

基于微卫星标记的斜纹夜蛾 多次交配的亲权鉴定*

狄雪源^{1**} 李昊熙² 严 斌¹ 杨茂发^{1,2***}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州大学烟草学院, 贵阳 550025)

摘 要 【目的】明确斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 交配次数及交配顺序对父权分配的影响。【方法】利用微卫星标记对不同多次交配处理后的斜纹夜蛾子代进行亲权鉴定。实验筛选出 5 对微卫星标记, 共采集 271 头斜纹夜蛾样本, 其中母本 21 头, 父本 40 头, 子代 210 头。【结果】微卫星标记的等位基因数、期望杂合度、多态信息含量的平均值分别为 4.800、0.647、0.596。鉴定置信度均高于 80%, 其中 106 头的鉴定置信度超过 95%。斜纹夜蛾雌虫与 2 头雄虫分别交配 1 次, 后交配雄虫的子代父权比例为 78%; 雌虫与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一头雄虫交配 1 次, 2 头雄虫的子代父权比例均为 50%; 雌虫与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次, 后交配雄虫的子代父权比例高达 90%; 雌虫与 3 头不同雄虫分别交配 1 次, 3 头雄虫子代父权比例分别为 5%、20%和 75%。【结论】斜纹夜蛾交配次数和交配顺序均会影响父权比例。交配次数可以增加子代的父权比例, 后交配的雄性拥有更高的父权比例。

关键词 斜纹夜蛾; 微卫星标记; 亲权鉴定; 多次交配; 精子竞争

Using microsatellite markers to determine the paternity of *Spodoptera litura* (Fabricius)

DI Xue-Yuan^{1**} LI Hao-Xi² YAN Bin¹ YANG Mao-Fa^{1,2***}

(1. Institute of Entomology, Guizhou University; Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management in the Mountainous Region, Guiyang 550025, China; 2. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effect of mating frequency and male mating order on the paternity of *Spodoptera litura*, an important global agriculture and forestry pest. [Methods] Paternity was determined using five pairs of microsatellite markers. 271 samples were collected, including 21 from female parents, 40 from male parents and 210 from offspring. [Results] The average number of alleles, expected heterozygosity and polymorphism content information were 4.800, 0.647 and 0.596, respectively. Confidence in estimated paternity was overall > 80%; > 95% for 106 offspring. If a female mated once with two males, 78% of the resultant offspring were the progeny of the last male to mate. If a female mated with a male twice with a male, then with another male once, 50% of the offspring were the progeny of each male. If a female mated with a male once, then with another male twice, 90% of the offspring were the progeny of the last male to mate. If a female mated once with three different males, 5%, 20% and 75% of the offspring were the progeny of the first, second and last males to mate, respectively. [Conclusion] Both the frequency and order of mating affect paternity in *S. litura*. Males that mate more than once, and those that mate last, have more progeny than those that only mate once or that aren't the last to mate.

Key words *Spodoptera litura*; microsatellite marker; paternity identification; multiple mating; sperm competition

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31960540); 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才-CXTD[2021]004); 中国烟草总公司广西壮族自治区公司科技计划项目 (202145000024006)

**第一作者 First author, E-mail: xiaomdd@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: ggdgly@126.com

收稿日期 Received: 2022-09-08; 接受日期 Accepted: 2022-12-19

多次交配现象在昆虫中普遍存在 (Jennions and Petrie, 2000; Liu *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2014), 是昆虫繁衍后代采取的一种典型交配策略 (Omkar and Sahu, 2012)。交配频率在不同物种、不同性别间不同, 这是由交配的生殖成本差异造成的 (Liu *et al.*, 2010; Scharf *et al.*, 2013)。鉴于雌雄两性在配子上的差异, 一般来讲, 雌性的交配成本通常高于雄性 (Backhouse *et al.*, 2012)。雄性多次交配的益处显而易见, 雄性通常经过多次交配来增加其繁殖力, 多次交配对雄性有着较高的适合度益处 (Bateman, 1948)。而雌虫通常交配一次就可满足后代的繁殖, 但雌性与多头雄性交配的情况也普遍存在 (Meade *et al.*, 2017), 据此研究学者推测, 雌虫的受益会高于多次交付出出的代价, 这也是雌虫多次交配的驱动力 (Awad *et al.*, 2017)。

雌性与多头雄性交配后, 会发生精子竞争。雌虫以不同顺序与多头雄虫发生交配, 会导致雄虫精子在储精囊中位置变换从而影响与卵子的结合顺序, 最终形成不同的精子竞争结果。因此, 精子竞争受交配顺序及交配雄性数量的影响, 进一步影响雄性的父权比例 (Firman *et al.*, 2017)。很多种类的昆虫后交配雄性的精子有受精优先级 (Harari *et al.*, 2003; Calbacho-Rosa *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2021)。Pair 等 (1977) 报道了雌性烟草夜蛾 *Heliothis virescens* (Fabricius) 先与正常雄性交配后再与被节育的雄性交配, 其来自第一雄性的精子量减少了 90%, 然而, 在斜纹夜蛾的研究中却发现储精器中来自于早先交配雄性的精子量在新精子到来前就减少了 (Etman and Hooper, 1979)。精子竞争的具体方式目前仍然没有被证实。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae, 具有寄主范围广、抗药性强、暴发频率高、繁殖能力强等特点, 是一种世界性的重要农业害虫 (Ahmad *et al.*, 2007)。斜纹夜蛾成虫一生最多可交配 6 次, 平均交配 2.54 次, 存在多次交配行为 (Li *et al.*, 2012; Di *et al.*, 2020), 但其多次交配后父权鉴定研究少有报道。亲权鉴定也称亲子鉴定, 是在

DNA 水平利用分子遗传学、生物学技术手段判断亲代与子代是否具有血缘关系 (白玉妍, 2009)。微卫星 (Microsatellite) 标记是以少数核苷酸序列为重复单位组成的串联重复序列, 是一种多用途的用于解决群体遗传学和进化问题的分子标记手段, 在各种生物的父权鉴定中得到广泛应用 (Brante *et al.*, 2011)。为了解斜纹夜蛾多次交配后的父权分配情况, 本研究进行斜纹夜蛾多种交配处理, 采用微卫星标记手段与特异性引物标记相结合, 探索斜纹夜蛾交配次数和交配顺序对父权分配的影响。以期揭示精子竞争在父权关系中的作用, 为昆虫多次交配行为的进化机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

斜纹夜蛾幼虫采自贵州省麻江县滥坝村的烟田内, 带回实验室以烟草 *Nicotiana tabacum* (Linn.) 为食料在人工气候室建立实验种群。试虫在实验室连续饲养 30 代以上。温度 (27±1)℃, 相对湿度为 65%±5%, 光照周期 14L: 10D。

1.2 昆虫饲养

斜纹夜蛾卵块用 2%-3% 次氯化钠消毒, 取出后用无菌水冲洗, 再用滤纸将卵块表面水分吸干, 放于铺有湿润滤纸的培养皿中, 保鲜膜封口, 上扎 30 个小孔, 待卵粒变黑, 放入烟草叶片收集初孵幼虫。幼虫饲养于养虫盒 (35 cm×20 cm×12 cm) 中, 养虫盒底部铺一层经紫外线灭菌的土层, 厚度约 3 cm, 便于幼虫化蛹, 每天喷水保湿, 并更换新鲜的烟叶, 清理粪便。幼虫化蛹 2 d 后, 将蛹集中于土层表面, 鉴别雌雄。羽化成虫雌雄 1:1 配对饲养于 1 000 mL 塑料杯中, 用 200 目的纱网封口, 放入吸附 10% 蜂蜜水的棉球, 供其补充营养, 每天更换新棉球, 产卵后收集卵块继续饲养。

1.3 多次交配处理

处理 1: 雌虫与雄虫交配 1 次; 处理 2: 雌虫与 2 头不同雄虫分别交配 1 次; 处理 3: 雌虫

与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一头雄虫交配 1 次; 处理 4: 雌虫与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次; 处理 5: 雌虫与 3 头不同雄虫分别交配 1 次。各处理重复和取样数量见表 1。暗期在微弱红光下观察交配情况, 每隔 10 min 观察一次, 交配结束后将雌雄成虫分开饲养待取样, 记录交配次数。需要多次交配的处理在前一次交配结束后将雌雄成虫分开, 按上述处理继续提供新的雄虫供其交配直到满足各处理的交配次数。收集上述各处理的卵, 进行子代饲养。

1.4 斜纹夜蛾基因组 DNA 的提取

收集 1.3 各处理的交配试虫及其产生的子

代, 每个重复随机选取 10 头 3-4 龄子代试虫幼虫用于 DNA 的提取。

实验使用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司, 产品编号: B518251) 进行斜纹夜蛾亲代及子代基因组 DNA 的提取。幼虫剪取头部, 成虫剪取头部和足, 用液氮研磨成粉末加到 1.5 mL 离心管中, 按照试剂盒上的方法提取 DNA。

1.5 SSR 多态位点的筛选

微卫星引物均从斜纹夜蛾已开发的引物中进行选取 (Wu *et al.*, 2019), 从中选取多态性高的位点用于父权分析, 最终筛选出 5 对位点。各位点及引物序列详见表 2。

表 1 斜纹夜蛾多次交配各处理取样信息表
Table 1 Sampling information for each treatment of multiple mating of *Spodoptera litura*

交配处理 Mating treatments	母本数量 Number of female parents	父本数量 Number of male parents	子代数量 Number of offspring	取样总计 Total sampling	重复数 Number of replications
A	1	1	10	60	5
B	1	2	10	65	5
C	1	2	10	52	4
D	1	2	10	52	4
E	1	3	10	42	3

A: 雌虫与雄虫交配 1 次; B: 雌虫与 2 头不同雄虫分别交配 1 次; C: 雌虫与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一头雄虫交配 1 次; D: 雌虫与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次; E: 雌虫与 3 头不同雄虫分别交配 1 次。
A: Female mate with the male once; B: Female mate once with two different males, respectively; C: Female mate with one male twice and then another male; D: Female mate with one male once, and then with another male twice; E: Female mate once with three different males, respectively.

表 2 斜纹夜蛾微卫星引物信息
Table 2 Primer information for *Spodoptera litura* microsatellite markers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	重复碱基 Repeat motif	染料 Dye	片段长度 (bp) Size (bp)	退火温度 (°C) Annealing temperature (°C)
CWM-2	F: GCGTGAGGGAGCATTA R: TTGGGTGGATAGAATA	GTAT (10)	FAM	285-391	54
CWM-3	F: AAACAAGCAAAGTCAC R: GTACACCAATNTGAGA	GTAT (10)	VIC	429-515	46
CWM-4	F: AAAGGAAACGCAAGGCTCGT R: GATTTGTTATGGTACCGAAG	TG (8)	VIC	144-202	58
CWM-5	F: TTGTAATTGAATTCGTCA R: TAAAATAATCCCAGACCG	AT (8)	NED	239-289	46
CWM-6	F: GTAGTTACCGACCGAATG R: ATGGAGTTGGCTCTATGC	TG (10)	FAM	311-349	55

1.6 荧光标记引物 PCR 扩增

微卫星引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物扩增使用荧光染料染色,分别在其上游引物的 5'端上加上荧光修饰,使 PCR 产物上带有荧光标记(表 2)。PCR 扩增体系为 25 μ L,其中 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 13 μ L,上下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 9 mL。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 46-58 $^{\circ}$ C 退火 30 s (具体退火温度见表 2), 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 3 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。整个过程尽量避光,以免影响荧光效果。PCR 荧光产物各取 5 μ L 送至上海生工生物工程股份有限公司进行 STR 分型测序,样品中加入内标 LIZ500,在 3ABI3730XL 基因分析仪上进行分型。

1.7 数据分析

期望杂合度 (H_e) 是用一个无偏公式计算的等位基因频率来假设哈温平衡。期望杂合度是对位点信息含量的有用度量。期望杂合度高于 0.5 的位点意味着它没有受到高强度的选择,遗传多样性比较丰富。多态信息含量 (PIC) 是衡量微卫星位点变异水平的理想指标,多态信息含量 $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态性位点;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,微卫星标记能提供比较合理的信息,该位点为中度多态性位点;当 $PIC < 0.25$ 时,微卫星标记不能提供有用的遗传信息,该微卫星位点为低度多态性不适合用于遗传分析。非父排除概率是由一个特定的遗传标记检测是不是亲生父亲的男性排除概率,这是用来评价微卫星标

记在亲子鉴定中的鉴定能力(罗丹, 2014)。

使用 Geneious prime 软件查看测序结果,读取各位点的等位基因片段大小,确定位点是否具有多态性。将所有基因分型数据导入 Cervus 3.0.7 软件,利用 allele frequency analysis 功能分别分析各位点的期望杂合度 (H_e)、观测杂合度 (H_o)、无效等位基因频率、多态性信息量 (PIC) 和非父排除概率。使用 Cervus 3.0.7 软件的 simulation of parentage analysis 功能模拟抽样 10 000 次进行亲权鉴定,用似然法和排除法相结合的方法确定个体间的亲权分配。

2 结果与分析

本研究比较斜纹夜蛾多次交配 5 个处理总试虫 271 头,其中母本 21 头,父本 40 头,子代 210 头,得出 5 个多态性较好的微卫星位点。

2.1 等位基因频率

5 个微卫星位点共检测 24 个等位基因(表 3),等位基因数在 3-7 个。CWM-3 等位基因位点数最多,有 7 个;CWM-5 等位基因位点数量最少,仅 3 个。

2.2 微卫星位点多态性

结果表明,位点 CWM-5 的期望杂合度与观测杂合度差值最大,为 0.262。位点 CWM-2 及 CWM-4 差值均小于 0.1(表 4)。总体观察值与期望值差异较小,说明所选微卫星标记合理,可以比较准确的反应被检测斜纹夜蛾的遗传结构。结果显示,斜纹夜蛾各位点的多态信息含量均高于 0.5,因此实验群体有很高的多态性(表 4)。

表 3 微卫星位点的等位基因及基因频率
Table 3 Allele and gene frequencies of microsatellite loci

位点 Loci	等位基因数 Number of allele	等位基因及其频率 Alleles and allele frequencies				
CWM-2	5	313 (0.659 0)	317 (0.095 8)	341 (0.067 0)	349 (0.130 3)	353 (0.047 9)
CWM-3	7	439 (0.011 3)	443 (0.377 4)	447 (0.003 8)	471 (0.073 6)	479 (0.284 9)
		487 (0.228 3)	497 (0.020 8)			
CWM-4	4	168 (0.333 3)	170 (0.418 6)	176 (0.164 7)	180 (0.083 3)	
CWM-5	3	239 (0.505 7)	245 (0.226 1)	267 (0.185 6)		
CWM-6	5	323 (0.492 5)	325 (0.222 8)	329 (0.069 3)	331 (0.136 7)	339 (0.078 7)

表 4 微卫星引物的杂合度及多态信息含量
Table 4 The heterozygosity (*H*) and polymorphic information content (PIC) of polymorphic microsatellite loci

位点 Loci	观测杂合度 (<i>H_o</i>) Observed heterozygosity	期望杂合度 (<i>H_e</i>) Expected heterozygosity	多态信息含量 (PIC) Polymorphism information content
CWM-2	0.521	0.534	0.503
CWM-3	0.928	0.720	0.669
CWM-4	0.651	0.681	0.621
CWM-5	0.360	0.622	0.551
CWM-6	0.562	0.679	0.636

2.3 亲权鉴定

2.3.1 非父排除概率 非父排除概率> 99%时, 鉴定可信度达 98%-99%; 排除率< 90%时, 可信度较低, 需要对鉴定结果进行进一步验证。本研究结果中, 亲本两性基因型均未知情况下 (E-1P), 微卫星位点的排除概率为 70.0%-84.1% (表 5); 已知一亲本 (E-2P) 的微卫星位点排除概率为 52.9%-67.0%。5 个位点的累计频率满足亲子鉴定非父排除率不低于 99%的要求, 因此这 5 个位点足以对斜纹夜蛾进行亲子鉴定。

2.3.2 亲权鉴定结果 子代父权比例结果显示, 斜纹夜蛾不同交配次数和顺序, 其子代的父权比例不同 (图 1)。单一雌雄虫交配处理, 子代的父权 100%为与雌性交配的雄性; 与 2 头雄虫分别交配 1 次时, 先交配雄虫的父权比例为 22%, 后交配雄虫的子代父权比例达 78%; 雌虫与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一头雄虫交配 1 次, 2

头雄虫的子代父权比例为 50%; 雌虫与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次, 先交配雄虫的子代父权比例为 10%, 后交配雄虫的子代父权比例高达 90%; 雌虫与 3 头不同雄虫分别交配 1 次, 3 头雄虫依次子代父权比例分别为 5%、20% 和 75%。

3 讨论

多次交配是昆虫普遍存在的交配策略, 而雌性的多次交配会对遗传多样性的维持有重要影响, 也会导致子代群体的父权不同。当雄虫携带不同基因标记, 实验中后代可以通过基因型推判亲缘关系 (Śliwińska *et al.*, 2008)。此外, 雄性在多次交配中的顺序会影响父权关系 (Awad *et al.*, 2017)。交配后种内优先模式可能是由精子随机混合产生的, 衡量精子混合程度的最佳方法是对后代进行分析, 即进行父权鉴定 (Naud *et al.*, 2016)。

表 5 微卫星位点排除概率分析
Table 5 Exclusion probabilities of microsatellite loci

位点 Loci	排除概率 Exclusion probabilities					无效等位基因频率 Null allele frequency
	E-1P	E-2P	E-PP	E-1	E-S1	
CWM-2	0.841	0.670	0.483	0.248	0.546	0.032 1
CWM-3	0.700	0.529	0.351	0.129	0.423	-0.143 1
CWM-4	0.746	0.583	0.412	0.162	0.451	0.005 8
CWM-5	0.807	0.661	0.510	0.214	0.493	0.273 8
CWM-6	0.730	0.553	0.363	0.146	0.447	0.106 9

E-1P: 亲本基因型未知时的排除概率; E-2P: 已知一个亲本基因型的排除概率; E-PP: 一对亲本的排除概率; E-1: 两个无关个体排除概率; E-S1: 同一家系个体的排除概率。
E-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent; E-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; E-PP: Average non-exclusion probability for a candidate parent pair; E-1: Average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals; E-S1: Average non-exclusion probability for identity of two siblings.

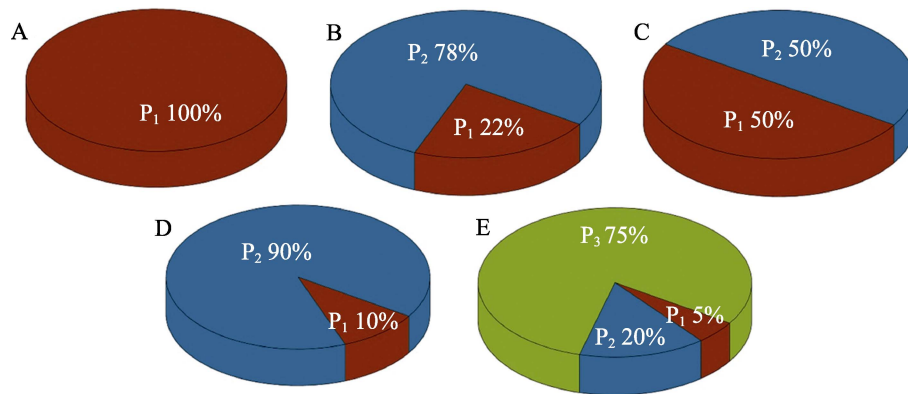


图 1 斜纹夜蛾不同交配处理的亲权鉴定结果

Fig. 1 Parentage analysis result of different treatments of *Spodoptera litura*

A. 雌虫与雄虫交配 1 次; B. 雌虫与 2 头不同雄虫分别交配 1 次; C. 雌虫与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一头雄虫交配 1 次; D. 雌虫与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次; E. 雌虫与 3 头不同雄虫分别交配 1 次。

P₁. 第一头与雌虫交配的雄虫所占父权比例; P₂. 第二头与雌虫交配的雄虫所占父权比例;

P₃. 第三头与雌虫交配的雄虫所占父权比例。

A. Female mated with the male once; B. Female mated once with two different males, respectively; C. Female mated with one male twice and then another male; D. Female mated with one male once, and then with another male twice;

E. Female mated once with three different males, respectively. P₁. The proportion of paternity attributable to the first male mated with the female; P₂. The proportion of paternity attributable to the second male mated with the female; P₃. The proportion of paternity attributable to the third male mated with the female.

在微卫星标记的筛选过程中, 多态性一直是为大家所关注的参数, 也是衡量微卫星质量好坏的标准之一。Wu 等 (2019) 筛选出 9 个斜纹夜蛾的微卫星标记。本研究选出其中 7 个多态信息含量位点较高的微卫星标记, 最终确定 5 个位点 CWM-2、CWM-3、CWM-4、CWM-5、CWM-6 用于亲权分析。用于本研究的位点 PIC > 0.5, 排除率 > 99%, 因此本实验所筛选的微卫星位点组合可以用于本群体的亲子鉴定, 且有较高的可信度。本研究通过不同交配次数及交配方式处理, 使用微卫星方法分析斜纹夜蛾多次交配后的父权分配。结果表明, 斜纹夜蛾多次交配时, 后交配雄性拥有精子优先权, 拥有更高的父权比例。

微卫星标记被广泛用于许多物种的种群遗传学研究、个体鉴定及亲权关系鉴定 (Garner *et al.*, 2000; Good *et al.*, 2006; Wusterbarth *et al.*, 2010; 王明明等, 2021; 周姝婧等, 2021)。谢苏等 (2019) 选取 14 个微卫星位点构建标记体系, 对 48 个猪样本进行家系分析, 累计排父率均大于 99.99%; Delghandi 等 (2017) 选取 7 个微卫星位点对热带大螯虾 *Panulirus homarus* 进行亲子鉴定, 明确了 83% 子代的亲本。本研究

发现斜纹夜蛾不同多次交配处理后其后交配雄性有更多的生殖优势。这与果蝇 *Bactrocera cacuminata* (Hering)、六斑月瓢虫 *Menochilus sexmaculatus* (Fabricius) 及水椰八角铁甲 *Octodonta nipae* (Maulik) 等的研究结果一致 (Song *et al.*, 2007; 张翔, 2015; Dubey *et al.*, 2018)。利用 7 个微卫星位点对果蝇的多次交配后子代亲权关系的研究发现, 最后交配的雄性为亲本的概率为 81.4% (Song *et al.*, 2007)。六斑月瓢虫的第 2 头交配雄性的亲权也高于第 1 头交配雄虫 (Dubey *et al.*, 2018); 水椰八角铁甲与 2 头雄虫交配后后代显著偏向后交配雄虫 (张翔, 2015)。相反, 对异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 的研究发现, 第 1 头雄虫比第 2 头雄虫更有生殖优势 (Awad *et al.*, 2017)。

多次交配后多数昆虫多表现为第 2 头雄虫的精子优先 (Birkhead and Hunter, 1990; Naud *et al.*, 2016)。第 2 头交配的雄虫可能会刺激雌虫将精子从精囊中排出, 从而得以使其精子优先受精。精子排出被认为是精子竞争及精子优先的机制 (Ueno, 1994)。随着交配间隔的增加, P₂ 值也会增加, 可能是因为首次交配的雄虫精子死

亡而不是精子消耗(周鹏, 2016)。也有研究发现, 延迟交配后, P_1 与 P_2 值相同(Dubey *et al.*, 2018), 这可能与延迟时间有关, 也可能是延迟交配后, 雄虫在精子置换过程中发生了精子混合。总之, 交配顺序和交配时间均会影响昆虫雄性的亲权比例。本研究中, 斜纹夜蛾的后交配雄性均拥有最高的父权比例。雌虫与 2 头雄虫分别交配 1 次, 后交配雄虫的父权比例为 78%, 而雌虫先与 1 头雄虫交配 2 次, 再与另一次雄虫交配 1 次时, 两头雄虫拥有相同的父权比例。表明重复交配也会增加斜纹夜蛾的父权分配比例。而当雌虫先与 1 头雄虫交配 1 次, 再与另一头雄虫交配 2 次时, 后交配的雄虫父权为 90%, 也高于分别与 2 头雄虫交配 1 次的父权比例。这一结果也证实了重复交配会增加其父权分配比例。

多次交配以及由不同父权所产生的遗传多样性, 是昆虫社会进化冲突的基础(Loope *et al.*, 2014)。通过行为学及遗传学分析同步验证, 才能揭示精子竞争及雌性隐秘选择在父权关系中的作用, 以揭示昆虫多次交配行为的进化机制(张秀梅等, 2016)。多次交配的斜纹夜蛾是否获得基因上的受益仍需进一步研究。本研究对斜纹夜蛾不同交配后的亲权关系的明确, 为进一步基因收益研究提供了基础。

参考文献 (References)

- Ahmad M, Arif MI, Ahmad M, 2007. Occurrence of insecticide resistance in field populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Crop Protection*, 26(6): 809–817.
- Awad M, Piálek L, Krejčí A, Laugier G, Nedvěď O, 2017. Paternity following multiple mating in ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology Control*, 62(3): 297–307.
- Backhouse A, Sait SM, Cameron TC, 2012. Multiple mating in the traumatically inseminating Warehouse pirate bug, *Xylocoris flavipes*: Effects on fecundity and longevity. *Biology Letters*, 8(5): 706–709.
- Bai YY, 2009. Parentage and genetic diversity studies in bluefox (*Alopex lagopus*) using microsatellite DNA markers. Doctoral dissertation. Heilongjiang: Northeast Forestry University. [白玉妍, 2009. 应用微卫星 DNA 标记进行蓝狐 (*Alopex lagopus*) 亲权鉴定和分子遗传多样性研究. 博士学位论文. 黑龙江: 东北林业大学.]
- Bateman AJ, 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(3): 349–368.
- Birkhead TR, Hunter FM, 1990. Mechanisms of sperm competition. *Trends in Ecology and Evolution*, 5(2): 48–52.
- Brante A, Fernández M, Viard F, 2011. Microsatellite evidence for sperm storage and multiple paternity in the marine gastropod *Crepidula coquimbensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 396(2): 83–88.
- Calbacho-Rosa L, Córdoba-Aguilar A, Peretti AV, 2010. Occurrence and duration of post-copulatory mate guarding in a spider with last sperm precedence. *Behaviour*, 147(10): 1267–1283.
- Delghandi M, Saif Nasser AI, Hinai M, Afzal H, Khalfan Al-Wahaibi M, 2017. Parentage analysis of tropical spiny lobster (*Panulirus homarus*) by microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 48(9): 4718–4724.
- Di XY, Liu JF, Wu CX, Yan B, Yu XF, Yang MF, 2020. Delayed mating with multiple partners decreases indexes of mating in female and male *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 49(4): 789–795.
- Dubey A, Singh S, Omkar, Mishra G, 2018. Paternity success in ladybirds: Function of mating interval and order. *Journal of Ethology*, 36(2): 151–159.
- Etman AAM, Hooper GHS, 1979. Sperm precedence of the last mating of *Spodoptera litura*. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(1): 119–120.
- Firman RC, Gasparini C, Manier MK, Pizzari T, 2017. Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(5): 368–382.
- Garner TWJ, Brinkmann H, Gerlach G, Meyer A, Ward PI, Spörri M, Hosken DJ, 2000. Polymorphic DNA microsatellites identified in the yellow dung fly (*Scathophaga stercoraria*). *Molecular Ecology*, 9(12): 2207–2209.
- Good JM, Ross CL, Markow TA, 2006. Multiple paternity in wild-caught *Drosophila mojavensis*. *Molecular Ecology*, 15(8): 2253–2260.
- Guo H, Zhang D, Wang L, Li W, He P, Näslund J, Zhang X, 2021. Sperm competition in golden cuttlefish *Sepia esculenta*: The impact of mating order and male size. *Aquaculture*, 530(1): 735–929.
- Harari AR, Landolt PJ, O'Brien CW, Brockmann HJ, 2003. Prolonged mate guarding and sperm competition in the weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.). *Behavioral Ecology*, 14(1): 89–96.
- Jennions MD, Petrie M, 2000. Why do females mate multiply? a review of the genetic benefits. *Biological Reviews*, 75(1): 21–64.
- Li C, Yu JF, Xu J, Liu JH, Ye H, 2012. Reproductive rhythms of the

- tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *GSTF Journal of Biosciences*, 2: 25–29.
- Liu XP, He HM, Kuang XJ, Xue F, Sen FS, 2010. Mating behavior of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Science*, 17(1): 61–66.
- Luo D, 2014. Parentage and genetic diversity studies in Luokeng Chinese crocodile (*Shinisaurus crocodilurus*) using microsatellite DNA marker. Master dissertation. Guilin: Guangxi Normal University. [罗丹, 2014. 基于微卫星标记的罗坑自然保护区饲养鳄鱼种群的父权关系和遗传多样性分析. 硕士学位论文. 桂林: 广西师范大学.]
- Loope KJ, Chien C, Juhl M, 2014. Colony size is linked to paternity frequency and paternity skew in yellow jacket wasps and hornets. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1): 1–12.
- Meade L, Harley E, Cotton A, Howie JM, Pomiankowski A, Fowler K, 2017. Variation in the benefits of multiple mating on female fertility in wild stalk-eyed flies. *Ecology and Evolution*, 7(23): 10103–10115.
- Naud MJ, Sauer WHH, McKeown NJ, Shaw PW, 2016. Multiple mating, paternity and complex fertilisation patterns in the chokka squid *Loligo reynaudii*. *PLoS ONE*, 11(2): 1–11.
- Omkar, Sahu J, 2012. Costs and benefits of reproduction in predaceous ladybird: Effect of multiple matings on reproduction and offspring development. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(2): 219–224.
- Pair SD, Laster ML, Martin DF, 1977. Hybrid sterility of tobacco budworm: Effects of alternate sterile and normal matings on fecundity and fertility. *Annals of the Entomological Society of America*, 70(6): 952–954.
- Scharf I, Peter F, Martin OY, 2013. Reproductive trade-off and direct costs for males in Arthropods. *Evolutionary Biology*, 40(2): 169–184.
- Śliwińska EB, Witek M, Skórka P, Osikowski A, Woyciechowski M, 2008. Frequency of multiple paternity in *Myrmica scabrinodis* from southern Poland. *Entomological Science*, 11(1): 127–129.
- Song SD, Drew RAI, Hughes JM, 2007. Multiple paternity in a natural population of a wild tobacco fly, *Bactrocera cacuminata* (Diptera: Tephritidae), assessed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 16(11): 2353–2361.
- Taylor ML, Price TAR, Wedell N, 2014. Polyandry in nature: A global analysis. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(7): 376–383.
- Ueno H, 1994. Intraspecific variation of P_2 value in a coccinellid beetle, *Harmonia axyridis*. *Journal of Ethology*, 12(2): 169–174.
- Wang MM, Wang SQ, Meng W, Jiang C, Jiang XF, Fu XW, Wang XQ, Wang XY, 2021. Genetic variation and population genetic structure of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, (Lepidoptera: Noctuidae), in Liaoning, based on microsatellite marker variation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(5): 1143–1151. [王明明, 王思琦, 孟威, 姜策, 江幸福, 付晓伟, 王小奇, 王兴亚, 2021. 基于 SSR 分子标记的辽宁地区甜菜夜蛾遗传变异与种群遗传结构. 应用昆虫学报, 58(5): 1143–1151.]
- Wusterbarth TL, King RB, Duvall MR, Grayburn WS, Burghardt GM, 2010. Phylogenetically widespread multiple paternity in New world natricine snakes. *Herpetological Conservation and Biology*, 5(1): 86–93.
- Wu HH, Peng W, Huang MS, Lei CL, 2019. Microsatellites reveal strong genetic structure in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3): 636–643.
- Xie S, Shen YQ, Chen YS, Huang T, 2019. Pigs paternity testing by using microsatellite markers analysis. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 38(8): 1596–1603. [谢苏, 沈永巧, 陈焱森, 黄涛, 2019. 利用微卫星标记进行猪亲子鉴定. 中国兽医学报, 38(8): 1596–1603.]
- Zhang X, 2015. Multiple-mating behavior and its reproductive benefit on *Octodonta nipea*. Doctoral dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [张翔, 2015. 水椰八角铁甲多次交配行为及其繁殖受益. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Zhang XM, Zhang DX, Wang L, 2016. Reproductive strategies of multiple mating and multiple paternity of aquatic animals. *Periodical of Ocean University of China*, 46(11): 22–31. [张秀梅, 张东雪, 王亮, 2016. 水生动物多次交配繁殖策略与多重父权研究进展. 中国海洋大学学报, 46(11): 22–31.]
- Zhou P, 2016. Reproductive behavior of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Master dissertation. Guiyang: Guizhou University. [周鹏, 2016. 桔小实蝇生殖行为研究. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州大学.]
- Zhou SJ, Zhu XJ, Xu XJ, Hu JJ, Yu YL, Zhu SY, Xiong CA, Zhou BF, 2021. Genetic diversity of *Apis cerana* in Guangxi, China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(3): 672–684. [周姝婧, 朱翔杰, 徐新建, 胡军军, 于瀛龙, 朱诗谣, 熊长安, 周冰峰, 2021. 广西东方蜜蜂遗传多样性分析. 应用昆虫学报, 58(3): 672–684.]