

王佳丽, 韦加奇, 孙志秀, 等. 入侵我国中南三省(区)草地贪夜蛾的单倍体型和群体遗传结构分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 9-16.
WANG Jiali, WEI Jiaqi, SUN Zhixiu, et al. Haplotype and genetic diversity analysis of *Spodoptera frugiperda* invading in three provinces of central and southern China[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 9-16.

入侵我国中南三省(区)草地贪夜蛾的单倍体型和群体遗传结构分析

王佳丽, 韦加奇, 孙志秀, 徐汉虹, 林 菲

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

摘要:【目的】揭示入侵我国中南三省(区)的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 种群间可能存在的遗传变异, 探讨其入侵来源、入侵路线和扩散方式, 为制定有效控制和阻击草地贪夜蛾的方案提供理论依据和遗传信息。【方法】利用分子标记技术从线粒体 DNA 和核 DNA 角度研究草地贪夜蛾种群的遗传多样性和种群结构。对采集自我国广东、广西和湖南 3 个省(区)的草地贪夜蛾, 利用 *COI* 和 *Tpi* 基因片段进行了单倍体型分析, 利用 9 个微卫星标记分析种群间的遗传结构和遗传多样性。【结果】供试样品中, 除了湖南张家界群体有 2 个样品为 *COI* 玉米型单倍体型、1 个样品为杂合型, 其他群体的个体均为 *COI* 水稻型单倍体型。基于 SSR 标记的群体遗传分析结果表明, 被检测的群体遗传多样性较巴西等国家的美洲群体低, 各群体遗传分化不明显。广东东莞群体与湖南张家界群体的遗传距离最近, 与广西南宁群体的遗传距离较远。【结论】遗传距离与实际距离之间不一定呈正相关, 通过遗传结构的分析有助于推测草地贪夜蛾扩散过程中, 天气背景场、地理隔离和人为传播各自所起的作用。入侵湖南省张家界的草地贪夜蛾出现了低频率 *COI* 玉米型和高频率的 *COI* 水稻型单倍体型, 说明虫源的非单一性; 草地贪夜蛾在入侵地定殖时间较短, 目前未形成明显的遗传分化。

关键词: 草地贪夜蛾; 单倍体型; SSR 标记; 遗传多样性
中图分类号: S511; S502 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2020)01-0009-08

Haplotype and genetic diversity analysis of *Spodoptera frugiperda* invading in three provinces of central and southern China

WANG Jiali, WEI Jiaqi, SUN Zhixiu, XU Hanhong, LIN Fei
(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】 To reveal possible genetic variation among *Spodoptera frugiperda* populations in three provinces of central and southern China, trace the invasion source and spread pathway of *S. frugiperda*, and provide the theoretical basis and genetic information for effectively controlling this insect. 【Method】 The samples of *S. frugiperda* were collected from Guangdong, Guangxi and Hunan of China. Haplotype analysis was carried out using *COI* and *Tpi* gene markers. Nine microsatellite (SSR) markers were used to analyze the genetic diversity and genetic structure of *S. frugiperda* populations. 【Results】 Expect that two samples of *S. frugiperda* populations from Zhangjiajie of Hunan were characterized to be *COI* corn strain and one sample to be hybrid strain, other samples were *COI* rice train. The results of SSR markers showed that lower genetic diversity was detected for each population compared with those in South America populations, and the genetic differentiation

across populations was no significant. However, the genetic distance was the nearest between Guangdong Dongguan population and Hunan Zhangjiajie population, and the farthest between Guangdong Dongguan population and Guangxi Nanning population. 【Conclusion】 There is no significant relationship between genetic distance and geographic distance. The genetic structure analysis helps to speculate on the role of weather background field, geographical isolation and human transmission in the process of *S. frugiperda* spread. *S. frugiperda* invading in central-south China might be original from multiple locations. The short time of *S. frugiperda* colonization in the invasive lands leads to the low genetic diversity. No obvious genetic differentiation has formed at present.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; haplotype; SSR marker; genetic diversity

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 原产于美洲热带和亚热带地区，是联合国粮农组织全球预警的重大害虫，2016 年开始横扫非洲、亚洲等 50 多个国家和地区^[1-3]。2019 年 1 月份入侵我国以来，已经蔓延到 21 个省份的 1 160 多个县（市、区），受害面积超过 56 万 hm^2 ^[4]。基于分子标记对草地贪夜蛾的寄主型和遗传结构进行分析，开展指纹图谱数据库构建、区域种群监测、入侵虫源追踪、遗传多样性评价，是科学制定草地贪夜蛾防控技术、保障农业生产安全和保证农产品质量的前提。

目前，对草地贪夜蛾的分子鉴定主要基于 *COI*（线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I）和 *Tpi*（Z 染色体上编码磷酸丙糖异构酶）2 个基因标记展开^[5-7]。基于 *COI* 基因片段序列，张磊等^[7]对草地贪夜蛾进行了准确的物种鉴定；陈冬平等^[8]发现了草地贪夜蛾与黏虫 *Mythimna separate* 的杂合子；徐丽娜等^[9]发现安徽省草地贪夜蛾样本中 86.23% 是水稻型、13.77% 是玉米型，而且安徽地区样品 *COI* 序列特征与美国佛罗里达州种群高度一致。基于 *Tpi* 基因序列的单倍型分析发现，入侵我国云南的草地贪夜蛾均为玉米型，入侵广东省广州市和安徽省的均为玉米型，且在第 126、127 位碱基为 GA/AT 杂合^[7-9]。*COI* 和 *Tpi* 这 2 种标记有机结合虽然能够提高鉴定的准确率，但是仍然无法全面了解草地贪夜蛾的群体多样性、群体遗传结构以及虫源动态。

SSR 标记（Single sequence repeat marker）具有在基因组中的随机分布性以及高水平的等位多态性，因此广泛用于生物多样性研究、品系分类、遗传图谱构建、分子标记辅助选择和比较基因组研究等领域^[10]。Arias 等^[11]基于来自 3 个地理群体的 15 个个体，利用焦磷酸测序法开发了 192 个 SSR 标记，用于美国草地贪夜蛾的群体遗传结构分析。Pavinato 等^[12]利用基因组富集的方法，开发了 6 个 SSR 标记，用于巴西草地贪夜蛾的群体遗传结构分析。Arias 等^[11]采用 9 个 SSR 标记对北美的草地贪夜蛾进行

遗传分析，结果表明该地区草地贪夜蛾经历了虫口的扩张，虽然基因流与氟苯二胺和氟苯脲敏感性之间不存在相关性，但是发现具有较高 LC_{50} 的群体扩散到其他的地区，并保持较高的抗性基因频率^[13]。

本研究拟通过 *COI* 和 *Tpi* 分子标记以及微卫星 DNA 标记，对入侵我国广东、湖南和广西 3 个省的 6 个市（区、县）的草地贪夜蛾进行分子鉴定，为监测虫源扩散规律、预测预警虫情和制定科学的防控方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫采集

本次供试草地贪夜蛾采集于广东省广州市花都区花山镇儒林村（GDHD）、湖南省张家界慈利县通津钱铺（HNZJJ）、广西南宁宾阳县古济（GXNN）、广东省东莞市（GDDG）、广东省清远市连山壮族瑶族自治县（GDQY）5 个地区玉米地和广东省韶关市翁源县（GDSG）甘蔗地。研究样品共有 42 份，均为 2~6 龄幼虫。样品采集时间为 2019 年 5 月 18 日至 6 月 19 日，寄主为喇叭口期的春玉米。单头活体幼虫采集后放入含有新鲜玉米叶片的 50 mL 离心管，带回实验室进行形态学鉴定，编号拍照后，对 3 龄以上幼虫切取头胸部，3 龄以下幼虫取整头虫体，放入 2 mL 离心管用液氮速冻，-80 °C 储存，用于 DNA 提取（表 1）。

1.2 *COI* 和 *Tpi* 基因片段序列的测定

DNA 提取采用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒（TIANGEN，中国），用于 PCR 扩增的 2 对引物序列为 *CO-A* 和 *Tpi*。PCR 扩增按照陈冬平等^[8]所建立的方法进行，采用 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase PCR（TaKaRa，日本）进行 PCR 扩增，反应体系包括 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase PCR（2×）10 μL ，上游引物和下游引物各 0.4 μL ，模板 1 μL ，加 ddH_2O 至 20 μL 。PCR 反应为：98 °C 预变性 2 min；98 °C 变性 10 s，60 °C 退火 15 s，72 °C

表 1 供试幼虫样本信息表
Table 1 Information of larva samples used in this study

样品编号 Sample code	采集地点 Sampling site	采集时间 Sampling date	虫态 Stage	寄主植物 Host	数量/头 Number
GDHD	广东省广州市花都花山镇儒林村	2019-05-10	幼虫	玉米	15
HNZJJ	湖南省张家界市慈利县通津钱铺	2019-05-20	幼虫	玉米	11
GXNN	广西壮族自治区南宁市宾阳县古济	2019-05-21	幼虫	玉米	7
GDDG	广东省东莞市	2019-05-01	幼虫	玉米	3
GDQY	广东省清远市连山壮族瑶族自治县	2019-06-16	幼虫	玉米	1
GDSG	广东省韶关市翁源县	2019-06-19	幼虫	甘蔗	5
合计 Total					42

延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。使用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段特异性后, PCR 产物由广州天一辉远基因科技有限公司进行切胶测序。

1.3 SSR 标记的筛选

参考 Arias 等^[13] 所采用的 12 对 SSR 标记, 随机选取 5 个样品进行引物筛选。选取其中扩增稳定、电泳条带清晰和多态性丰富的 9 对引物 spf05、spf1502、spf1592、spf1706、spf343、spf670、spf789、spf918 和 spf997 用于群体结构遗传分析。

SSR 引物筛选的 PCR 体系包括 TaKaRa *Taq* (5 U/μL) 0.125 μL, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL, 上游和下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物加入 6 μL 6×Loading buffer 后, 采用 6%(φ) 变性聚丙烯酰胺胶电泳检测。电泳在 DYCZ-30C 电泳槽 (北京六一) 中进行。上样 3 μL, 以 DL1000 为 DNA 分子量标准, 120 W 恒功率电泳 2 h 后, 银染显色。

1.4 SSR 标记的基因分析仪检测

本研究将 M13 通用接头序列 (TGTAACG-ACGGCC AGT) 加到每对 SSR 标记的正向引物的 5' 方向, 并合成带不同荧光基团的 M13 接头序列。带荧光的 PCR 产物经 DNA 测序仪 ABI 3730XL (Applied biosystems, USA) 进行荧光电泳检测, 并使用软件 GeneMarker V2.2.0 对原始数据进行条带分型。PCR 反应体系和扩增程序如下: 2×*Taq* PCR Master Mix 7.5 μL, 上游和下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至 10 μL。PCR 扩增流程: 96 ℃ 预变性 3 min; 96 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 12 ℃ 保存。取 3 μL 荧光 PCR 产物进行琼脂糖凝

胶电泳鉴定, 检测 PCR 条件是否单一、片段是否与预期一致, 混样上机检测。混样体系为 Hi-Di 甲酰胺 10 μL、内标 0.5 μL 和 PCR 产物 1.0 μL。

1.5 数据读取

使用 GeneMarker 软件, 导入基因分析仪上的原始结果文件, 根据位点信息设置分析 Panel; 使用 GeneScan 500 LIZ Size Standard 进行数据分析。核查 Size standard 评分, 剔除评分小于 0.8 的数据, 导出 Excel 格式的等位基因信息。

1.6 数据分析

利用 Lastergene 软件包对正反向测序序列进行人工拼接、峰型校正和序列比对。已经发布的草地贪夜蛾 *COI* 和 *Tpi* 基因序列从 GenBank 数据库下载。针对已报道的基于 *COI* 和 *Tpi* 基因序列的水稻型和玉米型单倍型特点, 分别进行差异位点分析, 确定本研究草地贪夜蛾的具体亚型。

用 GeneAIEx 软件计算各位点的观测等位基因数 (N_A)、有效等位基因数 (N_E)、Shannon 信息指数 (I)、观测杂合度 (H_O) 和期望杂合度 (H_E) 等参数; 使用 Phylip 软件的 UPGMA 方法根据 Nei' s 遗传距离矩阵绘制系统发育树; 遗传结构分析在 Structure 软件完成后, 用 Harvester 在线工具 (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/#>) 进行可视化, 最后利用自编程序获得 Structure 结构图。

2 结果与分析

2.1 *COI* 序列对草地贪夜蛾单倍型鉴定

利用 *COI-A* 引物对所采集的 42 份样品扩增, 得到预期大小为 543 bp 的单一特异性条带并进行双向测序。测序结果去除两端测序质量较低的序列后, 对 521 bp 的序列进行了分析。结果 (表 2) 发现, 42 份样品存在 3 种 *COI* 序列类型, 其中, HNZJJ-30#和 GDHD-7#两者之间存在 8 个 SNP 位点, 分别与草地贪夜蛾玉米型 (HM136592) 和水稻型

(HM136602) 相似性为 100%; 第 3 种类型是非草地贪夜蛾 *COI* 序列, 与陈冬平等^[8] 报道的 HD3#-2 序列完全一致, 与黏虫 *Mythimna separate* (KX863042) 对应的片段序列仅存在 1 个碱基的差异, 说明此前观察到的草地贪夜蛾和黏虫的杂合型在本研究也

能够检测到。在供试的样品中, 湖南张家界群体有 8 个样品为水稻型, 2 个为玉米型, 1 个为草地贪夜蛾水稻型和黏虫的杂合型, 其余群体均为水稻型单倍体型 (表 2)。

表 2 草地贪夜蛾 2 种单倍型 *COI* 基因序列多态性位点比较

Table 2 Polymorphic site distribution of <i>COI</i> gene sequence of haplotypes in <i>Spodoptera frugiperda</i> populations								
单倍体型 ¹⁾	多态性位点 Polymorphic site							
Haplotype	33	69	120	351	426	432	462	492
HM136592(CS)	T	T	C	T	T	C	C	T
HNZJJ-30#	T	T	C	T	T	C	C	T
HM136602(RS)	C	A	T	C	C	T	T	C
GDHD-7#	C	A	T	C	C	T	T	C

1) HM136592(CS): 草地贪夜蛾玉米型; HNZJJ-30#: 湖南张家界30#样本; HM136602(RS): 草地贪夜蛾水稻型; GDHD-7#: 广州花都7#样本

1) HM136592(CS): *S. frugiperda* corn strain; HNZJJ-30#: Sample 30# from Zhangjiajie of Hunan; HM136602(RS): *S. frugiperda* rice strain; GDHD-7#: Sample 7# from Huadu of Guangdong

2.2 *Tpi* 序列对草地贪夜蛾单倍型鉴定

基于 *Tpi* 序列对 42 个草地贪夜蛾样品进行序列分析, 结果见表 3。由表 3 可见, 检测样品的 *Tpi* 基因序列的差异位点主要发生在第 126 和 127 碱基处, 该位点存在玉米型 (AT)、水稻型

(GA) 和杂合型 (AT/GA) 3 种类型。在广东花都群体中存在 9 个 AT 型、3 个 GA 型和 3 个 AT/GA 型; 广东东莞和广东清远 2 个群体均为 AT 型; 湖南张家界、广西南宁和广东韶关 3 个群体存在 AT 型和 AT/GA 型。

表 3 *COI* 和 *Tpi* 标记鉴定的草地贪夜蛾 42 个样品单倍型样品数量

Table 3 The number of haplotype of 42 <i>Spodoptera frugiperda</i> samples identified by <i>COI</i> and <i>Tpi</i> markers						
采样地点 Sampling site	<i>COI</i> 标记 <i>COI</i> marker			<i>Tpi</i> 标记 <i>Tpi</i> marker		
	水稻型	玉米型	杂合型 (<i>S. f/M. s</i>)	玉米型 (AT)	水稻型 (GA)	杂合型 (AT/GA)
	Rice strain	Corn strain	Hybrid strain	Rice strain	Corn strain	Hybrid strain
广东花都 GDHD	15	0	0	9	3	3
湖南张家界 HNZJJ	8	2	1	6	0	5
广西南宁 GXNN	7	0	0	6	0	1
广东东莞 GDDG	3	0	0	3	0	0
广东清远 GDQY	1	0	0	1	0	0
广东韶关 GDSG	5	0	0	2	0	3
合计 Total	39	2	1	27	3	12

2.3 基于 SSR 标记的分析

2.3.1 SSR 标记多样性水平评估 9 对 SSR 标记的多样性参数见表 4。48 头草地贪夜蛾样品 (42 头为本研究收集的样品、6 头为陈冬平等^[8] 收集的样品) 共检测到 40 个等位基因, 平均每个位点检测到 4.40 个等位基因。其中, spf1592 位点上拥有最多的有效等位基因 (7 个), spf1706 位点上的等位基因仅有 2 个。各微卫星位点的表观杂合度平均值为 0.639, 预期杂合度平均值为 0.546。各位点等位基

因表观杂合度与预期基本一致, 符合 Hardy-Weinberg 平衡。

种内近交系数 F_{IS} 平均值为 -0.126, 依据 Nagylaki 等^[14] 理论, F_{IS} 为负数表明被检测的种群在 9 个 SSR 位点杂交现象严重, 尤其是在 spf918、spf343 和 spf789 位点更为明显。spf05 和 spf997 位点存在较高的 F_{IT} 值, 分别为 0.465 和 0.303, 说明在该位点可能存在近交现象。种群间分化系数 F_{ST} 在 0.094~0.244 之间, 平均值为 0.151, 表明仅有

15.1% 的遗传变异发生在种群间, 发生在种群内的遗传变异高达 84.9%。有研究表明, F_{ST} 大于 0.25 时, 种群间有极大的遗传分化; F_{ST} 在 0.15~0.25 之间时, 种群间明显分化; F_{ST} 在 0.05~0.15 之间时, 种群存在中等程度的分化; F_{ST} 小于 0.05 时, 种群间几乎无分化^[14-16]。依据上述标准, 在检测的 9 个位点处, spf05、spf1502、spf670、spf789 和

spf997 存在明显分化, 其余 4 个位点 spf1592、spf1706、spf343 和 spf918 为中度分化。
在种群的水平上, 种群间的基因流参数 N_M 范围在 0.205~2.407 之间, N_M 平均值为 1.594, $N_M>1$ 表明基因流足以防止遗传分化发生^[17], spf1502 和 spf997 基因流水平非常低, 种群在此位点非常容易因遗传漂变而分化。

表 4 9 个 SSR 位点的遗传变异参数、*F*-statistics 统计值和基因流¹⁾
Table 4 Indices of gene diversity, *F*-statistics values and gene flow deduced by nine SSR loci

SSR位点 Site	N_A	N_E	I	H_O	H_E	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_M
spf05	3.000	1.718	0.62	0.221	0.338	0.346	0.465	0.183	1.117
spf1502	3.500	1.832	0.647	0.323	0.334	0.035	0.271	0.244	0.773
spf1592	6.667	5.000	1.633	0.958	0.762	-0.258	-0.13	0.102	2.206
spf1706	2.167	1.283	0.337	0.217	0.186	-0.163	-0.048	0.099	2.269
spf343	4.667	3.524	1.291	0.92	0.686	-0.342	-0.188	0.115	1.929
spf670	5.500	3.887	1.376	0.824	0.681	-0.209	-0.015	0.160	1.312
spf789	5.500	4.340	1.437	0.93	0.707	-0.315	-0.111	0.156	1.357
spf918	4.167	2.737	1.125	0.824	0.608	-0.354	-0.227	0.094	2.407
spf997	4.500	2.856	1.135	0.536	0.612	0.125	0.303	0.204	0.976
平均值 Average	4.408	3.020	1.067	0.639	0.546	-0.126	0.036	0.151	1.594

1) N_A : 观测等位基因数; N_E : 有效等位基因数; I : Shannon信息指数; H_O : 表观杂合度; H_E : 预期杂合度; F_{IS} : 种群内近交系数; F_{IT} : 总近交系数; F_{ST} : 种群间分化系数; N_M : 基因流参数

1) N_A : Allele number; N_E : Effective allele number; I : Shannon index; H_O : Observed heterozygosity; H_E : Expected heterozygosity; F_{IS} : Inbreeding coefficient within population; F_{IT} : Total inbreeding coefficient; F_{ST} : Differentiation coefficient among populations; N_M : Gene flow among populations

2.3.2 群体多样性水平分析 广东清远因样品数目仅有 1 头, 不列入本项分析。由表 5 可见, 各群体的观测等位基因数 N_A 为 2.333~8.444, 平均为 4.407; 有效等位基因数 N_E 为 2.071~4.374, 平均为 3.020; Shannon 信息指数 I 为 0.649~1.594, 平均为 1.067; 表观杂合度 H_O 为 0.556~0.683, 平均为

0.640; 预期杂合度 H_E 为 0.389~0.685, 平均为 0.546; 固定指数 F 为-0.426~0.087, 平均为-0.252。各种群表观杂合度和预期杂合度没有明显差异, 说明各群体不存在连锁不平衡。除广东花都群体外, 其余群体的 F 均为负值, 表明广东花都群体的预期杂合度相对较高, 其余群体预期杂合度较低。

表 5 草地贪夜蛾群体遗传多样性指数¹⁾
Table 5 The genetic diversity indexes of *Spodoptera frugiperda* populations

地理种群 Population	N_A	N_E	I	H_O	H_E	F
广东花都 GDHD	8.444±0.784	4.374±0.728	1.594±0.188	0.629±0.085	0.685±0.074	0.087±0.069
湖南张家界 HNZJJ	5.222±0.76	3.467±0.518	1.300±0.166	0.657±0.100	0.640±0.066	-0.028±0.099
广西南宁 GXNN	4.778±0.572	3.412±0.479	1.285±0.145	0.683±0.111	0.651±0.058	-0.033±0.118
广东东莞 GDDG	2.333±0.441	2.071±0.370	0.649±0.183	0.556±0.157	0.389±0.101	-0.426±0.151
广东韶关 GDSG	4.000±0.601	3.126±0.631	1.111±0.174	0.644±0.093	0.578±0.072	-0.113±0.097
平均值 Average	4.407±0.554	3.020±0.482	1.067±10.162	0.640±0.119	0.546±0.076	-0.252±0.089

1) N_A : 观测等位基因数; N_E : 有效等位基因数; I : Shannon信息指数; H_O : 表观杂合度; H_E : 预期杂合度; F : 固定指数
1) N_A : Allele number; N_E : Effective allele number; I : Shannon index; H_O : Observed heterozygosity; H_E : Expected heterozygosity; F : Fixation index

2.3.3 群体遗传分化比较分析 各群体间的 Nei' s 标准遗传距离 (D) 和遗传相似性 (I) 见表 6。广东清远因样品数目仅有 1 头, 不列入本项分析。其余 5 个群体两两之间的 I 为 0.670~0.895, 均大于 0.6, 表明各种群之间遗传相似性较高。广东东莞群体和广西南宁群体之间的 D 最大 (0.400), 广东花都群体和湖南张家界群体之间的 D 最小 (0.111)。其中, 广

东花都群体与其他地理群体的 D 为 0.111~0.185, 均低于其他各群体间遗传距离。UPGMA 聚类分析显示 5 个群体聚合成为一个大的分支, 广东花都群体与湖南张家界群体形成一个最近的分支 (图 1)。2.3.4 群体间的主坐标分析 (PCoA 分析) PCoA 分析表明, 5 个群体在二维平面上主要分为 3 个区域 (图 2)。第 1 个区域以湖南张家界群体为主, 第

表 6 草地贪夜蛾不同地理种群的 Nei' s 遗传距离 (D) 和遗传相似性 (I)¹⁾

Table 6 Genetic distance (D) and genetic identity (I) between different geo-populations of *Spodoptera frugiperda*

种群 Population	花都 Huadu	张家界 Zhangjiajie	南宁 Nanning	东莞 Dongguan	韶关 Shaoguan
花都 Huadu		0.895	0.863	0.831	0.866
张家界 Zhangjiajie	0.111		0.798	0.781	0.814
南宁 Nanning	0.147	0.225		0.670	0.771
东莞 Dongguan	0.185	0.247	0.400		0.740
韶关 Shaoguan	0.144	0.206	0.260	0.301	

1)表中对角线以上为遗传相似性(I), 对角线以下为Nei' s标准遗传距离(D)
1)The genetic identity data(I) are located above the diagonal line, and Nei' s standard genetic distance(D) below the diagonal line

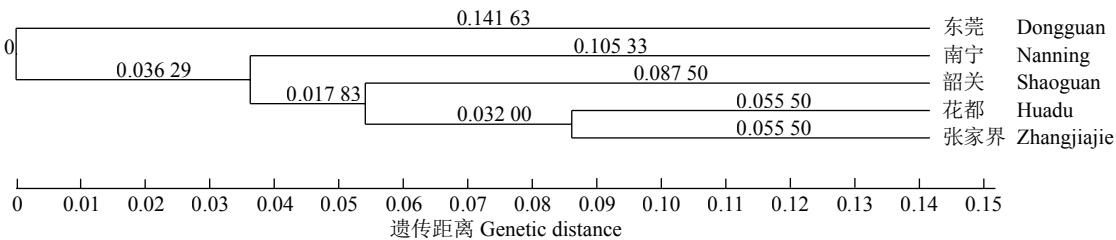
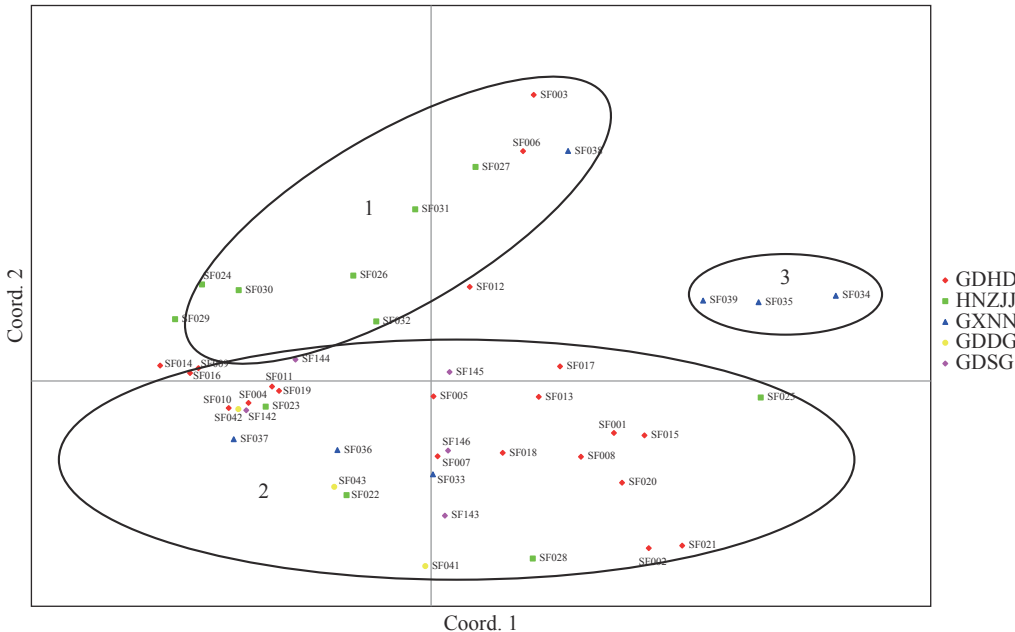


图 1 草地贪夜蛾群体间 Nei' s 标准遗传距离的 UPGMA 法聚类图

Fig. 1 UPGMA cluster analysis using the Nei' s standard genetic distance indices for *Spodoptera frugiperda*



1: 湖南张家界群体为主; 2: 广东三地群体为主; 3: 广西南宁群体为主

1: The populations were mainly from Zhangjiajie of Hunan; 2: The populations were mainly from three cities (district) of Guangdong; 3: The populations were mainly from Nanning of Guangxi

图 2 基于 SSR 标记的草地贪夜蛾群体的主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinate analysi based on SSR markers for *Spodoptera frugiperda* populations

2 个区域以广东省的 3 个地区群体为主, 混杂了湖南和广西的个体, 第 3 个区域为广西南宁群体的 3 个特殊个体 (SF039、SF034 和 SF05)。从 PCoA 分析图可以看出, 总体而言, 湖南张家界群体和广西南宁群体含有的特异遗传个体较多, 且后者的分布区域较为分散

2.3.5 群体遗传结果分析 42 个草地贪夜蛾的基因变异频率在 $K=3$ 时出现拐点, 此时 ΔK 值最大。当 $K=4$ 时, $\ln P(D)$ 取值较大且前后变化平缓, 由此将供试材料分为 3~4 个类群较为合理 (图 3 和图 4)。群体遗传结构的分析结果 (图 5) 表明, 3 种颜色表示所有样本可以分为 3 个群体以及每个样本种源基因所占的比例。3 个类群均包含了来自不同地理群体个体的遗传特征, 它们之间不存在显著的遗传分化。

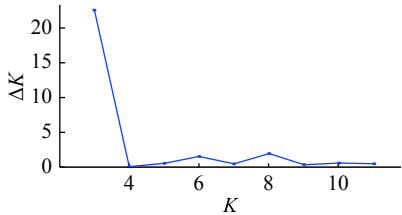


图 3 K 值与 ΔK 值折线图

Fig. 3 The broken line graph of ΔK and K values

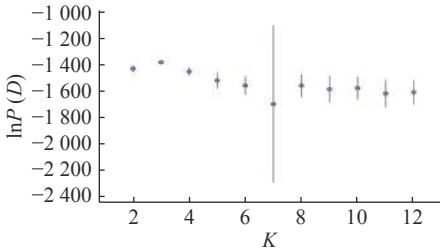


图 4 K 值与 $\ln P(D)$ 平均值

Fig. 4 The value of K and the mean of $\ln P(D)$

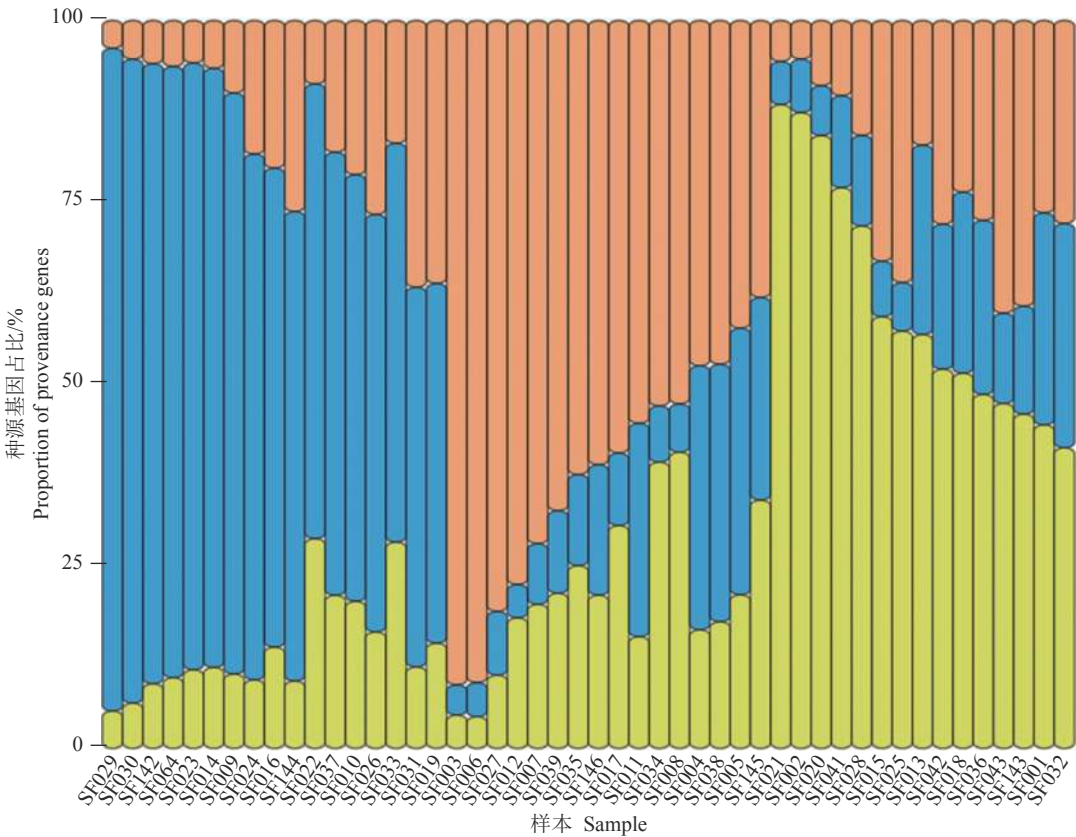


图 5 草地贪夜蛾群体遗传结构图 ($K=3$)

Fig. 5 Structure analysis for *Spodoptera frugiperda* samples

3 讨论与结论

3.1 单倍体型的鉴定

基于 *COI* 基因片段的序列, 对中南三省区的草地贪夜蛾单倍型的鉴定结果显示, 被检测的 42 个样品中, 39 个样品为水稻型单倍体型, 2 个样品为玉米型。2 个玉米型的个体均来自湖南张家界

群体, 说明入侵该地区的虫源可能不是单一的。在湖南张家界还检测到 1 个草地贪夜蛾/黏虫杂合型, 说明入侵的草地贪夜蛾能够与本地的近缘种黏虫发生杂交^[8]。

Tpi 基因片段测序的结果则显示, 成功测序的 42 个样品中, 27 个被鉴定为玉米型, 3 个为水稻型, 12 个为杂合型。与陈冬平等^[8]报道的结果相比, 广

东花都出现了水稻型单倍型纯合个体,说明入侵群体在繁殖的过程中逐渐纯化。

由于 *CO I* 基因位于线粒体基因组,具有母系遗传特征,因此母本水稻型和父本玉米型产生杂交,后代获得了水稻型线粒体的 *CO I* 基因序列, *Tpi* 核基因组在繁衍扩散过程中更多地保留了玉米型的基因组^[18]。大部分水稻型 *CO I* 单倍型个体的存在说明了该类型的雌虫在生存和交配中具有绝对的优势。

3.2 群体的遗传多样性与遗传结构

9 个 SSR 标记共检测到 40 个等位基因,平均每个位点检测到的等位基因数目为 4.40,低于 Arias^[13]报道的平均每个位点的等位基因数目为 6.49,暗示着群体的总体多样性比巴西群体低。

基因流是指生物个体从其发生地分散出去而导致不同种群间基因交流的过程,基因流的发生能够弱化群体间的遗传差异,使群体趋于一致。 $N_M > 1$ 时能有效抑制由于遗传漂移引起的遗传分化;当 $N_M < 1$ 时表明基因流不足以抵制种群内因遗传漂变引起的种群分化^[17]。5 个草地贪夜蛾群体间的 N_M 平均值为 1.594,说明各群体间的遗传分化不是很大。草地贪夜蛾入侵我国的时间较短,本次检测的样品大部分为当地初次发生的样品,因此未形成明显的遗传分化。

但是,广东东莞群体与广西南宁群体之间的遗传距离高于其与湖南张家界群体的遗传距离,且广东花都群体与湖南张家界群体聚类为一个最近的分支,说明可能受云贵高原的阻隔,从云南省入侵的草地贪夜蛾未能直线入侵湖南张家界,该地区的个体可能更多来自广东省群体的北迁,而广东群体可能由广西群体迁入。上述结果也说明,遗传距离与实际距离之间不一定呈正相关,天气背景场和地理隔离起更重要的作用。PcoA 分析发现来自广西南宁的个体一部分位于广东个体所在区域,一部分位于独立的区域,说明入侵广西的草地贪夜蛾来源可能并不单一。

明确草地贪夜蛾入侵我国后如何传播、迁移、扩散和定殖的问题,是科学制定预防和控制策略的迫切要求。本研究基于线粒体标记和核基因标记的分析,探讨了入侵中南三省(区)6 个地区的草地贪夜蛾的单倍型和遗传结构,为了解草地贪夜蛾的传播和扩散规律提供了遗传证据。后续研究将进一步提高样本的数量、地区和时间的代表性,为我国草地贪夜蛾群体的遗传分析积累基础性的数据。

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]. *Ann Entomol Soc Am*, 1980, 73(6): 722-738.

[2] 联合国粮食及农业组织. 秋粘虫[Z/OL]. [2019-07-08]. <http://www.fao.org/fall-armyworm/zh/>.

[3] UZAYISENGA B, WAWRU B, KAJUGA J, et al. First record of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), in Rwanda[J]. *Afr Entomol*, 2018, 26(1): 244-246.

[4] 魏启文. 草地贪夜蛾入侵中国 21 个省份, 如何快速监测识别仍是防控痛点[Z/OL]. [2019-07-08]. <http://finance.ifeng.com/c/7oNarkr1YVk>.

[5] HAJIBABAEI M, JANZEN D H, BURNS J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 968-971.

[6] NAGOSHI R N, GOERGEN G, TOUNOU K A, et al. Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3710.

[7] 张磊, 靳明辉, 张丹丹, 等. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定[J]. *植物保护*, 2019, 45(2): 19-24.

[8] 陈冬平, 陈志廷, 徐汉虹, 等. 不同分子标记对入侵广州草地贪夜蛾的寄主型鉴别能力比较[J]. *华南农业大学学报*, 2020, 41(1): 17-21.

[9] 徐丽娜, 胡本进, 苏贤岩, 等. 入侵安徽省草地贪夜蛾的遗传分析[J/OL]. *植物保护*, [2019-07-28]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019348>.

[10] ELLEGREN H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution[J]. *Nat Genet*, 2004, 5(6): 435-445.

[11] ARIAS R S, BLANCO C A, PORTILLA M, et al. First microsatellites from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics[J]. *Ann Entomol Soc Am*, 2011, 104(3): 576-587.

[12] PAVINATO V A C, MARTINELLI S, DE LIMA P F, et al. Methodology microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*[J]. *Gent Mol Res*, 2013, 12(1): 370-380.

[13] ARIAS O C E C. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Implications for insect resistance management programs[J]. *Pest Manag Sci*, 2019, 75(11): 2948-2957.

[14] NAGYLAKI T. Fixation indices in subdivided populations[J]. *Genetics*, 1998, 148(3): 1325-1332.

[15] 师沛琼, 杨茂发, 吕召云, 等. 贵州省烟青虫遗传多样性[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(9): 1836-1846.

[16] 吕召云, 杨茂发, 师沛琼, 等. 贵州省烟蚜遗传多样性分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(13): 2685-2694.

[17] SLATKIN M, BARTON N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. *Evolution*, 1989, 43(7): 1349-1368.

[18] 张磊, 柳贝, 姜玉英, 等. 中国不同地区草地贪夜蛾种群生物型分子特征分析[J/OL]. *植物保护*, [2019-07-08]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019296>.