(2): 66–73]
- Huo Y, Liu WW, Zhang FJ, Chen XY, Li L, Liu QF, Zhou YJ, Wei TY, Fang RX, Wang XF. 2014. Transovarial transmission of a plant virus is mediated by vitellogenin of its insect vector. *PLoS Pathogens*, 10(3): e1003949
- Liang HF, Zeng FR, Mao JJ. 2015. Gene cloning, sequence analysis and expression studies of vitellogenin gene in *Geocoris pallidipennis*. *Biotechnology Bulletin*, 31(10): 149–156 (in Chinese) [梁慧芳, 曾凡荣, 毛建军. 2015. 大眼长蝽卵黄原蛋白基因克隆、序列分析及表达研究. *生物技术通报*, 31(10): 149–156]
- Liu C, Mao J, Zeng F. 2015. *Chrysopa septempunctata* (Neuroptera: Chrysopidae) vitellogenin functions through effects on egg production and hatching. *Journal of Economic Entomology*, 108(6): 2779–2788
- 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
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*, 5(3): e2
- Nose Y, Lee JM, Ueno T, Hatakeyama M, Oishi K. 1997. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae): vitellogenin primary structure and evolutionary considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(12): 1047–1056
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP, Bellés X. 2003. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(4): 459–465
- Salmela H, Stark T, Stucki D, Fuchs S, Freitag D, Dey A, Kent CF, Zayed A, Dhaygude K, Hokkanen H, et al. 2016. Ancient duplications have led to functional divergence of vitellogenin-like genes potentially involved in inflammation and oxidative stress in honey bees. *Genome Biology and Evolution*, 8(3): 495–506
- Shang F, Niu JZ, Ding BY, Zhang Q, Ye C, Zhang W, Smaghe G, Wang JJ. 2018. Vitellogenin and its receptor play essential roles in the development and reproduction of the brown citrus aphid, *Aphis (Toxoptera) citricidus*. *Insect Molecular Biology*, 27(2): 221–233
- Shi WP. 2020. How greedy are the fall armyworm? *Journal of Plant Protection*, 47(4): 687–691 (in Chinese) [石旺鹏. 2020. 草地贪夜蛾到底有多“贪”. *植物保护学报*, 47(4): 687–691]
- Shu YH, Zhou JL, Tang WC, Lu K, Zhou Q, Zhang GR. 2009. Molecular characterization and expression pattern of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vitellogenin, and its response to lead stress. *Journal of Insect Physiology*, 55(7): 608–616
- Tufail M, Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K, Takeda M. 2000. Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 45(1): 37–46
- Tufail M, Takeda M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12): 1447–1458
- Tufail M, Takeda M. 2009. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology*, 55(2): 88–104
- Veerana M, Kubera A, Ngernsiri L. 2014. Analysis of the vitellogenin gene of rice moth, *Corcyra cephalonica* Stainton. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87(3): 126–147
- Wu KM. 2020. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China. *Plant Protection*, 46(2): 1–5 (in Chinese) [吴孔明. 2020. 中国草地贪夜蛾的防控策略. *植物保护*, 46(2): 1–5]
- Yano KI, Sakurai MT, Watabe S, Izumi S, Tomino S. 1994. Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1218(1): 1–10
- Zhao J, Sun Y, Xiao LB, Tan Y, Bai LX. 2016. Molecular characterization and expression of vitellogenin gene from *Spodoptera exigua* exposed to cadmium stress. *Gene*, 593(1): 179–184
- Zhao SY, Yang XM, He W, Zhang HW, Jiang YY, Wu KM. 2019. Ovarian development gradation and reproduction potential prediction in *Spodoptera frugiperda*. *Plant Protection*, 45(6): 28–34 (in Chinese) [赵胜园, 杨现明, 和伟, 张浩文, 姜玉英, 吴孔明. 2019. 草地贪夜蛾卵巢发育分级与繁殖潜力预测方法. *植物保护*, 45(6): 28–34]

(责任编辑:李美娟)