

灯诱草地贪夜蛾的识别鉴定及交配状态分析

龚建福¹, 武晴雯¹, 王攀², 司升云², 蔡夫业³, 雷朝亮¹, 王小平^{1*} (1.昆虫资源利用与害虫可持续治理湖北省重点实验室, 华中农业大学, 湖北武汉 430070; 2.武汉市农业科学院蔬菜研究所, 湖北武汉 430345; 3.湖南本业绿色防控股份有限公司, 湖南怀化 418000)

摘要 [目的]明确诱虫灯能否有效地监测与防治草地贪夜蛾以及灯诱草地贪夜蛾的交配状态。[方法]从玉米田中灯诱得到疑似草地贪夜蛾成虫, 对其进行生殖系统解剖与分子鉴定, 明确其生物型、性别、交配及产卵状态。[结果]诱虫灯共诱捕到 43 头疑似草地贪夜蛾, 经分子鉴定, 确定其中 40 头是草地贪夜蛾; 灯诱草地贪夜蛾中, 雌虫全部已交配, 占总数的 62.5%, 其中已产卵雌虫占总雌虫的 88%, 单灯平均每晚诱捕已产卵雌虫 5.3 头, 交配未产卵雌虫为 1 头。[结论]草地贪夜蛾具有趋光性, 可使用灯光诱控技术对草地贪夜蛾进行监测或防控; 灯诱草地贪夜蛾雌虫中, 大部分都已交配产卵。

关键词 草地贪夜蛾; 灯光诱控; 形态识别; 分子鉴定; 交配状态

中图分类号 S433.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0147-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.034



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identification and Mating Status Analysis of *Spodoptera frugiperda* Captured by Light Trap

GONG Jian-fu¹, WU Qing-wen¹, WANG Pan² et al (1.Hubei Key Laboratory of Insect Resources Utilization and Pest Sustainable Management, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 2.Institute of Vegetables of Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430345)

Abstract [Objective] To clarify whether the light trap can effectively monitor and control *Spodoptera frugiperda* and analyze the mating state of the moth captured by light trap. [Method] The suspected adult of *S.frugiperda* were captured by light trap in the corn field, and analysis of anatomy of reproductive system and molecule information of the suspected moth were followed then, so that determining biotype identity, sex, mating and spawning status. [Result] The trap light captured a total of 43 suspected *S.frugiperda*, after molecular identification, it was determined that 40 of them were *S.frugiperda*. Among the *S.frugiperda* captured by light trap, the females all had mated, accounting for 62.5% of the total, and most of them had laid eggs, accounting for 88% of the total females, and there were 5.3 produced females and only 1 unfertilized females was trapped per night averagely. [Conclusion] This study states that the moth has phototropism and it can be monitored or controlled by light trap and most of the females had laid eggs.

Key words *Spodoptera frugiperda*; Light trap; Morphological identification; Molecular identification; Mating status

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Smith) 也称秋黏虫, 属鳞翅目夜蛾科, 广泛分布于美洲大陆, 是一种为害严重的杂食性农业害虫, 有“玉米型”和“水稻型”2 个生物型^[1]。近年来, 草地贪夜蛾的扩散范围与速率逐渐增大, 2018 年 5 月草地贪夜蛾入侵南亚的印度, 随后向周边国家蔓延^[2-3], 2019 年 1 月 11 日在我国云南省普洱市首次发现草地贪夜蛾^[4]。草地贪夜蛾具有繁殖力高、迁飞能力强及暴发为害等特点, 对我国的粮食作物安全生产造成严重威胁。

草地贪夜蛾入侵我国后, 国内专家在其迁飞扩散、鉴定识别、监测防控等方面迅速开展了大量工作^[5-7]。研究表明, 可应用黑光灯及性引诱剂来监测草地贪夜蛾成虫发生动态^[8]; 提出了可以通过种植抗性或耐受性的玉米品种, 利用天敌以及使用生物农药, 使用诱虫灯诱杀等防控草地贪夜蛾^[9]。灯光诱控技术具有使用方便、效果明显、易于大规模推广应用等特点, 被广泛用于很多农林害虫的防治和种群监测^[10]。截至目前, 国内外对利用灯光诱控来防治与监测草地贪夜蛾的研究不足, 国内虽提出使用诱虫灯防控草地贪夜

蛾, 但灯光诱控草地贪夜蛾如何识别, 灯光诱控技术能否应用于草地贪夜蛾的监测与防控, 尚需进一步明确。笔者利用试制的诱虫灯田间诱捕得到草地贪夜蛾成虫, 室内基于 *COI* 和 *Tpi 2* 2 个基因片段对其进一步分子鉴定和解剖观察其交配状态, 为明确灯光诱控在草地贪夜蛾监测与防治中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点和方法 试验在湖北省武汉市农科院蔬菜研究所的甜玉米地 (114.47°E、30.71°N) 进行, 面积约 3 000 m², 玉米苗株高 40 cm 左右。2019 年 9 月 3 日调查发现, 玉米田中有草地贪夜蛾卵块, 设置试制诱虫灯 (功率为 15 W) 诱集草地贪夜蛾成虫, 诱虫灯集虫口与地面距离约 1 m, 灯周围 100 m 内无高大建筑遮挡与大功率照明光源。2019 年 9 月 5—9 日连续开灯进行草地贪夜蛾诱捕试验, 试验期间天气晴朗无风, 开灯时间为 19:00 至次日 07:00。

1.2 草地贪夜蛾形态学鉴定 通常, 灯诱鳞翅目昆虫鳞粉多已掉落, 难以通过前翅准确鉴定。依据赵胜园等^[11]和郭井菲等^[12]报道的草地贪夜蛾形态特征, 观察诱集成虫的个体大小、后翅颜色与顶角处灰色斑纹及延伸位置 (图 1), 对灯诱草地贪夜蛾进行鉴定。

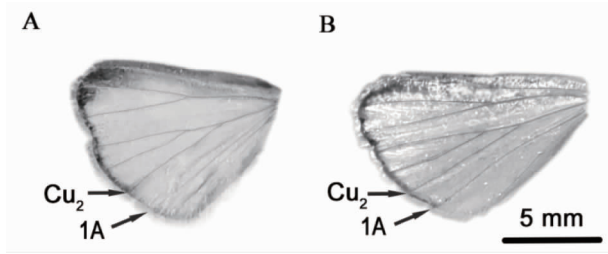
1.3 性别及雌虫交配产卵状态 对灯诱疑似草地贪夜蛾进行解剖, 根据生殖系统差异判别雌雄后, 参考赵胜园等^[13]的研究方法, 通过雌蛾交配囊状态判定其交配产卵情况。然后, 将单头样品迅速装入 2 mL 离心管, 液氮速冻后于 -80 °C

基金项目 国家重点研发计划项目“作物免疫调控与物理防控技术及产品研发”(2017YFD0200900); 湖北省农业科技创新行动项目“湖北省草地贪夜蛾防控技术集成与示范”(NYKJ2019011)。

作者简介 龚建福(1995—), 男, 江西上饶人, 硕士研究生, 研究方向: 农业昆虫与害虫防治。*通信作者, 教授, 博士, 从事蔬菜害虫突变机制与绿色防控研究。

鸣谢 华中农业大学硕士研究生陈浩、丰硕、黄梓杰参与灯光诱集和分子鉴定的部分工作。

收稿日期 2019-11-18



注:A为草地贪夜蛾后翅,其顶角灰色斑纹延伸至 Cu_2 脉;B为斜纹夜蛾后翅,其顶角灰色斑纹延伸至1A脉

Note:A is the hind wing of *S. frugiperda*, and its gray stripe of the apex angle extends to the Cu_2 vein; B is the hind wing of *S. litura*, and its gray stripe of the apex angle extends to the 1A vein

图1 草地贪夜蛾(A)与斜纹夜蛾(B)后翅形态比较

Fig.1 Comparison of hind wing morphology of *S. frugiperda* and *S. litura*

保存,用于种类及生物型的分子鉴定。

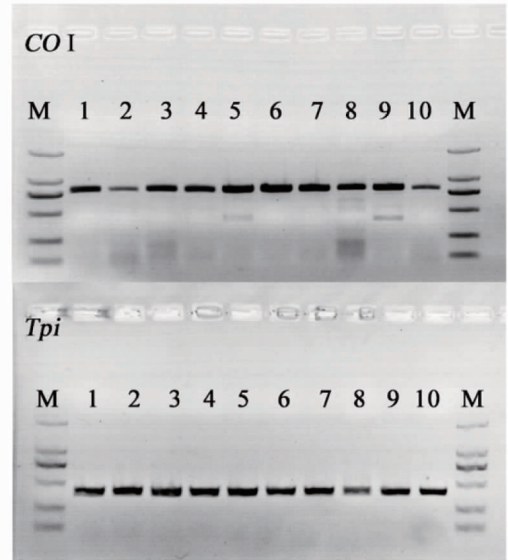
1.4 种类及生物型鉴定 研究表明,基于线粒体细胞色素C氧化酶亚基I(cytochrome oxidase subunit I, *COI*)基因序列分析可以准确鉴定草地贪夜蛾,以及位于Z染色体上的磷酸甘油醛异构酶基因(triose-phosphate isomerase, *Tpi*)可以鉴定其生物型^[14-15],故利用*COI*基因和*Tpi*基因对草地贪夜蛾进行分子鉴定。样品DNA的提取使用DNA试剂盒Animal Tissue DNA Kit(Simgen,中国),按照说明书进行操作。将得到的DNA产物作为PCR扩增的模板,参考张磊等^[6]的方法分别对*COI*基因和*Tpi*基因进行扩增,引物序列:*CoI*-F 5'-TTC-GAGCTGAATTAGGGACTC-3',*CoI*-R 5'-GATGTAAAATATGCTCGTGT-3';*Tpi*-F 5'-GGTGAAATCTCCCCTGCTATG-3',*Tpi*-R 5'-AAATTTTATTACCTGCTGTGG-3'^[16]。将PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后送擎科创新生物科技有限公司测序。

1.5 数据分析 在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中下载草地贪夜蛾与近缘物种*COI*基因序列,利用MEGA 7.0进行序列比对与构建系统发育进化树鉴定是否为草地贪夜蛾,比较*Tpi*基因序列的特异性碱基位点的差异,明确草地贪夜蛾“玉米型”和“水稻型”^[17]。采用SPSS 21.0软件对每晚诱虫灯捕获的草地贪夜蛾雌、雄及已产卵与交配未产卵雌蛾数量进行Student's *t* test 测验(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 灯诱草地贪夜蛾的物种分子鉴定 灯诱共获得43头疑似草地贪夜蛾成虫,依次编号为Wuhan1~Wuhan43,并基于*COI*基因和*Tpi*基因进行分子鉴定。PCR扩增结果显示,*COI*基因长度约800 bp,*Tpi*基因长度约400 bp,均与预期片段大小一致(图2)。通过测序得到所有样品*COI*基因片段和*Tpi*基因片段的准确序列,利用序列比对和从NCBI数据库中搜集到草地贪夜蛾近缘物种及鳞翅目其他昆虫的*COI*序列构建系统发育进化树(图3),发现Wuhan12、Wuhan15、Wuhan24与其余样品的*COI*基因、*Tpi*基因序列相似度低,BLAST结果显示其与斜纹夜蛾亲缘最近,系统发育进化树结果显示 Wu-

han12、Wuhan15、Wuhan24与斜纹夜蛾聚为一支,鉴定为斜纹夜蛾,而非草地贪夜蛾。其余40个样品的*COI*基因和*Tpi*基因的序列与草地贪夜蛾的相似度高达99%,确定为同一物种,选取样品Wuhan1作为代表进行系统发育进化树分析,样品Wuhan1与草地贪夜蛾聚为一支(图3),表明灯诱所得40个样品均为草地贪夜蛾。



注:M代表DL 2000 Marker,1~10为样品编号,*COI*基因长度约800 bp,*Tpi*基因长度约400 bp

Note:M represents DL 2000 Marker,1-10 as the sample number, and the length of *COI* gene is about 800 bp, and the length of *Tpi* gene is about 400 bp

图2 部分PCR扩增产物琼脂糖电泳检测

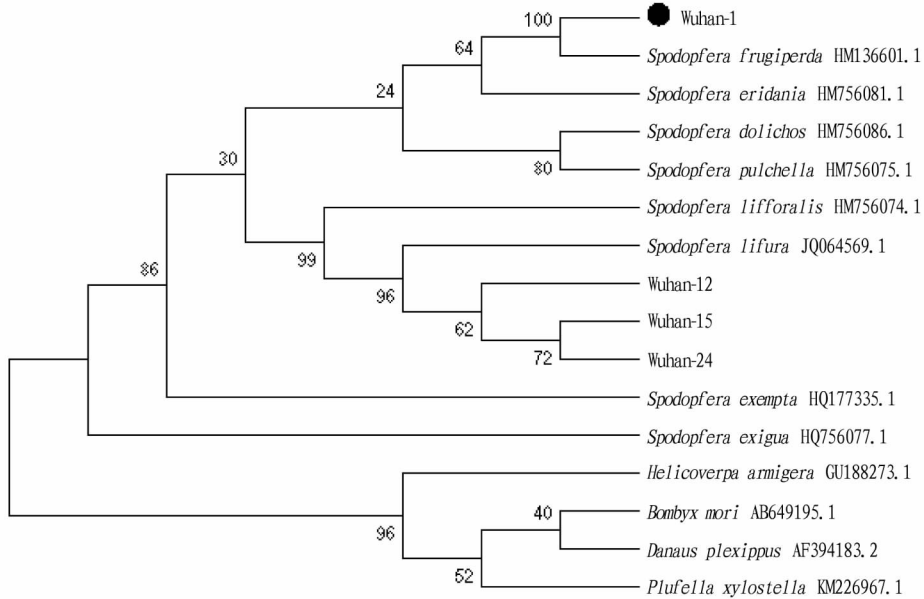
Fig.2 Gel electrophoresis of partial PCR products

2.2 灯诱草地贪夜蛾的生物型鉴定 分别将已确定40个草地贪夜蛾样品的*Tpi*基因序列与已发表2种生物型的*Tpi*基因序列进行比对分析,结果显示,在能够区分“水稻型”和“玉米型”的10个碱基位点中,确定为草地贪夜蛾的40个样品与“玉米型”完全一致(图4),表明灯诱的草地贪夜蛾样品均为“玉米型”。

2.3 灯诱草地贪夜蛾的性别及交配产卵状态 对分子鉴定确定的40头灯诱草地贪夜蛾分析表明,雄虫占37.5%,雌虫占62.5%,雌虫全部已交配,其中大部分已产卵,占总雌虫的88%。单灯每晚平均诱捕草地贪夜蛾10头,其中,雌虫6.2头,雄虫3.8头,二者无显著差异($t = 1.109, P = 0.348$);单灯每晚平均诱捕已产卵雌虫5.3头,交配未产卵雌虫1头,二者差异显著($t = 4.490, P = 0.021$)(图5)。

3 讨论

利用诱虫灯控制农林害虫高效、环保,极大地减少了农业生产中化学农药的施用。草地贪夜蛾成虫具有较强远距离飞行能力,成虫在产卵前可迁飞500 km^[18]。国外利用诱虫灯研究草地贪夜蛾扩散能力的试验表明,诱虫灯对草地贪夜蛾成虫的诱捕率与释放距离有关,但总体诱捕效果不佳^[19]。与国外研究结果较为类似,该研究表明诱虫灯可诱捕到草地贪夜蛾成虫,但诱捕效率低,每晚单灯诱捕成虫仅



注: *Spodoptera frugiperda*. 草地贪夜蛾; *Spodoptera eridania*. 亚热带黏虫; *Spodoptera dolichos*. 甘薯黏虫; *Spodoptera pulchella*. 加勒比黏虫; *Spodoptera littoralis*. 海灰翅夜蛾; *Spodoptera litura*. 斜纹夜蛾; *Spodoptera exempta*. 莎草黏虫; *Spodoptera exigua*. 甜菜夜蛾; *Helicoverpa armigera*. 棉铃虫; *Bombyx mori*. 家蚕; *Danaus plexippus*. 黑脉金斑蝶; *Plutella xylostella*. 小菜蛾

图 3 COI 基因系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of COI gene

<i>Tpi-corn</i>	CCCTGCTATGATTAAGGACATCGGAGCCAACTGGGTCATCCTTGGTCACTCTGAACGTAGGACATCTTCGGTGAGA	77
<i>Tpi-Wuhan</i>	CCCTGCTATGATTAAGGACATCGGAGCCAACTGGGTCATCCTTGGTCACTCTGAACGTAGGACATCTTCGGTGAGA	77
<i>Tpi-rice</i>	CCCTGCTATGATTAAGGACATCGGAGCCAACTGGGTCATCCTTGGTCACTCTGAACGTAGGACATCTTCGGTGAGA	77
<i>Tpi-corn</i>	AAGATGATCTTGTGTCAGAGAAAGTAAGTACTAAACATAAATGAGATTTATAATATATATTTTTTATTCTAAGTAGAT	154
<i>Tpi-Wuhan</i>	AAGATGATCTTGTGTCAGAGAAAGTAAGTACTAAACATAAATGAGATTTATAATATATATTTTTTATTCTAAGTAGAT	154
<i>Tpi-rice</i>	AAGATGACCTTGTGTCAGAGAAAGTAAGTACTAAACATAAATGAGATTTATAATATATATTTTTTATTCTAAGTAGAT	154
<i>Tpi-corn</i>	ACTAATAAATGTGAAATTTCTAGGTTGCCCATGCTCTTGAGTCCGGACTGAAGGTTATCGCTTGCATTGGAGAGACT	231
<i>Tpi-Wuhan</i>	ACTAATAAATGTGAAATTTCTAGGTTGCCCATGCTCTTGAGTCCGGACTGAAGGTTATCGCTTGCATTGGAGAGACT	231
<i>Tpi-rice</i>	ACTAATAAGAGTGAATTTCTAGGTTGCCCATGCTCTTGAGTCCGGACTGAAGGTTATCGCTTGCATTGGAGAGACT	231
<i>Tpi-corn</i>	CTTGAAGAACCGGAGGCTGGAAAGACTGAAGAAGTTGTGTTTCAGGCAGACTAAGGCCCTTTTACCAGCTATTGGCAG	308
<i>Tpi-Wuhan</i>	CTTGAAGAACCGGAGGCTGGAAAGACTGAAGAAGTTGTGTTTCAGGCAGACTAAGGCCCTTTTACCAGCTATTGGCAG	308
<i>Tpi-rice</i>	CTTGAAGAACCGGAGGCTGGAAAGACTGAAGAAGTTGTGTTTCAGGCAGACTAAGGCCCTTTTACCAGCTATTGGCAG	308
<i>Tpi-corn</i>	CAACTGGGACAAGGTCGTACTAGCTTATGAACCGTTTGGGCTATTGGCACGGGAAAGACCGCCACCCACAG	381
<i>Tpi-Wuhan</i>	CAACTGGGACAAGGTCGTACTAGCTTATGAACCGTTTGGGCTATTGGCACGGGAAAGACCGCCACCCACAG	381
<i>Tpi-rice</i>	CAACTGGGACAAGGTCGTACTAGCTTATGAACCGTTTGGGCTATTGGCACGGGAAAGACCGCCACCCACAG	381

注: *Tpi-corn* 表示为“玉米型”, *Tpi-rice* 表示为“水稻型”

Note: *Tpi-corn* represents “corn strain”, *Tpi-rice* represents “rice strain”

图 4 基于 *Tpi* 基因片段单倍型位点比较

Fig.4 Haplotype analysis based on *Tpi* gene fragments

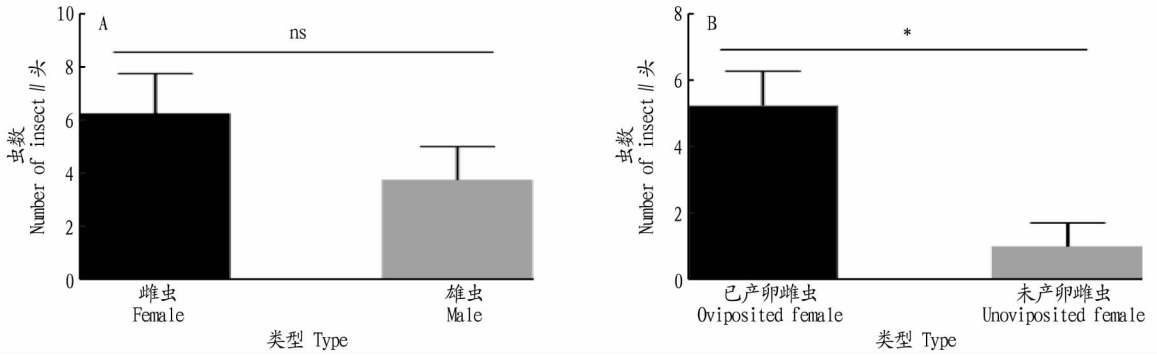
10 头左右;昆虫的趋光行为受性别、交配行为及发育阶段等因素的影响^[20],该研究诱捕到的草地贪夜蛾雌蛾大部分已交配,推测草地贪夜蛾的趋光行为与其交配、产卵等生殖行为有关。因此,灯光诱控技术对草地贪夜蛾的监测与防控的效果还需进一步探讨。

草地贪夜蛾与斜纹夜蛾的形态与个体大小十分相似^[11],加之灯诱鳞翅目成虫鳞粉大部分已掉落,识别较为困难。该研究在基于后翅形态鉴别出草地贪夜蛾的基础上^[11-12],再利用 *COI* 基因序列鉴定,发现形态鉴定准确率达 93%,说明草地贪夜蛾后翅特征可用于野外灯光诱捕监测或防控中草地贪夜蛾的识别,必要时可再辅助分子鉴定。国内报道,入侵我国的草地贪夜蛾为“玉米型”^[6],该研究灯诱草

地贪夜蛾分子鉴定进一步说明入侵到我国的草地贪夜蛾为“玉米型”,“水稻型”是否入侵我国,有待进一步监测。

参考文献

- [1] 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.
- [2] SHARANABASAPPA K S,ASOKAN C M,SWAMY R,et al.First report of the fall armyworm,*Spodoptera frugiperda*(J.E.Smith) (Lepidoptera:Noctuidae),an alien invasive pest on maize in India[J].Pest management in horticultural ecosystems,2018,24(1):23-29.
- [3] 郭井菲,赵建周,何康来,等.警惕危险性害虫草地贪夜蛾入侵中国[J].植物保护,2018,44(6):1-10.
- [4] 杨学礼,刘永昌,罗茗钟,等.云南省江城县首次发现迁入我国西南地区的草地贪夜蛾[J].云南农业,2019(1):72.
- [5] 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):1-6,18.



注: A 为诱虫灯单灯每晚诱捕雌、雄蛾数, B 为诱虫灯单灯每晚捕获已产卵雌虫与未产卵雌虫数。图中柱子代表平均值±标准误, ns 表示无显著差异, * 表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: A represents the number of female and male captured by light trap per night, B represents the number of oviposited female and unoviposited female captured by light trap per night. The column in the figure indicated Mean with SEM, ns means no significant difference at 0.05 level, * means significant differences at 0.05 level

图5 灯诱草地贪夜蛾性别及交配状态

Fig.5 The sex and mating status of *S. frugiperda* captured by light trap

- [6] 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.
- [7] 陆道训, 张玉美, 席春虎, 等. 不同药剂对草地贪夜蛾的防治效果[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(17): 132-134.
- [8] MITCHELL E R. Monitoring adult populations of the fall armyworm [J]. Florida entomologist, 1979, 62, 91.
- [9] 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.
- [10] 桑文, 蔡夫业, 王小平, 等. 农用诱虫灯田间应用现状与展望[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(10): 26-30, 68.
- [11] 赵胜园, 罗倩明, 孙小旭, 等. 草地贪夜蛾与斜纹夜蛾的形态特征和生物学学习性比较[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(5): 26-35.
- [12] 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.
- [13] 赵胜园, 杨现明, 和伟, 等. 草地贪夜蛾卵巢发育分级与繁殖潜力预测方法[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 28-34.
- [14] MEAGHER R L, Jr GALLO-MEAGHER M. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers [J]. Florida entomologist, 2003, 86(4): 450-455.
- [15] NAGOSHI R N. The fall armyworm triose phosphate isomerase (*Tpi*) gene as a marker of strain identity and interstrain mating [J]. Annals of the entomological society of america, 2010, 103(2): 283-292.
- [16] NAGOSHI R N, KOFFI D, AGBOKA K, et al. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181982.
- [17] NAGOSHI R N. Improvements in the identification of strains facilitate population studies of fall armyworm subgroups [J]. Annals of the entomological society of America, 2012, 105(2): 351-358.
- [18] JOHNSON S J. Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere [J]. International journal of tropical insect science, 1987, 8(4/5/6): 543-549.
- [19] VILARINHO E C, FERNANDES O A, CAIXETA H D F. Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil [J]. The Florida entomologist, 2011, 94(3): 480-488.
- [20] 程文杰, 郑霞林, 王攀, 等. 昆虫趋光的性别差异及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2011, 22(12): 3351-3357.
- [26] 许燕, 王印庚, 张正, 等. 不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群的结构差异[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 388-398.
- [27] NICHOLSON J K, HOLMES E, KINROSS J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. Science, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [28] 郑艺, 张家超, 郭壮, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 157-164.
- [29] LI X M, YU Y H, FENG W S, et al. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae [J]. The journal of microbiology, 2012, 50(1): 29-37.
- [30] BAILEY M T, DOWD S E, PARRY N M A, et al. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium* [J]. Infection and immunity, 2010, 78(4): 1509-1519.
- [31] KIM D H, CHOI S Y, KIM C S, et al. Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical *Aeromonas salmonicida* [J]. Aquaculture, 2013, 408/409: 113-117.
- [32] KIM D H. Low-value fish used as feed is a source of disease in farmed fish [J]. Fisheries Aquatic Sci, 2015, 18(2): 203-209.

(上接第113页)