

陈冬平, 陈志廷, 徐汉虹, 等. 应用不同分子标记鉴别入侵广州草地贪夜蛾的寄主型 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 17-21.
CHEN Dongping, CHEN Zhiting, XU Hanhong, et al. Host type identification of *Spodoptera frugiperda* invading in Guangzhou by different molecular markers[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 17-21.

应用不同分子标记鉴别入侵广州 草地贪夜蛾的寄主型

陈冬平, 陈志廷, 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】利用不同分子标记对入侵广州的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 进行寄主型鉴定, 以便监测虫源扩散规律以及预测预警虫情。【方法】对采集自广州花都玉米植株的草地贪夜蛾, 利用 3 个 *COI* 基因标记 COI-A、COI-B 和 COI-C, 以及 *Tpi* 基因标记进行鉴定, 并对结果进行比较。【结果】序列比对和寄主型分析显示, COI-A、COI-B 和 COI-C 标记鉴定到入侵广州的草地贪夜蛾为已报道的水稻型, 且 COI-A 标记鉴定到草地贪夜蛾与黏虫 *Mythimna separate* 的杂合子。基于 *Tpi* 基因的标记鉴定到入侵广州的草地贪夜蛾为玉米型, 且在第 126 和第 127 位碱基为 GA/AT 杂合。【结论】COI-A 标记具有较强的物种鉴别能力, 能够鉴定到草地贪夜蛾与其他近源种的杂交事件; *Tpi* 标记可用于鉴定草地贪夜蛾寄主型。2 个标记结合相互验证可以提高准确率。开发微卫星标记或者寄主取食功能性基因标记可以实现寄主型的精准鉴定。

关键词: 草地贪夜蛾; 分子标记; 寄主型; 鉴别能力
中图分类号: S511; S502 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0017-05

Host type identification of *Spodoptera frugiperda* invading in Guangzhou by different molecular markers

CHEN Dongping, CHEN Zhiting, 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】Different molecular markers were used to identify the host types of *Spodoptera frugiperda* which invaded Guangzhou, in order to monitor the diffusion of insect sources and to offer forecasting and early warning of insect conditions. 【Method】The host types of *S. frugiperda* collected from maize plants in Guangzhou were identified using three *COI* gene markers (COI-A, COI-B and COI-C) and the *Tpi* gene marker. The identification results were compared. 【Result】Based on sequence alignment and haplotype analysis, *S. frugiperda* samples invading Guangzhou were identified as the “rice strain” using COI-A, COI-B and COI-C markers. A sample was identified to be the hybrid of *S. frugiperda* and *Mythimna separate* using COI-A marker. *S. frugiperda* samples invading Guangzhou were identified as the “corn strain” using the *Tpi* gene marker, and the 126th and 127th bp were GA/AT heterozygous. 【Conclusion】The COI-A marker has relatively strong ability of species identification as it can identify the hybridization events between *S. frugiperda* and other close related species. *Tpi* marker can be used to identify host types of *S. frugiperda*. Combining the two markers will improve the identification accuracy. The development of microsatellite markers or functional gene markers related to host feeding would enable precise identification of the host types.

收稿日期: 2019-06-08 网络首发时间: 2019-06-17 14:24:11
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190617.1027.002.html>
作者简介: 陈冬平 (1993—), 女, 硕士研究生, E-mail: 2223884541@qq.com; 通信作者: 徐汉虹 (1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: hbxu@scau.edu.cn; 林 菲 (1977—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: resistanc@scau.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0200300)

Key words: *Spodoptera frugiperda*; molecular marker; host type; identification ability

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是一种原产于美洲的热带和亚热带地区的杂食性害虫, 严重威胁农业生产。其寄主范围广, 能够为害玉米、水稻、棉花、大豆等 80 多种作物^[1]。不同的草地贪夜蛾群体通常对特定作物具有取食趋性^[2]。田间草地贪夜蛾主要分为玉米型 (Corn strain) 和水稻型 (Rice strain) 2 个亚群^[3]。玉米型主要取食玉米、高粱、棉花, 而水稻型的取食性相对较为广谱, 主要取食水稻、苜蓿、牧草、小米等作物^[4]。除了取食偏好外, 2 个品系的草地贪夜蛾在生理特征、交配行为和性外激素的组成方面有很大的不同。但是, 由于 2 种寄主型形态学和行为方面的相似性, 在田间难以被区分开^[5]。因此, 对 2 种寄主型的草地贪夜蛾开展分子鉴定, 将有助于了解该入侵物种的遗传结构, 掌握害虫的入侵和扩散规律以及制定有效的防控策略^[6-7]。

草地贪夜蛾亚群的分类主要根据田间采集的幼虫寄主范围, 并结合分子标记的分化进行界定。基于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (*COI*) 的分子标记不仅能够区分玉米型和水稻型 2 个亚群的, 而且具备鉴别其亚型的能力, 是目前最常用的有效分子条形码^[7-10]。另外, 有研究表明, 根据 Z 染色体上编码磷酸丙糖异构酶基因 (*Tpi*) 开发的分子标记, 能够更好地鉴定到草地贪夜蛾雌性“水稻型”和雄性“玉米型”的杂交型^[7, 11]。2 种标记有机结合能够提高鉴定的准确率^[12-13]。

2018 年底草地贪夜蛾通过中缅边境进入我国境内, 目前已在云南、湖南、广西、广东等地发现其对玉米的为害^[14]。广东省是水稻主要种植区, 严密监测草地贪夜蛾是否存在为害水稻的风险显得尤为重要^[15]。另外, 广东省为热带和亚热带季风气候区, 草地贪夜蛾可在该省越冬, 是可阻止其北迁的桥头堡^[16]。本研究通过基于 *COI* 和 *Tpi* 2 个基因片段的分子标记, 比较它们对入侵广州的草地贪夜蛾的鉴别能力, 为监测虫源扩散规律以及预测预警虫情提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫采集

供试草地贪夜蛾于 2019 年 5 月 12 日在广州花都花山镇儒林村玉米地采集。寄主为喇叭口期的春玉米, 所有样本均为 4~6 龄幼虫, 6 个样本分别标记为 1#、2#、3#、4#、5# 和 6#。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后, 用液氮速冻储存于 -80 ℃ 用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取和扩增

采用 DNA/RNA 共提取试剂盒 (TIANGEN, 中国) 分别提取单头幼虫 DNA 和 RNA。虫体放入含有 1.5 mL DNA 抽提液的 2 mL 离心管内, 加入钢珠, 放入样品研磨机 (Bullet Blender®, 美国) 处理后, 按照试剂盒说明书操作。DNA 使用 NanoDrop 分光光度计 (2000, 赛默飞世尔) 测定质量浓度, 稀释到 10 ng/μL 后, 用作 PCR 扩增模板。

用于 PCR 扩增 *COI* 和 *Tpi* 部分基因片段的引物如表 1 所示, 选用的 PCR 引物在 *COI* 基因的相对位置如图 1 所示。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 ddH₂O 至 20 μL; PCR 反应为: 98 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。

表 1 扩增 *COI* 和 *Tpi* 基因片段所用引物
Table 1 Primers used for amplifying *COI* and *Tpi* gene fragments

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence
JM-76 ^[9]	GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAGG
JM-77	ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC
COI-F ^[12]	TTCGAGCTGAATTAGGGACTTC
COI-R	GATGTAAAATATGCTCGTGT
COI-893F ^[8]	CACGAGCATATTTTACATCWGCA
COI-1303R	CAGGATAGTCAGAATATCGACG
SfTpi-F ^[12]	GGTGAAATCTCCCCCTGCTATG
SfTpi-R	AATTTTATTACCTGCTGTGG

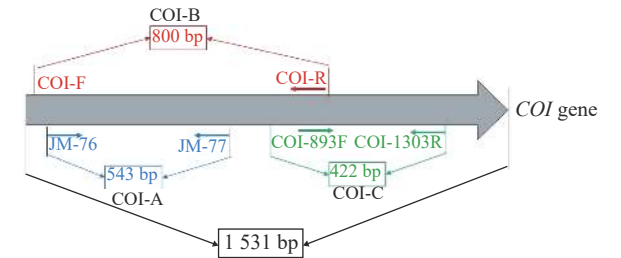


图 1 用于单倍型分析的 *COI* 基因 3 个片段
Fig. 1 Three fragments of *COI* gene used for haplotype analysis

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。对于测序结果为双峰或者低质量的样品, 则将其 PCR 产物克隆到 pEASY®-Blunt

Cloning Vector 后, 每个样品各挑取 10 个克隆进行测序。

1.3 序列分析

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。从 GenBank 数据库下载已经发布的草地贪夜蛾 *COI* 和 *Tpi* 基因序列。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, 确定本研究中草地贪夜蛾的具体亚型。

2 结果与分析

2.1 COI 标记鉴定草地贪夜蛾单倍型

利用标记 COI-A, COI-B 和 COI-C 对所采集的 6 个样品进行了寄主型分析。结果(图 2)显示, 有 5 个样品扩增出了预期大小的单一-特异性条带, 将其 PCR 产物用于直接测序。

对 COI-A 的序列分析表明, 来自 4 个样品 (1#、2#、4#、6#) 的序列与已报道的草地贪夜蛾水稻型 (HM136593) 仅存在一处碱基差异, 与玉米型 (HM136586) 存在 8 处单碱基差异, 说明根据 COI-A 标记鉴定的寄主型与实际样品来源寄主型并不一致 (图 3); 对样品 3# 的 COI-A 产物测序分析发现其为双峰杂合, 克隆重新测序后, 分别获得了样品 3#-1 和 3#-2 两种单倍型。其中, 3#-1 与上述 4 个样品

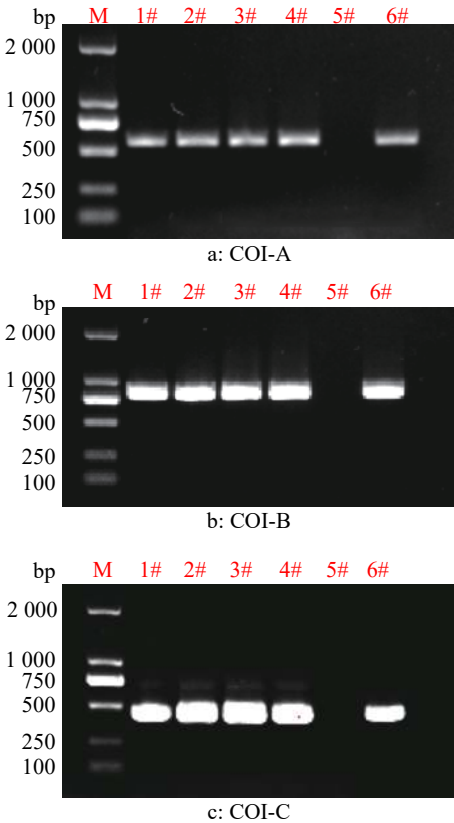
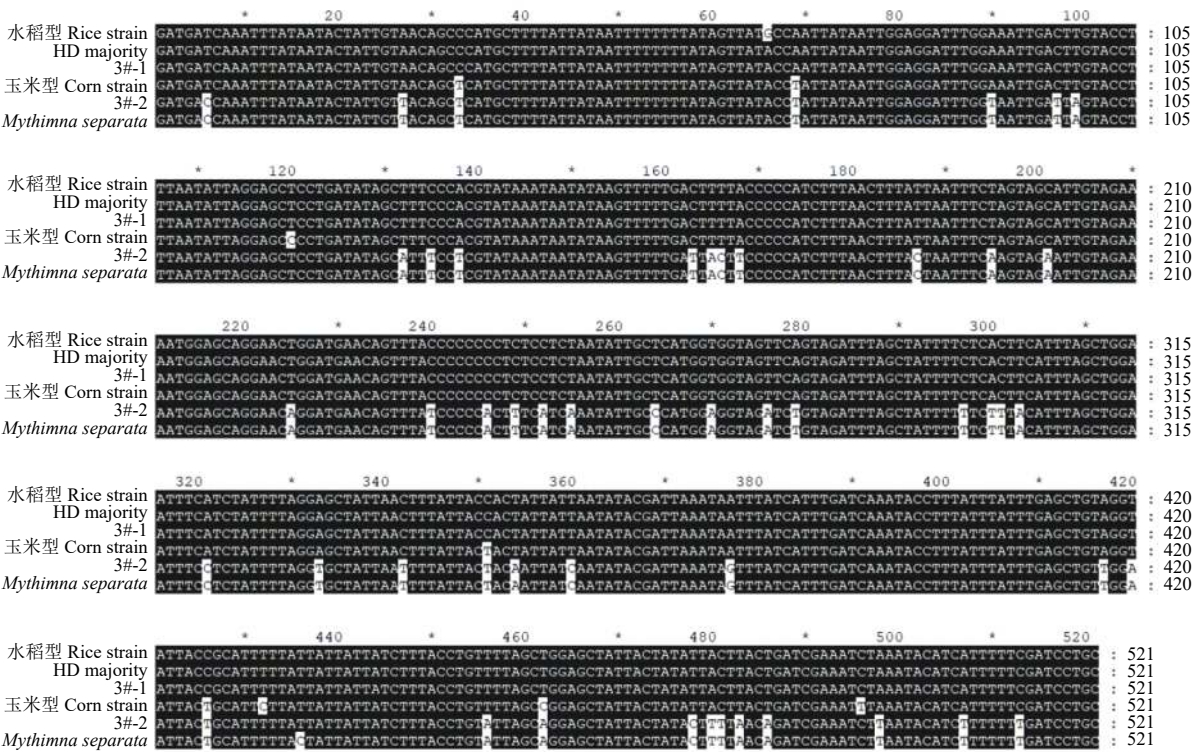


图 2 6 头草地贪夜蛾 COI-A、COI-B 和 COI-C 标记的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of COI-A, COI-B and COI-C markers from six *Spodoptera frugiperda*



HD majority: 花都检测到的主要单倍型; 3#-1, 3#-2: 样品 3# 的 2 种克隆类型

HD majority: Major haplotype in Huadu; 3#-1, 3#-2: Two types of clones from sample 3#

图 3 基于 COI-A 标记的单倍型序列比对

Fig. 3 Haplotype sequence slignments based on COI-A markers

检测到的单倍型完全一致, 3#-2 则与 *Mythimna separate*(KX863042) 对应的片段序列上存在 1 个碱基的差异, 说明 3#样品可能是草地贪夜蛾和 *M. separate* 的杂合 (图 3)。

进一步用 COI-B 和 COI-C 标记对样品进行寄主型鉴定, 结果表明, 除了样品 5#无法扩增出条带之外, 其余的 5 个样品均扩增出单一的预期条带。PCR 产物测序结果显示所测样品序列完全一致且为水稻型 (图 2)。

将 COI-A、COI-B 和 COI-C 等 3 个标记的结果相比较, 发现 COI-A 能够区分出草地贪夜蛾和 *M. separate* 的 2 种单倍型, 而 COI-B 和 COI-C 仅能区分出草地贪夜蛾 1 种单倍型, 说明虽然基于 *COI* 基因片段序列鉴定到的草地贪夜蛾寄主型与实际采集寄主种类不相符, 但是, COI-A 标记具有较好的物种鉴别能力, 能够区分出杂合类型。

2.2 TPi 标记鉴定草地贪夜蛾单倍型

基于 *Tpi* 基因片段对所采集的 6 个样品进行了寄主型分析。除了样品 5#无法扩增出条带之外, 其

余的 5 个样品均扩增出了预期大小的单一特异性条带 (图 4)。

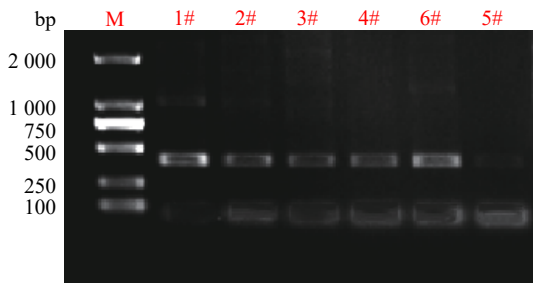
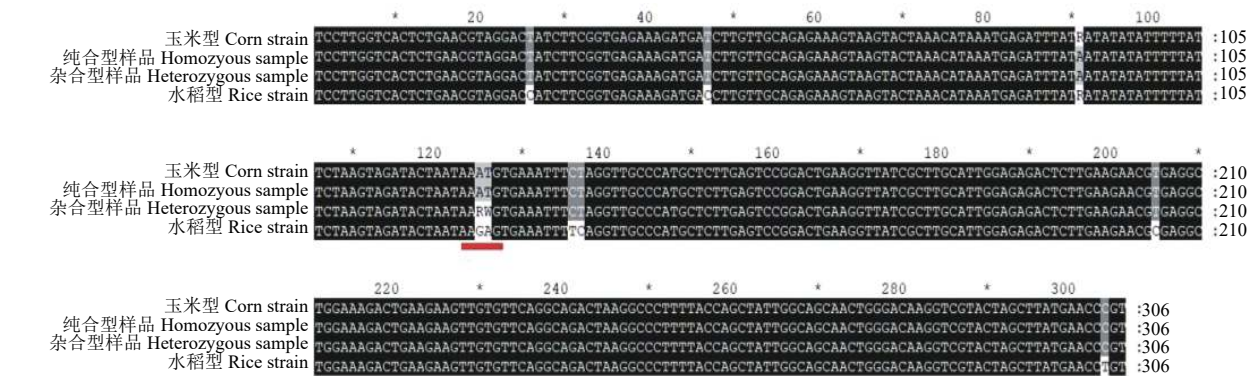


图 4 6 头草地贪夜蛾 *Tpi* 基因片段的 PCR 扩增
Fig. 4 PCR amplification of *Tpi* gene fragment from six *Spodoptera frugiperda*

对 PCR 产物进行双向测序并分析其序列差异, 结果显示, 所检测的序列与已报道玉米型一致, 说明基于 *Tpi* 基因片段的鉴定结果与样品的寄主来源是一致的。样品 2#和样品 3#, 在第 126 和 127 碱基处出现 GA/AT 的杂合双峰 (图 5), 说明入侵广东的草地贪夜蛾种类并不单一。



红色标记为花都样品 2#和 3#出现杂合 (RW) 的位置
Red line indicates the heterozygous base pairs (RW) in sample 2# and 3# from Huadu

图 5 基于 *Tpi* 基因标记的单倍型序列比对

Fig. 5 Haplotype sequence alignments based on *Tpi* gene marker

3 结论与讨论

本研究采集了入侵广州市的草地贪夜蛾样本, 利用基于 *COI* 和 *Tpi* 基因片段的分子标记进行了寄主型的鉴定。基于 COI-A、COI-B 和 COI-C 标记的鉴定结果均显示入侵广州的草地贪夜蛾寄主单倍型为水稻型, 与实际采集寄主不相符, 可能原因是该标记不适合于检测入侵广州的草地贪夜蛾群体。但基于 COI-A 的标记能够区分草地贪夜蛾与其他近源种的基因型, 为研究入侵草地贪夜蛾的田间行为和扩散提供丰富的信息。而 COI-B 和 COI-C 只鉴定到 1 种单倍型。COI-A 和 COI-B 标记事实上扩增的是 *COI* 基因的同一片段, 差别在于

COI-A 标记扩增的片段较小, 且使用的是简并引物。因此, COI-A 标记具有比 COI-B 标记和 COI-C 标记更强的鉴别能力。

Tpi 基因标记的鉴定结果显示入侵广州的草地贪夜蛾寄主型为玉米型, 与实际采集的寄主一致。基于 *Tpi* 基因标记, 入侵广州的草地贪夜蛾群体被检测到具有 2 种单倍亚型, 在该片段第 126 和第 127 位碱基具有 RW 杂合。先前报道的入侵云南的群体只有一种单倍型^[12], 说明草地贪夜蛾可能在扩散的过程中出现遗传杂交现象。

草地贪夜蛾是联合国粮农组织全球预警的跨国界迁飞性重大害虫。目前, 入侵我国的草地贪夜

蛾主要为害玉米, 未见在水稻上定殖为害。华南地区是我国水稻主产区, 应慎重评估草地贪夜蛾为害水稻的风险。对于“玉米型”和“水稻型”的区分, 仅依靠个别基因的片段进行评估是不全面的^[6]。基于微卫星标记的分子指纹分析可以较全面地了解草地贪夜蛾的遗传结构动态变化规律^[17]。获得与寄主取食相关基因的信息进而开发基因功能性分子标记, 是精准鉴定草地贪夜蛾寄主单倍型的前提^[18]。

参考文献:

[1] SPARKSAN. A review of the biology of the fall armyworm[J]. *Fla Entomol*, 1979, 62(2): 82-87.

[2] GOUIN A, BRETAUDEAU A, NAM K, et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges[J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7(1): 11816.

[3] DUMAS P, LEGEAI F, LEMAITRE C, et al. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: Two host strains or two distinct species?[J]. *Genetica*, 2015, 143(3): 305-316.

[4] MURÚA M G, NAGOSHI R N, DOS SANTOS D A, et al. Demonstration using field collections that Argentina fall armyworm populations exhibit strain-specific host plant preferences[J]. *J Econ Entomol*, 2015, 108(5): 203.

[5] UNBEHEND M, HÄNNIGER S, MEAGHER R L, et al. Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*[J]. *J Chem Ecol*, 2013, 39(3): 364-376.

[6] FOTSO KUATE A, HANNA R, DOUMTSOP FOTIO A R P, et al. *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Cameroon: Case study on its distribution, damage, pesticide use, genetic differentiation and host plants[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215749.

[7] 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.

[8] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, HAYROE M. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes[J]. *Ecol Evol*, 2012, 2(7): 1458-

1467.

[9] LEVY H C, GARCIA-MARUNIAK A, MARUNIAK J E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit i gene[J]. *Fla Entomol*, 2002, 85(1): 186-190.

[10] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, FLANDERS K, et al. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida[J]. *J Econ Entomol*, 2008, 101(3): 742-749.

[11] NAGOSHI R N, MEAGHER R L. Using intron sequence comparisons in the triose-phosphate isomerase gene to study the divergence of the fall armyworm host strains[J]. *Insect Mol Biol*, 2016, 25(3): 324-337.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析 [J]. 植物保护, 2019, 45(2): 1-6.

[15] NAGOSHI R N. Evidence that a major subpopulation of fall armyworm found in the Western Hemisphere is rare or absent in Africa, which may limit the range of crops at risk of infestation[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0208966.

[16] 吴秋琳, 姜玉英, 胡高, 等. 中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春夏两季迁飞轨迹的分析 [J]. 植物保护, 2019, 45(3): 1-9.

[17] 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]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(1): 370-380.

[18] do NASCIMENTO A R, FRESIA P, CÔNSOLI F L, et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 985.

【责任编辑 霍 欢】