

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.07.001

草地贪夜蛾研究专栏

草地贪夜蛾是一种联合国粮农组织全球预警的跨国迁飞性农业重大害虫,主要危害玉米、水稻和甘蔗等作物,危害巨大,自 2019 年 1 月份从东南亚飞入我国云南、广西,目前已扩散至 19 个省市自治区,虫害面积约 33.33 万 hm^2 。草地贪夜蛾侵入我国后,西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室迅速跟进研究,陆续取得一批研究成果。这些成果将第一时间在《西南大学学报》(自然科学版)陆续刊出,为我国草地贪夜蛾的防控提供最新的研究数据。

入侵重庆地区的草地贪夜蛾种群生物型鉴定^①

唐运林^{1,2,3}, 顾偌铤^{1,2,3}, 吴燕燕^{1,2,3}, 邹祥明⁴,
张 祯⁴, 牛小慧⁵, 王泽乐⁵, 陈 洁^{1,2,3}, 李 田^{1,2,3},
李春峰^{1,2,3}, 韦俊宏^{1,2,3}, 潘国庆^{1,2,3}, 周泽扬^{1,2,3,6}

1. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学 农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715;
3. 西南大学 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715;
4. 重庆市巫山县植保站, 重庆 巫山 404700;
5. 重庆市种子管理站, 重庆 401121;
6. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331

摘要:草地贪夜蛾是一种跨国迁飞性农业重大害虫,目前已在重庆的巫山、巫溪、云阳、北碚、潼南等地区出现并有迁飞的趋势。利用两个分子标记基因 *COI* 和 *Tpi* 对重庆地区采集的样本进行遗传特征比较,结果表明 *COI* 基因的亚型全为“水稻型”,而 *Tpi* 基因的亚型既有“水稻型”又有“玉米型”,说明入侵到重庆地区的草地贪夜蛾来源可能并不单一,暗示了重庆地区的草地贪夜蛾有可能存在分化为“水稻型”的风险。分析了入侵重庆地区的草地贪夜蛾相关的遗传特征,其结果不仅有助于认识草地贪夜蛾在中国大面积迁飞过程中发生的种群差异变化,也有利于农业部门根据重庆地区的地理环境属性,开展有针对性的监测防控工作。

关键词:重庆地区;草地贪夜蛾;单倍型;水稻型;玉米型

中图分类号: S433.4; Q969.436.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)07-0001-07

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*),又名秋黏虫、行军虫,起源于美洲,被联合国粮农组织称为“全球重大跨国迁飞性农业害虫”,对农作物的危害极大^[1]。其食谱广泛,主要包括禾本科、菊科和豆科植物,草地贪夜蛾幼虫喜食玉米、水稻和甘蔗等农作物,且主要啃食作物的幼嫩部分,具有严重的危害性。自 2019 年 1 月由东南亚入侵我国云南、广西以来,草地贪夜蛾随着温度的增加以及农作物的丰富逐渐向全国

① 收稿日期: 2019-06-28

基金项目: 中央高校基本科研业务费团队项目(XDJK2018AA001); 家蚕基因组生物学国家重点实验室自设课题(2019-03)。

作者简介: 唐运林(1993-),男,硕士研究生,主要从事昆虫肠道微生物研究;顾偌铤(共同贡献者)(1996-),男,硕士研究生,主要从事昆虫肠道微生物研究。

通信作者: 潘国庆,博士,研究员,博士研究生导师。

大面积迁飞,目前已迁飞至河南、山东等地区,对我国农作物产区存在着巨大的威胁.2019年5月已在重庆的巫山、巫溪、云阳、北碚和潼南等地区发现有草地贪夜蛾出现并有迁飞的趋势,入侵到重庆的草地贪夜蛾对当地的玉米生产造成了严重影响(图1).



A: 一龄幼虫; B: 三龄幼虫; C-F: 四龄至六龄幼虫.

图1 采自重庆巫山县玉米田中不同龄期的草地贪夜蛾幼虫

草地贪夜蛾幼虫头部均具有“Y”字纹,尾部有4个呈正方形排列的黑点,幼虫期与其他亲缘关系较近的鳞翅目昆虫有较为明显的差别^[2].野外采集的草地贪夜蛾主要分为“玉米型”(corn-strain)和“水稻型”(rice-strain)两个亚群体^[3],这两种基因亚型无法从形态学上分辨,但它们在生理特征、行为特征和取食倾向上有着较大差别^[4-5].此外,这两个基因型相互之间可以交配,产生杂合子^[6].其亚型可根据目前最常用于鉴定草地贪夜蛾的分子条形码,基于线粒体细胞色素C氧化酶亚基I基因(*cytochrome c oxidase subunit I*, *COI*)和Z染色体上编码磷酸甘油醛异构酶基因(*triose phosphate isomerase*, *Tpi*)进行鉴定区分^[7-12].本研究通过比较分析上述两个基因,鉴定了入侵重庆地区的草地贪夜蛾群体亚型,为开展防控以及分析草地贪夜蛾种群差异相关工作提供理论基础,对掌握侵入重庆市的草地贪夜蛾的遗传信息和制定相应的防治策略有重要意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的草地贪夜蛾幼虫及成虫,由重庆市巫山县植保站、巫溪县植保站和潼南区植保站提供,共33只,其中巫山21只,巫溪2只,潼南10只.样品采集于2019年6月14日至2019年6月21日,其中死虫浸泡于75%酒精中,从巫山采集的活虫置于培养皿中,喂食新鲜玉米叶,带回实验室后迅速对其进行形态学观察,随后置于液氮速冻后,在-80℃温度下储存,用于后续研究.

1.2 DNA提取和PCR扩增

用液氮将单头幼虫或成虫研磨成粉末状,以CTAB法提取DNA^[13],DNA用NanoDrop ND-2000仪器测定浓度.于-20℃储存用于后续实验.

分别用*COI*和*Tpi*基因的引物^[14]对所提取的草地贪夜蛾基因组DNA进行PCR扩增,基因组稀释到50 mg/L,使用Thermal scientific公司的Dream Taq酶进行扩增,扩增反应体系如下: Dream Taq 预混液

25 μL ; 上游引物/下游引物各 2 μL ; 草地贪夜蛾基因组 DNA 2 μL ; 补足 ddH₂O 至 50 μL . PCR 反应体系为 94 $^{\circ}\text{C}$, 8 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 用 1.5% 琼脂糖电泳检测, PCR 产物进行测序分析.

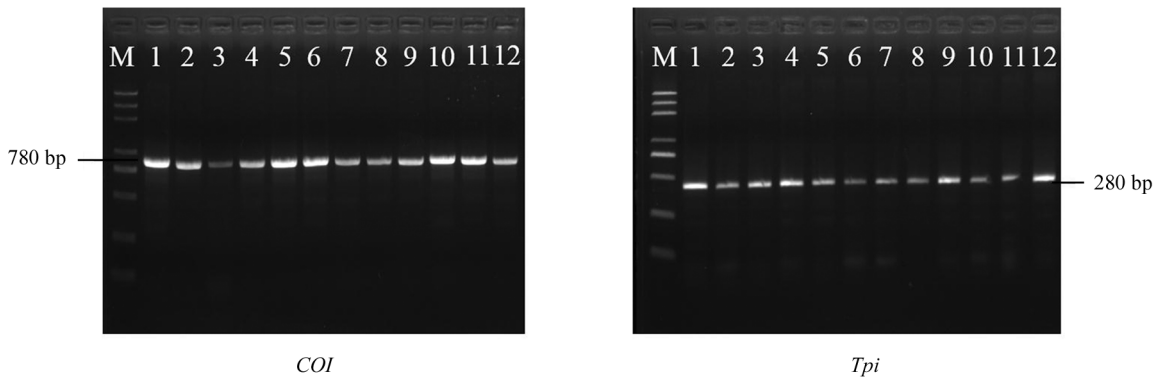
1.3 测序结果分析

在 GenBank 中下载已报道的草地贪夜蛾的 *COI* 和 *Tpi* 序列, 使用 MEGA 6.0 进行多重序列比对, 剔除冗余的低质量序列后, 进行进化树分析. 根据 *COI* 和 *Tpi* 基因具有“水稻型”和“玉米型”的亚型, 用 ClustalX(1.83) 软件分析所得序列的差异位点, 以判断重庆市分布的草地贪夜蛾的亚型.

2 结果与分析

2.1 *COI* 基因与 *Tpi* 基因的扩增

使用 *COI* 基因和 *Tpi* 基因的引物对提取的基因组进行 PCR 扩增, *COI* 基因扩增产物约为 780 bp, *Tpi* 基因扩增产物约为 280 bp, 共 22 份样本可以扩增出目的条带(图 2), 其中有 17 份样本两个基因均可扩增得到, 部分样品只能扩增出其中一个基因, 我们选择这 17 个样本的 PCR 产物进行测序分析.



M 为 Trans 2K Marker, 1-12 为巫山样品.

图 2 巫山县草地贪夜蛾 *COI* 基因与 *Tpi* 基因的扩增图

将得到的测序结果在 NCBI 中进行序列比对, 下载与之相似度较高的序列, 同时下载与草地贪夜蛾亲缘关系最近的鳞翅目昆虫, 如斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*) 等的 *COI* 序列, 以家蚕(*Bombyx mori*) 的 *COI* 序列作为对照, 用 MEGA 6.0 进行多重序列比对, 并构建进化树. 发现所有测序序列均与草地贪夜蛾聚为一枝, 其中巫山组样品的测序结果完全一致, 因此在后续进化树分析中以其中一组(Wushan-1) 为代表(图 3).

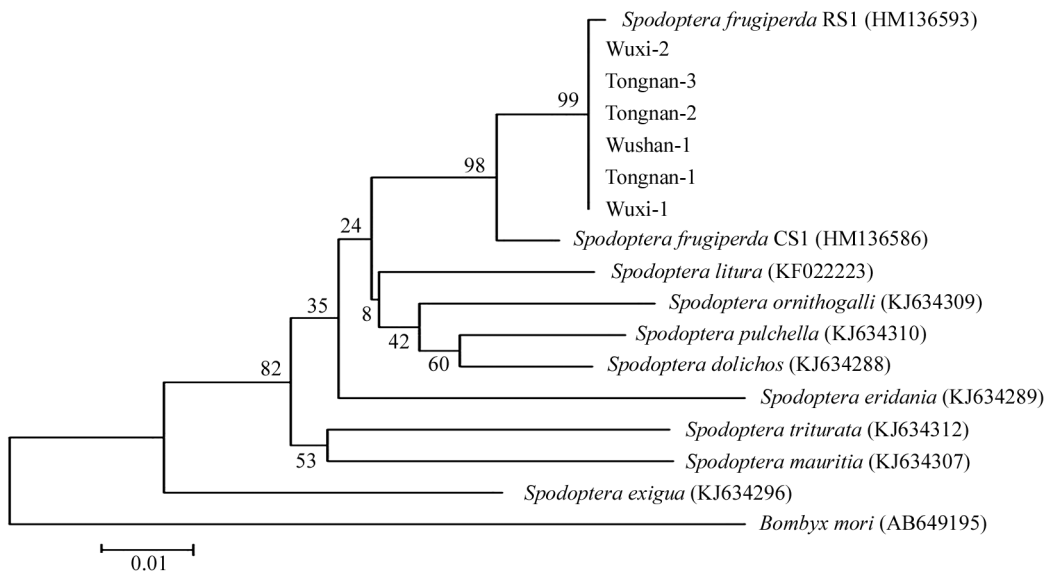
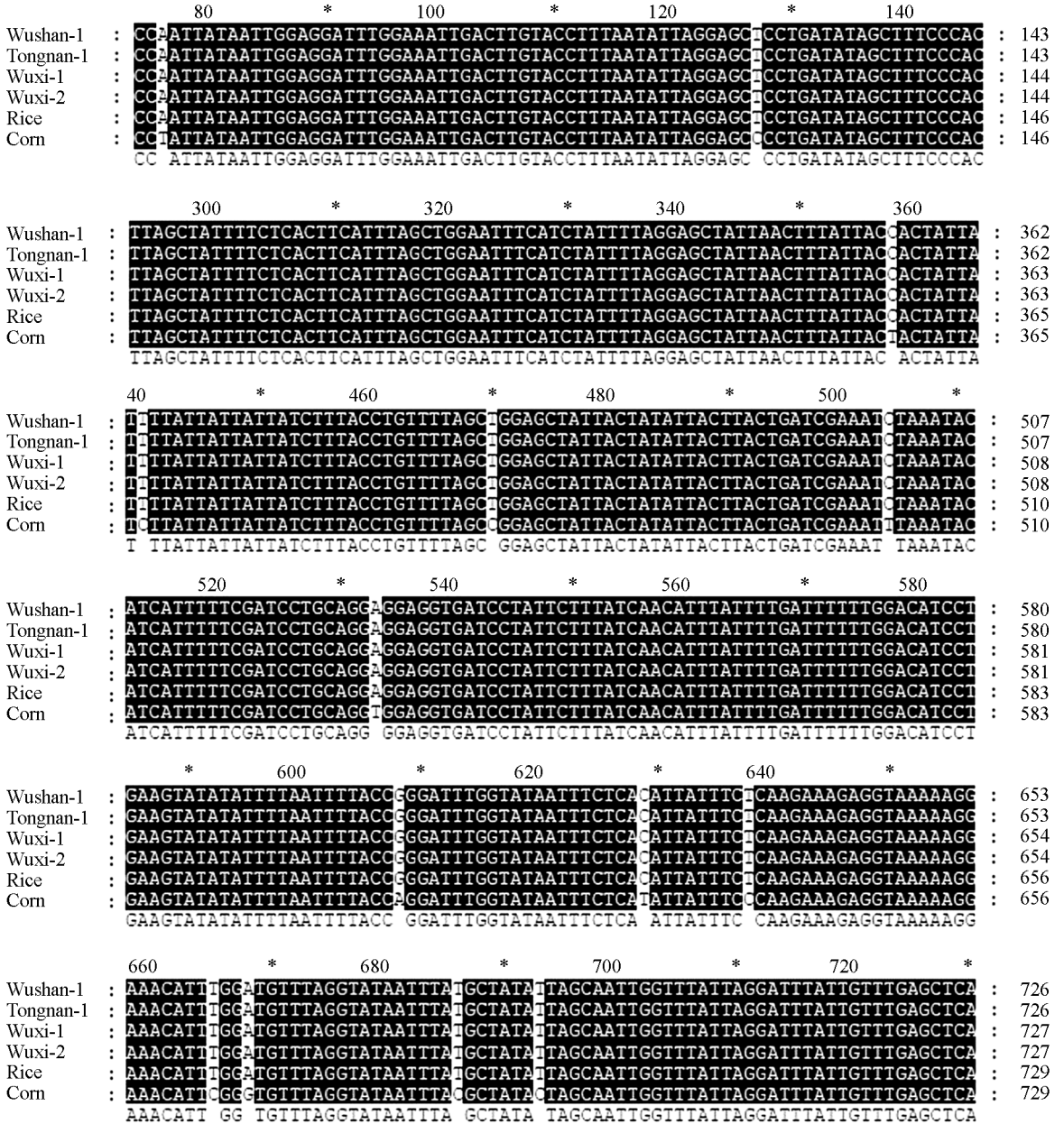


图 3 *COI* 基因的进化树

2.2 COI 基因与 Tpi 基因亚型鉴定

将测序得到的 COI 基因序列与草地贪夜蛾“水稻型”COI 基因(GenBank 序列号: HM136593)进行比对发现, 仅有 2 个样品与“水稻型”COI 基因有一个碱基的差异, 其余样品无差异. 而所有样品与“玉米型”COI 基因(GenBank 序列号: HM136586)相比, 有 14 个碱基的差异(图 4), 对这些序列做进化树分析, 发现序列全部归在了“水稻型”的基因型中(图 3), 表明了这批样品的 COI 基因亚型是“水稻型”.



Wushan: 巫山样品; Tongnan: 潼南样品; Wuxi: 巫溪样品; Rice: 水稻型; Corn: 玉米型.

图 4 入侵重庆地区的草地贪夜蛾 COI 基因的亚型鉴定

为了分析得到的 Tpi 基因序列具体的差异位点, 用 ClustalX(1.83)软件对序列进行比对分析, 发现来自巫山和巫溪的样品中, 124~125 位的碱基既有 GA 也有 AT(图 5), 该位点是“水稻型”和“玉米型”的差异位点之一, 表明入侵重庆的草地贪夜蛾可能存在“水稻型”与“玉米型”杂合型.

	* 20	* 40	* 60	* 80	* 100	* 120	* 140	* 160	*		
Wushan-12:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:172
Wuxi-2:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:173
Wuxi-1:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:172
Wushan-7:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:172
Tongnan-1:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:173
corn:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:173
rice:	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	:173
	CCTTGGTCACTCTGA	CCTAGGACATCTTCGCGT	GAGAAGATGTC	CTTGTTCAGAGAACTA	AGTACTAAACATAAAATG	GAGATTTATATATATATATAT	TTTTTATTCTAAGTAGATACT	AAATAAGTGA	AGTGAATTTCTAGGTTGCCCATG	CTCTTTCAGCTCCGGACTGAAGGTTAT	

Wushan: 巫山样品; Tongnan: 潼南样品; Wuxi: 巫溪样品; Rice: 水稻型; Corn: 玉米型.

图 5 入侵重庆地区的草地贪夜蛾 *Tpi* 基因的序列分析

3 讨 论

已有的报道表明,我国大部分地区发现的草地贪夜蛾的 *Tpi* 基因亚型大多为“玉米型”,少量为杂合“水稻型”,而 *COI* 基因既有“玉米型”又有“水稻型”^[15-16]. 在我们的研究中发现,入侵到重庆市巫山县、巫溪县和潼南区的草地贪夜蛾的 *COI* 基因仅存在“水稻型”亚型,说明迁飞到重庆的草地贪夜蛾的 *COI* 基因亚型多是“水稻型”. *Tpi* 基因的亚型中,有相当一部分的“水稻型”亚型的存在(23.53%). 此前在有关广州地区的报道中发现了杂合的“水稻型”*Tpi* 基因,但比例很低,而在更早时期在云南有关草地贪夜蛾的鉴定没有发现“水稻型”*Tpi* 基因^[15-16],暗示着入侵重庆的部分草地贪夜蛾可能来源于广州地区,并在迁飞过程中“水稻型”亚型与“玉米型”亚型交配,产生了杂合的“水稻型”*Tpi* 基因,但由于本研究样本量还不够大,还需要更大的样本量来确认重庆地区的 *Tpi* 基因“水稻型”亚型是否呈现较高比例. 尽管如此,“水稻型”*Tpi* 基因比例的升高值得引起我们的重视.

草地贪夜蛾的卵不滞育,无法越冬,需迁徙繁育. 有研究表明,草地贪夜蛾可以在北纬 29°到北纬 30°的地区越冬^[17],这暗示着草地贪夜蛾最北可以在四川省、重庆市、湖北省、湖南省、江西省、安徽省和浙江省的某些地区越冬. 我国南方地区是水稻的盛产地,面对可能出现的“水稻型”亚型的草地贪夜蛾的比例升高,需要加强对水稻产区的监测. 因此,如何在早期发现和鉴别草地贪夜蛾,并加强对草地贪夜蛾的防控是至关重要的.

目前,利用特定基因对物种进行分子鉴定是主流方法, *COI* 和 *Tpi* 基因作为 DNA 条形码足以对草地贪夜蛾进行物种鉴定,可以快速鉴定当地是否有草地贪夜蛾的入侵,为快速应对草地贪夜蛾的入侵提供了基础. 但是,对于草地贪夜蛾亚型的鉴定,仅仅依靠 *COI* 和 *Tpi* 这两个基因是不够的,由于这两个亚型之间不存在生殖隔离,它们交配会产生杂合型的基因,这对草地贪夜蛾亚型的判断会造成影响. 因此,对于这两种亚型的鉴定还需要从多个角度来进行验证,比如分析不同亚型的肠道微生物组成,阐明不同亚型取食倾向差异的机制等.

本文初步探讨了入侵重庆的草地贪夜蛾的群体亚型, *COI* 基因全为“水稻型”亚型, *Tpi* 基因主要为“玉米型”亚型,存在杂合的“水稻型”亚型. 因此,重庆市以及重庆以北省市未来对草地贪夜蛾的防控工作,不能仅仅局限于玉米产区,还要对水稻产区进行实时监控,长期监测草地贪夜蛾群体亚型的变化,警惕杂合“水稻型”亚型群体的扩大.

参考文献:

[1] NAGOSHI R N, FLEISCHERS, MEAGHER R L, et al. Fall Armyworm Migration across the Lesser Antilles and the Po-

- tential for Genetic Exchanges between North and South American Populations [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0171743-1-e0171743-18.
- [2] 郭井菲, 静大鹏, 太红坤, 等. 草地贪夜蛾形态特征及与 3 种玉米田为害特征和形态相近鳞翅目昆虫的比较 [J]. *植物保护*, 2019, 45(2): 7-12.
- [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] UNBEHEND M, HÄNNIGER S, MEAGHER R L, et al. Pheromonal Divergence between Two Strains of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(3): 364-376.
- [5] NAGOSHI R N, MEAGHER R L. Behavior and Distribution of the Two Fall Armyworm Host Strains in Florida [J]. *Florida Entomologist*, 2004, 87(4): 440-449.
- [6] KOST S, HECKEL D G, YOSHIDO A, et al. A Z-Linked Sterility Locus Causes Sexual Abstinence in Hybrid Females and Facilitates Speciation in *Spodoptera frugiperda* [J]. *Evolution*, 2016, 70(6): 1418-1427.
- [7] HAJIBABAEI M, JANZEN D H, BURNS J M, et al. DNA Barcodes Distinguish Species of Tropical Lepidoptera [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(4): 968-971.
- [8] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, HAY-ROE M. Inferring the Annual Migration Patterns of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from Mitochondrial Haplotypes [J]. *Ecology and Evolution*, 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]. *Florida Entomologist*, 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]. *Journal of Economic Entomology*, 2008, 101(3): 742-749.
- [11] NAGOSHI R N, MEAGHER R L. Using Intron Sequence Comparisons in *Thetriose-Phosphate Isomerase* gene to Study the Divergence of the Fall Armyworm Host Strains [J]. *Insect Molecular Biology*, 2016, 25(3): 324-337.
- [12] NAGOSHI R N. The Fall Armyworm Triose Phosphate Isomerase (*Tpi*) Gene as a Marker of Strain Identity and Inter-strain Mating [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2010, 103(2): 283-292.
- [13] ARSENEAU J R, STEEVES R, LAFLAMME M. Modified Low-Salt CTAB Extraction of High-Quality DNA from Contaminant-Rich Tissues [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(4): 686-693.
- [14] 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, 56.
- [15] 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*: 1-10 (2019-06-17)[2019-06-27]. <http://kns.cnki.net/KCM/detail/11.1982.S2019-0617.0915.001.html>.
- [16] 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/OL]. *华南农业大学学报*: 1-5 (2019-06-17)[2019-06-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20190617.1027.002.html>.
- [17] GARCIA G, GODOY C, THOMAS G, et al. Delimiting Strategic Zones for the Development of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on Corn in the State of Florida [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2018, 111(1): 120-126.

Biotype Identification of the Population of *Spodoptera frugiperda* That Migrated to Chongqing Area

TANG Yun-lin^{1,2,3}, GU Ruo-cheng^{1,2,3}, WU Yan-yan^{1,2,3},
ZOU Xiang-ming⁴, ZHANG Zheng⁴, NIU Xiao-hui⁵, WANG Ze-le⁵,
CHEN Jie^{1,2,3}, LI Tian^{1,2,3}, LI Chun-feng^{1,2,3},
WEI Jun-hong^{1,2,3}, PAN Guo-qing^{1,2,3}, ZHOU Ze-yang^{1,2,3,6}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China;

3. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Chongqing 400715, China;

4. Plant Protection Station of Wushan, Wushan Chongqing 404700, China;

5. Crop Seed Management Station of Chongqing, Chongqing 401121, China;

6. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: Fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*) is one of the most important agricultural pests, which has a great flight capacity. This insect pest is native to tropical and subtropical regions of the Americas, but recently it has been detected in Wushan, Wuxi, Yunyang, Beibei, Tongnan and other areas of Chongqing. It prefers corn, but can feed on more than 80 additional species of plants, including rice, sorghum and others. In an experiment reported herein, we compared the genetic characteristics of the pest samples collected from Chongqing by using two molecular marker genes (*COI* and *Tpi*). The results showed that all the samples belonged to Rice-strain when *COI* was used as the marker, and both Corn-strain and Rice-strain were present when *Tpi* was used as the marker, which suggested that the source of *S. frugiperda* might be variable, and that there is a potential risk of *S. frugiperda* differentiating into Rice-strain. The analysis of the genetic characteristics of *S. frugiperda* in Chongqing is helpful to working out corresponding prevention and control measures in combination with the geographical and environmental features in Chongqing, and sheds more light on the understanding of the population differences during the large-scale migration and flight of *S. frugiperda* in China.

Key words: Chongqing area; fall armyworm (FAW, *Spodoptera frugiperda*); haplotype; rice-strain; corn-strain

