



刘苏, 蒋兴川, 蒋秀云, 陈诚, 孙劲超, 沈怿丹, 李桂亭, 操海群. 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.

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

刘 苏¹, 蒋兴川¹, 蒋秀云¹, 陈 诚², 孙劲超¹, 沈怿丹¹, 李桂亭¹, 操海群^{1*}

(1. 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室, 植物病虫害生物学与绿色防控安徽普通高校重点实验室, 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安徽审计职业学院, 合肥 230601)

摘要: 草地贪夜蛾是世界性的重大害虫, 2019 年 1 月入侵我国并迅速扩散到 20 多个省市。性诱剂是对草地贪夜蛾进行监测和诱杀的有效手段, 但是其作用识别机制仍不清楚, 限制了高效性诱剂的研发和应用。性信息素结合蛋白 (PBP) 在鳞翅目昆虫包括草地贪夜蛾性信息素识别过程中起重要作用。本研究从草地贪夜蛾中克隆了 4 个编码 PBP 的 cDNA 序列, 命名为 *SfruPBP1-SfruPBP4*。4 个 *SfruPBP*s 均含有完整的开放阅读框, 所编码的蛋白具有性信息素结合蛋白的典型特征: N-端有信号肽、具有保守的 6 个半胱氨酸残基。系统进化分析显示 *SfruPBP*s 与斜纹夜蛾和海灰翅夜蛾 PBP 的亲缘关系最近, 且 4 个 *SfruPBP*s 被聚在不同的进化分支。4 个 *SfruPBP*s 基因均由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 内含子插入位点高度保守。此外, 4 个 *SfruPBP*s 在草地贪夜蛾基因组上呈串联排列。*SfruPBP1*、*SfruPBP2* 和 *SfruPBP3* 在成虫触角中特异性表达, 其中 *SfruPBP1* 和 *SfruPBP2* 在雄成虫触角中的表达水平显著高于雌虫, 而 *SfruPBP3* 在雌雄触角中的表达水平无显著差异。*SfruPBP4* 特异性表达于雄成虫腹部。本研究结果为揭示草地贪夜蛾性信息素识别机制奠定了基础。

关键词: 草地贪夜蛾; 性信息素结合蛋白; 性信息素识别; 嗅觉通讯

中图分类号: Q963; S433.4

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 03-583-10

Cloning and expression profile analysis of four pheromone-binding protein genes in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*

LIU Su¹, JIANG Xing-Chuan¹, JIANG Xiu-Yun¹, CHEN Cheng², SUN Jing-Chao¹, SHEN Yi-Dan¹, LI Gui-Ting¹, CAO Hai-Qun^{1*} (1. Anhui Province Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops, Key Laboratory of Biology and Sustainable Management of Plant Diseases and Pests of Anhui Higher Education Institutes, College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Anhui Audit College, Hefei 230601, China)

Abstract: The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a major agricultural pest worldwide. This pest has invaded and rapidly spread in more than 20 provinces in China by January 2019. Use of pheromone lures is an effective method for population monitoring and mass-trapping of *S. frugiperda*. However, the mechanism of sex pheromone reception is not yet clear in this insect species, limiting the development and application of pheromone lures with high efficiency. Pheromone-binding proteins (PBPs) play critical roles in the recognition of intraspecific sex pheromones in most lepidopteran species, including *S. frugiperda*. In

基金项目: 安徽省科技重大专项 (201903a06020027); 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2017A868); 国家自然科学基金 (31801806); 国家重点研发计划 (2017YFD0200902)

作者简介: 刘苏, 副教授, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: suliu@ahau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 操海群, 教授, 研究方向为农药学与有害生物综合治理, E-mail: haiquncao@163.com

收稿日期 Received: 2020-03-04; 接受日期 Accepted: 2020-03-26

this study, four cDNA sequences encoding PBPs were cloned from *S. frugiperda* and named as *SfruPBP1-SfruPBP4*. The four *SfruPBP*s all contained complete open reading frames, and the proteins encoded by these genes all have the remarkable features of PBPs: The N-terminal signal peptides and six positionally conserved cysteine residues. Phylogenetic analysis result showed that the four *SfruPBP*s were closely related to PBPs from *Spodoptera litura* and *S. littoralis*, and that the four *SfruPBP*s fell into different branches. The four *SfruPBP*s all consisted of three exons and two introns, with highly conserved intron insertion sites. Moreover, the four *SfruPBP* genes were tandemly arrayed in the genome of *S. frugiperda*. *SfruPBP1*, *SfruPBP2* and *SfruPBP3* were specifically expressed in the antennae of adults; of these, the transcription levels of *SfruPBP1* and *SfruPBP2* in male antennae were significantly higher than those in female antennae, while the variation in *SfruPBP3* transcription between male and female antennae was not significant. *SfruPBP4* was specifically expressed in the abdomen of male adults. This study paved the way for revealing the mechanism underlying pheromonal recognition in *S. frugiperda*.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; pheromone-binding proteins; pheromone recognition; olfactory communication

昆虫依靠灵敏的嗅觉系统识别外界环境中的信息化合物。当气味分子进入昆虫触角上的嗅觉感器后,首先被气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)所识别,OBPs携带这些疏水性的气味分子穿越感器淋巴液,将气味分子运输至感器深处的气味受体(odorant receptors, ORs)附近,从而激活ORs,引导昆虫产生行为反应(杜立啸等,2016;张玉等,2019)。在鳞翅目昆虫的OBP家族中,有一类能结合性信息素的特殊类群,称为性信息素结合蛋白(pheromone-binding proteins, PBPs)。首个PBP(ApolPBP1)在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 雄蛾触角中被发现,该蛋白能够结合多音天蚕的性信息素组分 E6, Z11-16Ac、E6, Z11-16Ald 和 E4, Z9-14Ac (Vogt and Riddiford, 1981; Leal *et al.*, 2005)。随后,在多种鳞翅目昆虫中都发现有PBPs的存在(Brito *et al.*, 2016)。PBPs是一类小分子水溶性蛋白,其序列中的6个半胱氨酸残基能够形成3对二硫键,从而稳定PBPs蛋白的三维结构(Sun *et al.*, 2018)。此外,PBPs蛋白一般具有6个 α -螺旋结构,这些 α -螺旋形成结合腔,在PBPs运输性信息素分子中起重要作用(张玉等,2019)。

绝大多数鳞翅目昆虫如家蚕 *Bombyx mori*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 等触角中都表达多个PBPs,这些PBPs能够结合本物种不同种类的性信息素组分,在性信息素通讯中扮演重要角色(Gong *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017)。此外,在舞毒蛾

Lymantria dispar、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 和茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 等昆虫中还发现PBPs不仅能结合性信息素,还能结合植物挥发物(贾小俭等,2015; Yu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019)。

由于PBPs与性信息素分子的结合是昆虫性信息素通讯的第一步,因此PBPs可以作为潜在的靶标,用于开发新型的害虫无公害防治技术。目前, RNA 干扰技术和基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术已成功应用于沉默或敲除棉铃虫、舞毒蛾、斜纹夜蛾和二化螟等的PBPs基因,使试虫对性信息素的电生理反应显著降低(Zhu *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2019)。此外,有研究人员基于PBP蛋白的结构开发了高通量的化合物筛选程序,并成功获得了具有生物活性的引诱剂(Tian *et al.*, 2016)。

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 属鳞翅目夜蛾科,是一类杂食性、暴发性害虫。此虫原产美洲,自2016年在非洲被发现以来,不仅迅速扩散至撒哈拉以南数十个国家,而且向亚洲入侵,2019年1月此虫被确认入侵我国云南省,截至2019年10月,已确认入侵我国26个省、市、自治区(郭井菲等,2019;姜玉英等,2019;王磊等,2019)。草地贪夜蛾在完成初始定殖过程后,预计2020年将进入暴发为害阶段(吴孔明,2020)。此虫食性杂、食量大、繁殖力强且迁飞距离远,对我国粮食安全造成严重威胁(齐国君等,2019;吴益东等,2019;闫文娟等,2019;杨普云等,2019)。明确草地贪夜蛾识别性信息素的分子机制,对于寻找新的靶标、筛选高效引诱剂或嗅觉阻断剂应用

于害虫防治, 均具有重要意义。目前, 草地贪夜蛾的性信息素成分已被探明 (Unbehend *et al.*, 2013; 江南纪和王琛柱, 2019), 应用性信息素防治草地贪夜蛾也有相关报道 (杨留鹏等, 2020), 但关于其性信息素通讯分子机制的研究依然匮乏。本实验从草地贪夜蛾中克隆了 4 个编码 PBP 的 cDNA 序列 (*SfruPBP1-SfruPBP4*), 并分析了 4 个 *SfruPBP* 的序列特征、基因组位置、外显子-内含子结构以及组织表达模式。本研究结果为阐明 PBP 在草地贪夜蛾性信息素识别中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验试虫

草地贪夜蛾幼虫采集自安徽省黄山市黄山区玉米田 (蒋兴川等, 2019)。将幼虫带回实验室, 在人工气候箱中饲养。幼虫饲喂新鲜玉米叶片直至化蛹, 羽化后的成虫饲喂 10% 蜂蜜水。饲养条件为: 温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 10\%$, 光暗周期 14 h:10 h。

1.2 组织收集、总 RNA 提取与第一链 cDNA 合成

收集羽化后 48 h 之内未交配的雌、雄成虫, 置于冰上 10 min 后, 分离收集不同组织: 触角、去除触角的头部、胸、腹、足和翅。使用 RNAiso Plus 试剂 (宝生物, 大连) 提取各组织的总 RNA。总 RNA 样品经琼脂糖电泳分析和 NanoDrop 2000 微量分光光度计检测后, 使用 ReverTra Ace qPCR

RT Master Mix with gDNA Remover 反转录试剂盒 (东洋纺, 日本) 合成第一链 cDNA。

1.3 同源检索与基因克隆

从 GenBank 数据库下载夜蛾科昆虫 (斜纹夜蛾 *S. litura*、棉铃虫 *H. armigera*、甜菜夜蛾 *S. exigua* 和小地老虎 *Agrotis ipsilon*) 的 PBP 蛋白序列, 以此为模板, 利用 BioEdit 软件中的 TBLASTN 程序在草地贪夜蛾转录组 (Legeai *et al.*, 2014) 中检索, 获得了草地贪夜蛾 4 个编码 PBP 的 cDNA 序列 (*SfruPBP1-SfruPBP4*)。据此设计基因特异性引物 (表 1), 使用 KOD FX DNA 聚合酶 (东洋纺, 日本) 扩增完整开放阅读框。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将目的条带回收, 连入 pTOPO-Blunt 载体 (艾德莱生物, 北京), 转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞 (全式金, 北京), 挑取阳性克隆测序 (通用生物, 滁州)。

1.4 序列分析与进化树构建

利用 DNASTAR 软件中的 EditSeq 模块将 4 个 *SfruPBP* 的核酸序列翻译成蛋白序列, 并计算蛋白分子量和等电点。使用 Clustal Omega 程序进行多序列连配。分泌信号肽使用 SignalP 5.0 软件预测。根据已报道的草地贪夜蛾基因组序列 (Liu *et al.*, 2019), 使用 Splign 程序分析 4 个 *SfruPBP* 在基因组上的位置以及外显子-内含子结构。从 GenBank 数据库下载鳞翅目昆虫的 PBP 蛋白序列, 利用 MEGA 7.0 软件以最大似然法 (maximum likelihood) 构建进化树, 并经 1 000 次 Bootstrap 自举重复检验。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer (5'-3')	用途 Purpose
<i>SfruPBP1</i>	正向 Fw: ATGGCGGACGCTAGATG/反向 Rv: TTATACGGCGGTTCATCAT	
<i>SfruPBP2</i>	正向 Fw: ATGACCGCTCCGGCAGTC/反向 Rv: TTACACTTCAGCCAGCAC	克隆开放阅读框;
<i>SfruPBP3</i>	正向 Fw: ATGGGATCGTCCAACGT/反向 Rv: CTACATTTTCAGTGAGGACCT	反转录 PCR
<i>SfruPBP4</i>	正向 Fw: ATGAAGGCAATCGTAGTC/反向 Rv: TCAACAAAAAGATCTTCTTAAG	ORF cloning; RT-PCR
<i>RpL18</i>	正向 Fw: CACCGAAGTCAAGTCTCA/反向 Rv: GAGCCAGCTGATCCAAT	
<i>SfruPBP1</i>	正向 Fw: GACGCTAGATGGAGGGTTGT/反向 Rv: CCTATCTTCAGCTCAGTCTTC	
<i>SfruPBP2</i>	正向 Fw: CGAGCTGACGAACATACAG/反向 Rv: CACTATCTGCTTCGCCATG	实时定量 PCR
<i>SfruPBP3</i>	正向 Fw: CAAGCAGGAGCTAAACATGA/反向 Rv: GCTCCAGCTTCTTGCTCAT	Real-time
<i>RpL18</i>	正向 Fw: GCTCTGCACGTTACCGAGA/反向 Rv: GCAGCAGAACGGTCTTGG	quantitative PCR

1.5 组织表达模式分析

使用反转录 PCR (RT-PCR) 分析 4 个 *SfruPBP*s 在草地贪夜蛾不同组织中的表达模式。所用引物见表 1, 以草地贪夜蛾核糖体蛋白 *RpL18* 作为内参基因。PCR 酶为 2 × Taq Mix (康为世纪, 北京), 反应体系 20 μL, 包括 10 μL 2 × Taq Mix、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物、1 μL (10 ng) 第一链 cDNA 和 8 μL ddH₂O。反应程序为 94℃ 2 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察条带的分子量是否与预期一致, 并经测序确认。

使用实时荧光定量 PCR 分析 *SfruPBP*s 在雌雄触角中的相对表达水平。所用引物见表 1, 所用仪器为美国 Bio-Rad 公司 CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪。反应体系 20 μL, 包括 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL (东洋纺, 日本)、上下游引物各 0.5 μL、第一链 cDNA 1 μL (10 ng) 和 8 μL ddH₂O。反应程序为 95℃ 2 min, 1 个循环; 95℃ 10 s, 60℃ 25 s, 40 个循环。反应完成后, 温度从 60℃ 逐步上升至 95℃, 绘制熔解曲线, 以检测是否存在非特异性扩增及引物二聚体。为探测潜在的污染, 每个反应板均包含无 cDNA 模板的对照和无反转录酶的对照。实验设

3 次生物学重复, 基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 (曹苗苗等, 2018; 董婉莹等, 2019)。

1.6 数据统计

使用 DPS 数据处理系统软件 v9.5 版进行数据统计, 采用学生氏 *t* 测验比较不同样本之间的差异显著性, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *SfruPBP*s 序列分析

通过检索草地贪夜蛾转录组, 并经过 PCR 扩增和测序, 获得了 4 个编码 PBP 的 cDNA 序列, 命名为 *SfruPBP1-SfruPBP4* (已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 MN541407-MN541410)。4 个 *SfruPBP*s 的开放阅读框介于 495 bp ~ 621 bp 之间, 编码的蛋白质长度介于 164 ~ 206 个氨基酸之间 (表 2)。BLASTX 比对结果表明, *SfruPBP1* 和 *SfruPBP4* 编码的蛋白分别与斜纹夜蛾 PBP1 和 PBP4 的一致性最高, 而 *SfruPBP2* 和 *SfruPBP3* 编码的蛋白分别与甜菜夜蛾 PBP2 和 PBP3 的一致性最高 (表 2)。但 4 个 *SfruPBP*s 编码的蛋白之间的氨基酸一致性较低, 介于 25% ~ 51% 之间 (表 3)。

表 2 4 个 *SfruPBP*s 的 BLASTX 最佳匹配

Table 2 BLASTX best hit of four *SfruPBP*s

基因名称 Gene name	阅读框长度 (aa) ORF	分子量 (kDa) MW	等电点 pI	BLASTX 最佳匹配 BLASTX best hit			
				物种和蛋白名称 Species and protein name	GenBank 登录号 GenBank accession number	期望值 E-value	一致性 Identity
<i>SfruPBP1</i>	164	18.7	5.56	斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i> PBP1	AIS72935	4e-103	87%
<i>SfruPBP2</i>	173	19.1	4.95	甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i> PBP2	AAS55551	5e-111	91%
<i>SfruPBP3</i>	164	18.7	5.58	甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i> PBP3	ACY78413	2e-105	90%
<i>SfruPBP4</i>	206	23.5	8.12	斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i> PBP4	AXO77502	1e-108	78%

表 3 4 个 *SfruPBP*s 蛋白之间的氨基酸一致性 (%)

Table 3 Amino acid identities among four *SfruPBP* proteins

	<i>SfruPBP1</i>	<i>SfruPBP2</i>	<i>SfruPBP3</i>	<i>SfruPBP4</i>
<i>SfruPBP1</i>	-			
<i>SfruPBP2</i>	44	-		
<i>SfruPBP3</i>	51	45	-	
<i>SfruPBP4</i>	25	26	26	-

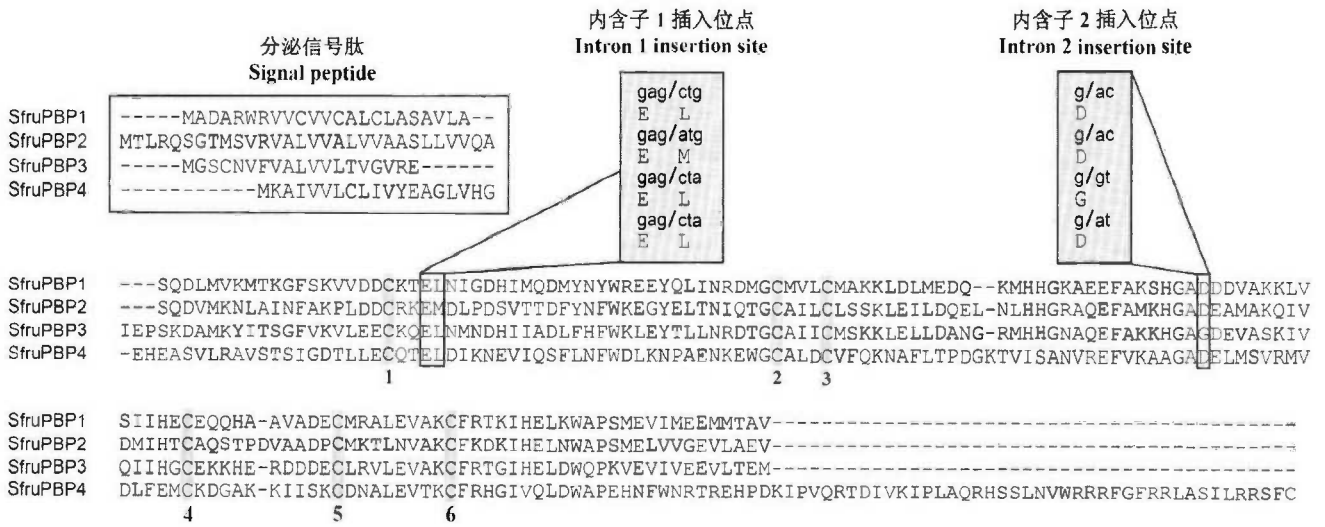


图 1 4 个 SfruPBPs 蛋白序列连配

Fig. 1 Alignment of the protein sequences of four SfruPBPs

注：蛋白序列中的 6 个保守的半胱氨酸残基以灰色背景突出显示，并标注数字 1~6。灰色方框中的小写字母表示碱基，大写字母表示其编码的氨基酸残基。斜线表示内含子插入位点。内含子 1 插入在编码两个氨基酸的密码子之间，内含子 2 插入在编码同一个氨基酸的密码子内部。Note: Six positionally conserved cysteines in the protein sequences are highlighted with grey color and marked with numbers 1 to 6. The lowercase letters in the grey boxes represent nucleotides, while uppercase letters represent the deduced amino acids. The slash indicates the intron insertion site. The intron 1 is inserted between two codons, while intron 2 splits a codon.

4 个 SfruPBPs 蛋白的氨基端 (N-端) 均预测出一段分泌信号肽，暗示它们可能会被分泌出细胞外 (图 1)。多序列连配结果表明，4 个 SfruPBPs 蛋白序列中均具有 6 个保守的半胱氨酸位点。此外，SfruPBP4 蛋白的羧基端 (C 端) 显著长于其它 3 个 SfruPBPs (图 1)。基于鳞翅目昆虫 PBPs 的蛋白序列构建了进化树 (图 2)，结果显示，草地贪夜蛾 SfruPBPs 与斜纹夜蛾 SlituPBPs 和海灰翅夜蛾 SlitPBPs 亲缘关系最近。此外，4 个 SfruPBPs 分别位于不同的进化分支之中，暗示它们可能具有功能上的分化 (图 2)。

2.2 基因结构分析

使用 Splign 程序将 4 个 SfruPBPs 的 cDNA 序列与草地贪夜蛾的基因组 DNA 序列进行连配。结果显示，4 个 SfruPBPs 均位于 10 号染色体上 (chr10)，呈串联排列，序列跨度为 8 272 bp (图 3A)。SfruPBP1、SfruPBP2、SfruPBP3 和 SfruPBP4 在基因组上的长度分别为 688 bp、1 490 bp、800 bp 和 1 099 bp，均包含 3 个外显子和 2 个内含子 (图 3B)。4 个 SfruPBPs 的内含子边界均符合

典型的真核生物“GT-AG”规则 (数据未显示)。此外，4 个 SfruPBPs 均具有保守的内含子插入位点，第 1 个内含子插入在编码两个氨基酸的密码子之间，而第 2 个内含子插入在编码同一个氨基酸的密码子内部 (图 1)。

2.3 组织表达模式分析

RT-PCR 结果表明，4 个 SfruPBPs 具有不同的组织表达模式。SfruPBP1、SfruPBP2 和 SfruPBP3 均在雌雄成虫触角中大量表达，而在头、胸、腹、足、翅等非嗅觉组织中不表达 (图 4)。SfruPBP4 却表现出截然不同的表达模式，即在雄成虫腹部表达，而在触角和其它组织中不表达 (图 4)。使用实时荧光定量 PCR 进一步检测了 SfruPBP1、SfruPBP2 和 SfruPBP3 在雌雄成虫触角中的相对表达水平 (因 SfruPBP4 在触角中不表达，故未检测)。结果显示，SfruPBP1 和 SfruPBP2 在雄成虫触角中的表达水平显著高于雌成虫 ($P < 0.05$)，而 SfruPBP3 在雌雄触角中的表达水平无显著差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

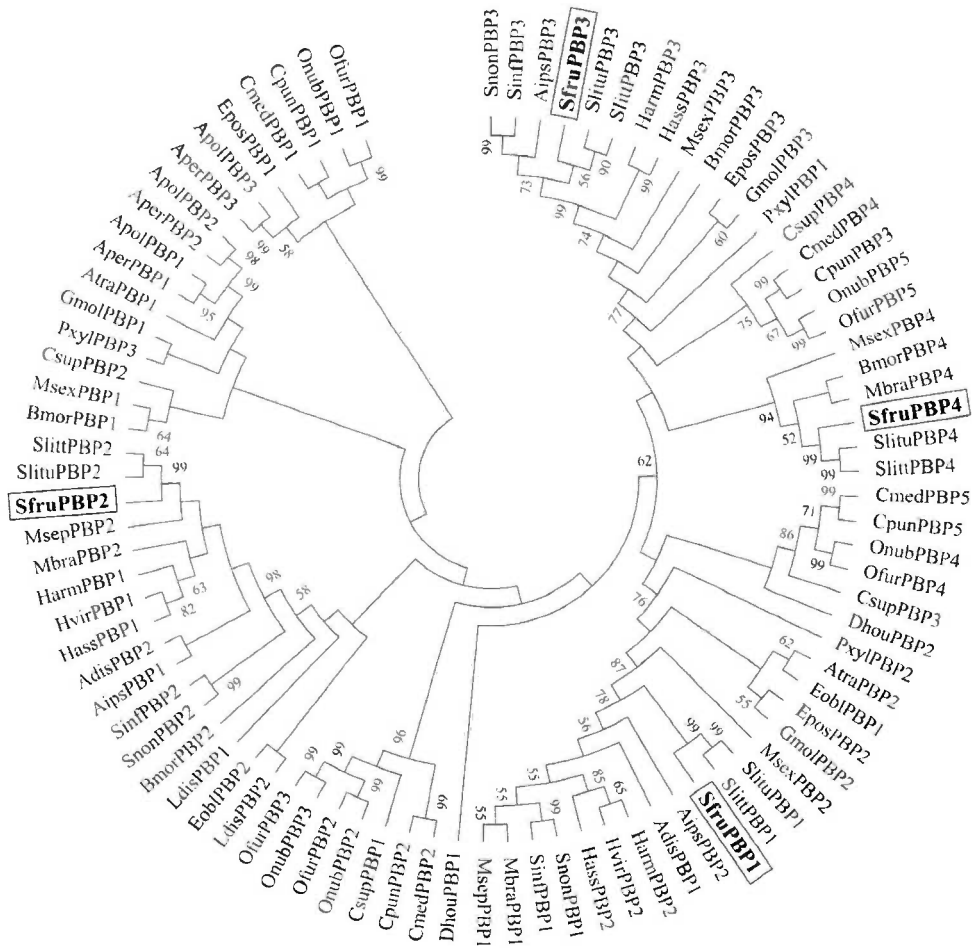


图 2 鳞翅目昆虫 PBP 进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of lepidopteran PBP

注: 4 个 *SfruPBP* 以方框标示。Four *SfruPBP* genes are boxed. 低于 50 的自举值未显示。Bootstrap values lower than 50 are not shown. 物种名与 PBP 登录号 Species names and GenBank accession numbers of PBPs: 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*: SfruPBP1 – SfruPBP4 (MN541407 – MN541410); 小地老虎 *Agrotis ipsilon*: AipsPBP1 – AipsPBP3 (AFM36756 – AFM36758); 柞蚕 *Antheraea pernyi*: AperPBP1 (X96773), AperPBP2 (X96860), AperPBP3 (AJ277265); 多音天蚕 *Antheraea polyphemus*: ApolPBP1 (X17559), ApolPBP2 (AJ277266), ApolPBP3 (AJ277267); 脐橙螟 *Amyelois transitella*: AtraPBP1 (ACX47890), AtraPBP2 (ACX47891); 家蚕 *Bombyx mori*: BmorPBP1 (NM_001044029), BmorPBP2 (XP_012545845), BmorPBP3 (NM_001083626), BmorPBP4 (Vogt *et al.*, 2015); 二化螟 *Chilo suppressalis*: CsupPBP1 (GU321120), CsupPBP2 (EU825762), CsupPBP3 (HM190253), CsupPBP4 (Chang *et al.*, 2015); 稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*: CmedPBP1 (JN867060), CmedPBP2 (KC507181), CmedPBP4 (KC507185), CmedPBP5 (KP975161); 苹果褐卷蛾 *Epiphyas postvittana*: EposPBP1 (AF416587), EposPBP2 (AF411459), EposPBP3 (EV811597); 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*: HarmPBP1 (HQ436362), HarmPBP2 (HQ436360), HarmPBP3 (AF527054); 烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*: HassPBP1 (AY864775), HassPBP2 (EU316186), HassPBP3 (DQ286414); 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*: HvirPBP1 (X96861), HvirPBP2 (AM403491); 舞毒蛾 *Lymantria dispar*: LdisPBP1 (AF007867), LdisPBP2 (AF007868); 烟草天蛾 *Manduca sexta*: MsexPBP1 (AF117593), MsexPBP2 (AF117588), MsexPBP3 (AF117581), MsexPBP4 (Vogt *et al.*, 2015); 欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*: OnubPBP1 – OnubPBP5 (GU826166 – GU826170); 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*: OfurPBP1 – OfurPBP5 (LC027678 – LC027682); 小菜蛾 *Plutella xylostella*: PxyPBP1 (ACI28451), PxyPBP2 (AGH13203), PxyPBP3 (BAG71422); 蛙茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides*: SnonPBP1 (AAS49922), SnonPBP2 (AAS49923); 大螟 *Sesamia inferens*: SinfPBP1 (AEQ30019), SinfPBP2 (AEX58642), SinfPBP3 (AEQ30020); 梨小食心虫 *Grapholita molesta*: GmolPBP1 (AVZ44710), GmolPBP2 (AHZ89398), GmolPBP3 (AHZ89399); 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*: SlituPBP1 – SlituPBP4 (AIS72933 – AIS72935; AX077502); 茶尺蠖 *Ectropis obliqua*: EoblPBP1 (KT991348), EoblPBP2 (KX421383); 桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*: CpunPBP1 (MH006604), CpunPBP2 (KP985228), CpunPBP3 (KP985229), CpunPBP5 (KP985227); 云南松毛虫 *Dendrolimus houi*: DhouPBP1 (KC783384); DhouPBP2 (KF487588); 双委夜蛾 *Athetis dissimilis*: AdisPBP1 (KR780029), AdisPBP2 (KR780030); 甘蓝夜蛾 *MbraPBP1* (AF051143), *MbraPBP2* (AF051142), *MbraPBP4* (AF461143); 粘虫 *Mythimna separata*: MsepPBP1 (MH168090); MsepPBP2 (MH168089); 海灰翅夜蛾 *Spodoptera litoralis*: SlittPBP1 – SlittPBP4 (Walker *et al.*, 2019)。

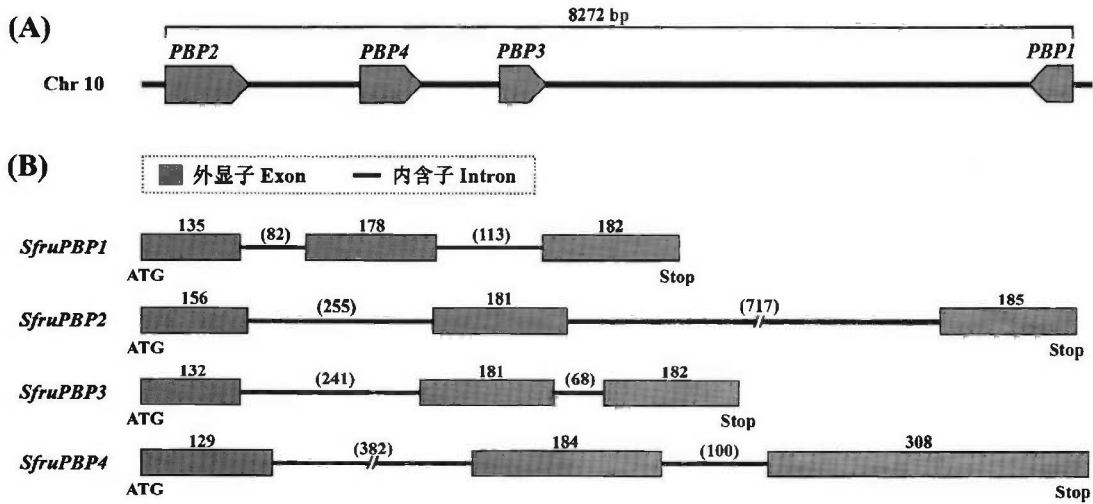


图 3 4 个 *SfruPBP*s 基因在基因组上的分布 (A) 以及内含子结构 (B)

Fig. 3 Genomic locations (A) and exon-intron structures (B) of four *SfruPBP* genes

注：括号中的数字为内含子长度。Note: Numbers in parentheses indicate the size of introns.

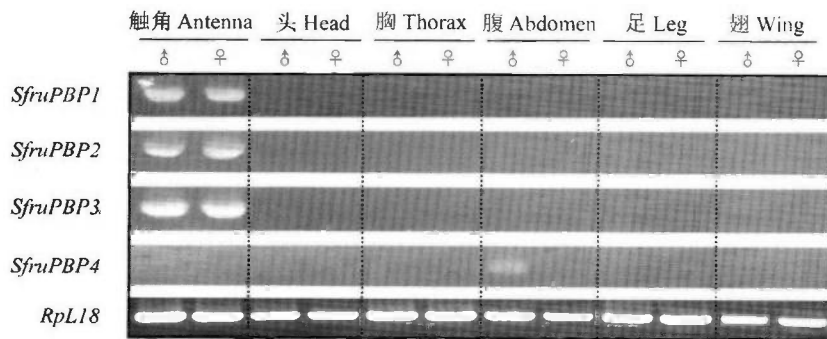


图 4 *SfruPBP*s 基因在成虫不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *SfruPBP*s in various adult tissues

注：“头”表示去除触角的头部。Note: “Head” indicates heads without antennae.

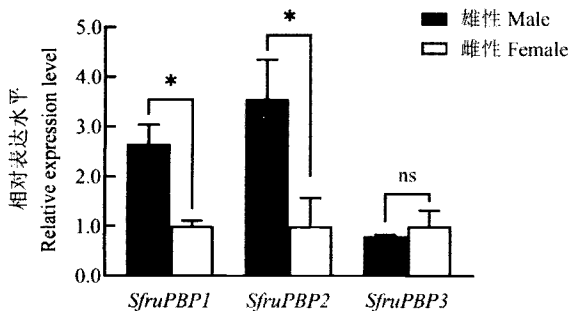


图 5 *SfruPBP*s 基因在雌雄成虫触角中的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression levels of *SfruPBP* genes in male and female antennae

注：“*”表示差异显著，“ns”表示差异不显著（学生氏 *t* 测验， $P < 0.05$ ）。Note: “*” indicates significant difference, “ns” stands for not statistically significant (Student’s *t*-test, $P < 0.05$).

3 结论与讨论

PBPs 与进入触角感器的性信息素分子的结合是昆虫性信息素通讯的第一步，因此 PBPs 对于昆虫的求偶、交配以及种群繁衍至关重要。若敲除 *PBP*s 基因或抑制其表达，昆虫对性信息素的嗅觉反应显著降低 (Zhu *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2019)。草地贪夜蛾同样依赖种内性信息素完成求偶与交配，其性信息素包括 Z9-14: OAc、Z11-16: OAc 等多种组分，草地贪夜蛾对这些性信息素组分的识别应当也会需要 PBPs 的参与 (江南纪和王琛柱, 2019)。本研究成功克隆了草地贪夜蛾 4 个 *SfruPBP*s，并分析了它们的序列特征、基因组位置、外显子-内含子结构以及组织表达模式。本研究结果为后续探

索这些基因在性信息素通讯中的功能, 以及利用这些基因作为靶标开发绿色防控技术奠定了基础。

不同鳞翅目昆虫所具有的 *PBPs* 基因数量不同。*PBPs* 基因数量较多的有欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (5 个)、亚洲玉米螟 *O. furnacalis* (5 个)、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (5 个)、二化螟 *C. suppressalis* (4 个)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (4 个) 等 (Allen and Wanner, 2011; Chang *et al.*, 2015; Vogt *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017)。夜蛾科昆虫一般表达 3 个 *PBPs*, 但本实验从草地贪夜蛾中克隆了 4 个 *SfruPBPs* 基因, 这与斜纹夜蛾中鉴定的 *PBPs* 基因数量一致 (孙佳斌等, 2018)。虽然 *SfruPBPs* 与其它 3 个 *SfruPBPs* 蛋白的一致性均较低, 且 *SfruPBPs* 蛋白序列的长度也显著大于另外 3 个 *SfruPBPs*, 但仍然推测 *SfruPBPs* 属于 *PBP* 家族, 证据主要有 (1) *SfruPBPs* 的蛋白序列具有鳞翅目 *PBP* 的典型特征, 即氨基端分泌信号肽和位置保守的 6 个半胱氨酸残基; (2) 在进化树中 *SfruPBPs* 显示出与其它鳞翅目昆虫 *PBPs* 紧密的亲缘关系; (3) *SfruPBPs* 基因与 *SfruPBPs1*、*SfruPBPs2* 和 *SfruPBPs3* 在草地贪夜蛾基因组上呈串联排列, 并且均具有保守的内含子插入位点。在家蚕、烟草天蛾、欧洲玉米螟和亚洲玉米螟基因组中, *PBPs* 基因也均为串联排列 (Gong *et al.*, 2009; Vogt *et al.*, 2015; Yasukochi *et al.*, 2018)。草地贪夜蛾基因组中存在 4 个 *SfruPBPs* 很可能是源自进化中的基因加倍事件。

研究 *PBPs* 基因在不同组织中的表达模式有助于推测基因的功能。一般认为, 在雄蛾触角中表达量高而在雌蛾触角中表达量低的 *PBPs* 基因可能会参与识别雌蛾释放的性信息素 (王菁桢等, 2017; 汪超等, 2019)。本研究发现 *SfruPBPs1*、*SfruPBPs2* 和 *SfruPBPs3* 均大量表达于触角, 且 *SfruPBPs1* 和 *SfruPBPs2* 在雄蛾触角中的表达量显著高于雌蛾, 暗示着它们可能参与性信息素的识别。*SfruPBPs3* 在雌雄蛾触角中的表达量差异不显著, 推测其可能在识别植物挥发物中起作用。在其它昆虫中, *PBPs* 基因也是多表达于成虫触角, 并能够结合性信息素和植物挥发物等 (Yu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019)。本研究还发现草地贪夜蛾 *SfruPBPs4* 仅在雄蛾腹部表达。在其它鳞翅目昆虫中, 也发现一些 *PBPs* 表达于非嗅觉组织, 例如烟草天蛾 *MsexPBPs4* 仅表达于成虫马氏管 (Vogt *et al.*, 2015), 斜纹夜蛾 *SlituPBPs4* 仅表达于雄成

虫生殖系统 (孙佳斌等, 2018)。此外, 针对 *SlituPBPs4* 重组蛋白的荧光竞争结合实验结果表明, 该蛋白对多种性信息素和植物挥发物均没有结合能力, 推测该蛋白可能在嗅觉以外的生理过程中起作用 (孙佳斌等, 2018)。本研究未对草地贪夜蛾 *SfruPBPs4* 开展功能实验, 因此该基因在生理过程中的作用尚不明确。在下一步研究中, 将综合利用蛋白异源表达、荧光竞争结合和 RNA 干扰等技术, 阐明 *SfruPBPs4* 的生理功能。

参考文献 (References)

- Allen JE, Wanner KW. Asian corn borer pheromone binding protein 3, a candidate for evolving specificity to the 12-tetradecenyl acetate sex pheromone [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41 (3): 141–149.
- Brito NF, Moreira MF, Melo ACA. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016, 95: 51–65.
- Cao MM, Ju WY, Zheng JL, *et al.* Cloning and induced expression profile of pattern recognition receptor *GNBP1* gene of *Spodoptera litura* (Fabricius) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2018, 40 (6): 1316–1327. [曹苗苗, 鞠雯燕, 郑锦龙, 等. 斜纹夜蛾 *GNBP1* 基因的克隆及诱导表达模式的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2018, 40 (6): 1316–1327]
- Chang H, Liu Y, Yang T, *et al.* Pheromone binding proteins enhance the sensitivity of olfactory receptors to sex pheromones in *Chilo suppressalis* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 13093.
- Dong WY, Zhao MT, Guo JY. Expression patterns of insulin-like growth factors system (IGFs) genes *IGFALS* and *IMP3* in *Agasicles hygrophila* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (2): 358–366. [董婉莹, 赵梅婷, 郭建英. 莲草直胸跳甲胰岛素样生长因子系统相关基因 *IGFALS* 和 *IMP3* 的表达模式 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (2): 358–366]
- Dong XT, Liao H, Zhu GH, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated *PBP1* and *PBP3* mutagenesis induced significant reduction in electrophysiological response to sex pheromones in male *Chilo suppressalis* [J]. *Insect Science*, 2019, 26 (3): 388–399.
- Du LX, Liu Y, Wang GR. Molecular mechanisms of signal transduction in the peripheral olfactory system of insects [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46 (5): 573–583. [杜立喆, 刘杨, 王桂荣. 昆虫外周嗅觉系统信号转导机制研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46 (5): 573–583]
- Feng B, Lin X, Zheng K, *et al.* Transcriptome and expression profiling analysis link patterns of gene expression to antennal responses in *Spodoptera litura* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 269.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, *et al.* The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori* [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10 (1): 10332.
- Guo JF, He KL, Wang ZY. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategy for management of

- the pest [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (3): 361–369. [郭井菲, 何康来, 王振营. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策 [J]. *应用昆虫学报*, 2019, 56 (3): 361–369]
- Jia XJ, Hao SD, Du YL, *et al.* cDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein Cpun – PBPI in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58 (11): 1167–1176. [贾小俭, 郝少东, 杜艳丽, 等. 桃蛀螟性信息素结合蛋白 Cpun – PBPI 的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析 [J]. *昆虫学报*, 2015, 58 (11): 1167–1176]
- Jiang NJ, Wang CZ. Progress in sex pheromone communication of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62 (8): 993–1002. [江南纪, 王琛柱. 草地贪夜蛾的性信息素通讯研究进展 [J]. *昆虫学报*, 2019, 62 (8): 993–1002]
- Jiang XC, Shen YD, Sun JC, *et al.* Effect of chlorantraniliprole and emamectin benzoate on toxicity and detoxification enzymes activity in *Spodoptera frugiperda* larva [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (5): 683–694. [蒋兴川, 沈怿丹, 孙劲超, 等. 氯虫苯甲酰胺和甲维盐对草地贪夜蛾幼虫的毒力及解毒酶活性的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41 (5): 683–694]
- Jiang YY, Liu J, Xie MC, *et al.* Observation on law of diffusion damage of *Spodoptera frugiperda* in China in 2019 [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (6): 10–19. [姜玉英, 刘杰, 谢茂昌, 等. 2019 年我国草地贪夜蛾扩散为害规律观测 [J]. *植物保护*, 2019, 45 (6): 10–19]
- Leal W, Chen A, Erickson M. Selective and pH – dependent binding of a moth pheromone to a pheromone – binding protein [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31 (10): 2493–2499.
- Legeai F, Gimenez S, Duvic B, *et al.* Establishment and analysis of a reference transcriptome for *Spodoptera frugiperda* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 704.
- Liu H, Lan T, Fang D, *et al.* Chromosome level draft genomes of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest in China [J]. *BioRxiv*, 2019: 671560.
- Liu S, Wang WL, Zhang YX, *et al.* Transcriptome sequencing reveals abundant olfactory genes in the antennae of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Entomological Science*, 2017, 20 (1): 177–188.
- Qi GJ, Ma J, Hu G, *et al.* Analysis of migratory routes and atmospheric features of the newly invaded fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in Guangdong Province [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 488–496. [齐国君, 马健, 胡高, 等. 首次入侵广东的草地贪夜蛾迁入路径及天气背景分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41 (3): 488–496]
- Sun JB, Liu NY, Li SM, *et al.* Molecular cloning, tissue expression profiling and binding characterization of the pheromone binding protein SlitPBP4 from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61 (6): 657–667. [孙佳斌, 刘乃勇, 李双美, 等. 斜纹夜蛾信息素结合蛋白 SlitPBP4 的分子克隆、组织表达谱及结合特性分析 [J]. *昆虫学报*, 2018, 61 (6): 657–667]
- Sun JS, Xiao S, Carlson JR. The diverse small proteins called odorant – binding proteins [J]. *Open Biology*, 2018, 8 (12): 180208.
- Sun L, Wang Q, Zhang Y, *et al.* The sensilla trichodea-biased EobIPBP1 binds sex pheromones and green leaf volatiles in *Ectropis obliqua* Prout, a geometrid moth pest that uses Type-II sex pheromones [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2019, 116: 17–24.
- Tian Z, Liu J, Zhang Y. Structural insights into *Cydia pomonella* pheromone binding protein 2 mediated prediction of potentially active semiochemicals [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22336.
- Unbehend M, Hänniger S, Meagher RL, *et al.* Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39 (3): 364–376.
- Vogt RG, Riddiford LM. Pheromone binding and inactivation by moth antennae [J]. *Nature*, 1981, 293 (5828): 161–163.
- Vogt RG, Große-Wilde E, Zhou JJ. The Lepidoptera odorant binding protein gene family: Gene gain and loss within the GOBP/PBP complex of moths and butterflies [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 62: 142–153.
- Walker WB, Roy A, Anderson P, *et al.* Transcriptome analysis of gene families involved in chemosensory function in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20 (1): 428.
- Wang C, Yang YH, Shen JM. Analysis of tissue expression patterns of three SlitPBPs in *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (2): 367–372. [汪超, 杨云惠, 申建梅. 斜纹夜蛾 3 种 SlitPBPs 的组织表达模式分析 [J]. *环境昆虫学报*, 2019, 41 (2): 367–372]
- Wang L, Chen KW, Zhong GH, *et al.* Progress for occurrence and management and the strategy of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (3): 479–487. [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]
- Wang JZ, Hu P, Luo YQ, *et al.* Identification and expression patterns of the pheromone binding protein genes AglaPBPI and AglaPBP2 in *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2017, 54 (1): 45–55. [王菁桢, 胡平, 骆有庆, 等. 光肩星天牛性信息素结合蛋白 AglaPBPI 和 AglaPBP2 基因鉴定和表达分析 [J]. *应用昆虫学报*, 2017, 54 (1): 45–55]
- Wu KM. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China [J/OL]. *Plant Protection*, 2020, <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/11.1982.S.20200226.0925.001.html>. [吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略 [J/OL]. *植物保护*, 2020, <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/11.1982.S.20200226.0925.001.html>]
- Wu YD, Shen HW, Zhang Z, *et al.* Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and counter measures to prevent

- its development [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (4): 599–604. [吴益东, 沈慧雯, 张正, 等. 草地贪夜蛾抗药性概况及其治理对策 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (4): 599–604]
- Yan WJ, Yang S, Wang YQ, *et al.* Comparison of the effectiveness of chemical and biological agents for the emergency control of *Spodoptera frugiperda* in the field [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2019, 56 (4): 788–792. [闫文娟, 杨帅, 王勇庆, 等. 草地贪夜蛾应急防控药剂田间药效筛选 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56 (4): 788–792]
- Yang LP, Song ZX, Li YH, *et al.* Evaluation of the trapping effect of different types of attractant cores and traps on *Spodoptera frugiperda* [J/OL]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20191111.0959.002.html>. [杨留鹏, 宋紫霞, 李拥虎, 等. 不同类型性诱剂诱芯及诱捕器组合对草地贪夜蛾诱集效果评价 [J/OL]. 环境昆虫学报, 2020, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20191111.0959.002.html>]
- Yang PY, Zhu XM, Guo JF, *et al.* Strategy and advice for managing the fall armyworm in China [J]. *Plant Protection*, 2019, 45 (4): 1–6. [杨普云, 朱晓明, 郭井菲, 等. 我国草地贪夜蛾的防控对策与建议 [J]. 植物保护, 2019, 45 (4): 1–6]
- Yang S, Cao D, Wang C, *et al.* Identification of genes involved in chemoreception in *Plutella xylostella* by antennal transcriptome analysis [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 11941.
- Yasukochi Y, Yang B, Fujimoto T, *et al.* Conservation and lineage-specific rearrangements in the GOBP/PBP gene complex of distantly related ditrysian Lepidoptera [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (2): e0192762.
- Ye ZF, Liu XL, Han Q, *et al.* Functional characterization of PBPI gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) by using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 8470.
- Yu Y, Zhou P, Zhang J, *et al.* Pheromone-binding proteins in the Asian gypsy moth females, *Lymantria dispar*, recognizing the sex pheromone and plant volatiles [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2018, 99 (1): e21477.
- Zhang Y, Yang B, Wang GR. Research progress of soluble proteins on chemosensation in insects [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 41 (2): 229–240. [张玉, 杨斌, 王桂荣. 昆虫嗅觉相关可溶性蛋白的研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41 (2): 229–240]
- Zhu GH, Xu J, Cui Z, *et al.* Functional characterization of SlitPBP3 in *Spodoptera litura* by CRISPR/Cas9 mediated genome editing [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 75: 1–9.