

入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定

张磊^{1#}, 靳明辉^{1#}, 张丹丹², 姜玉英³, 刘杰³, 吴孔明², 萧玉涛^{1*}

(1. 中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 深圳 518120; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100125)

摘要 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 是一种原产于美洲热带和亚热带地区的重要农业入侵害虫, 目前已从缅甸进入我国云南西南部地区, 且呈现蔓延之势。对入侵物种快速准确鉴定是早期预警和监测预防的关键。本研究采用分子标记手段, 对采自云南 5 个县(市)的 83 份样品进行鉴定, 通过 PCR 扩增细胞色素 C 氧化酶第 I 亚基(CO I)和磷酸甘油醛异构酶(Tpi)两个基因片段并进行序列测定分析。结果表明, 基于 CO I 基因片段的序列比对能够对草地贪夜蛾进行准确的物种鉴定, 并且能够对其近源种甜菜夜蛾等进行鉴定。基于 Tpi 基因序列的特异单倍型位点比较分析, 确认入侵我国的草地贪夜蛾均为“玉米型”。该研究为草地贪夜蛾的快速识别提供了方法支持, 同时为进一步的虫源地解析和遗传溯源积累了宝贵的前期数据。

关键词 草地贪夜蛾; DNA 条码; 单倍型; 亚群

中图分类号: S 435.132 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019121

Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province

ZHANG Lei¹, JIN Minghui¹, ZHANG Dandan², JIANG Yuying³, LIU Jie³, WU Kongming², XIAO Yutao¹

(1. Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. National Agro-Tech Extension and Service Center, Beijing 100125, China)

Abstract The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is an important agricultural invasive pest that is native to tropical and subtropical America. At present, the insect has crossed Myanmar and entered into south-western Yunnan of China, and has the trend to overspread in the surrounding areas. Rapid and accurate identification is the key to early warning, monitoring and prevention of this invasive species. In this study, genetic methods based on two molecular markers, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (CO I) and triose-phosphate isomerase (Tpi), were used to characterize 83 samples collected from five different regions in Yunnan Province. The samples could be accurately identified to be *S. frugiperda* or close-related species such as *S. exigua* by sequence alignment based on CO I gene fragment. Subpopulation of “corn strain” was confirmed by Tpi haplotype analysis. This study provides methodological support for rapid species identification of *S. frugiperda*, and provides early basic data for further origin analysis and genetic traceability.

Key words *Spodoptera frugiperda*; DNA barcode; haplotype; subpopulation

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*, 也称秋黏虫, 具有杂食性、迁飞性、暴发性的特点^[1-2]。该虫广泛分布于美洲大陆^[3], 虽然在热带和亚热带地区以外区域不能越冬存活, 由于其远距离迁飞能力, 在温度适中的夏季和秋季, 其危害范围能够向北延伸至

加拿大^[4]。随着全球经济一体化的发展, 国际交流和进出口贸易成为生物入侵的一个主要通道^[5-6]。草地贪夜蛾于 2016 年在非洲首次被发现^[7], 两年时间内迅速扩散至撒哈拉以南几乎 44 个国家, 造成严重的玉米减产^[8]。2018 年 5 月草地贪夜蛾首次确

收稿日期: 2019-03-13

修订日期: 2019-03-14

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012-004); 国家自然科学基金(31601646)

致谢: 感谢中国农业科学院植物保护研究所王振营研究员、西南大学孙小旭博士提供样品及相关资料。

* 通信作者 E-mail: xiaoyutao@caas.cn

为并列第一作者

认侵入印度^[9], 2018 年底已经在缅甸形成虫源基地, 并通过中缅边境零星进入我国云南境内^[2], 严重威胁我国的粮食作物安全生产。

准确迅速地进行物种识别, 是外来入侵生物综合防控的关键技术。夜蛾科灰翅夜蛾属 *Spodoptera* 包含有多种重要农业害虫, 包括常见的甜菜夜蛾 *S. exigua* 和斜纹夜蛾 *S. litura* 等, 均具有杂食性、分布广泛等特点, 由于形态特征相近, 仅从外形难以区分, 给传统的形态学鉴定带来一定的挑战, 且传统的形态学鉴定方法受到虫态、亚群、单倍型等影响^[10-11], 很容易与其他近缘物种混淆, 急需开发分子手段, 补充形态学鉴定的局限性, 达到快速准确鉴定的目的。

当前针对草地贪夜蛾分子鉴定的主要标记有扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphisms, AFLP)^[12]、线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (cytochrome c oxidase subunit I, COI)^[13-16] 以及位于 Z 染色体上的磷酸甘油醛异构酶基因 (triose-phosphate isomerase, *Tpi*)^[17-20]。其中基于线粒体 COI 基因的序列分析是目前最常用也是最有效的分子条码, 基于个别 SNP 位点的比对还能够达到鉴别草地贪夜蛾不同亚型的目的^[21]。研究显示草地贪夜蛾雌性“水稻型”和雄性“玉米型”存在一定比例的杂交^[22], 由于线粒体母系遗传的特征, 因此往往容易造成分子鉴定结果的不一致^[23-25]。除 COI 基因外, 位于 Z 染色体的 *Tpi* 基因也是草地贪夜蛾鉴定的标记基因, 该标记由于位于核基因组, 与寄主植物相关性更强, 且在不同亚型鉴定上显示出比线粒体标记更加准确的特性^[23, 26-27]。将两种标记鉴定方法有机结合, 互为补充, 互相验证, 可保证鉴定结果更加可靠。

本研究利用 COI 和 *Tpi* 两个基因片段对入侵我国的草地贪夜蛾进行分子鉴定, 探究该物种的快速识别技术, 对于进一步明确其虫源信息及其发生特征和暴发规律, 以及指导草地贪夜蛾的监测预警和早期控制具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本次研究的样品一共有 83 份, 采集地点包括云南省德宏州的瑞丽市、芒市、陇川县、盈江县和普洱市江城县等 5 个县(市), 寄主均为苗期至抽雄初期的冬玉米, 每个地点样品数 2 份至 35 份不等, 所有样品均为幼虫。样品采集后放入泡沫箱, 活体常温运送至实验室, 采用新鲜玉米叶片喂养, 具体样品信息见表 1。

表 1 试验样品信息

Table 1 Information of samples used in this study

序号 Number	虫态 Stages	采集地点 Collection sites	采集时间 Collection time	样品数量/份 Number of samples
1	幼虫	德宏州瑞丽市	2019 年 1 月 24 日	35
2	幼虫	德宏州盈江县	2019 年 1 月 23 日	19
3	幼虫	普洱市江城县	2019 年 1 月 24 日	25
4	幼虫	德宏州芒市	2019 年 1 月 23 日	2
5	幼虫	德宏州陇川县	2019 年 1 月 23 日	2

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

样品 DNA 提取采用 Muitisource Genomic DNA Miniprep Kit 试剂盒, 单头虫体用液氮研磨后, 按照说明书进行标准操作, 纯化的 DNA 经过 1% 琼脂糖电泳检测, 使用 NanoDrop ND-2000 仪器测定浓度, 用作 PCR 扩增模板。

分别对 COI 基因和 *Tpi* 基因片段进行 PCR 扩增, 引物序列见表 2^[26], 采用全式金 2×EasyTaq 酶进行 PCR 扩增, PCR 反应体系如下 (50 μL): DNA 模板 5 μL, 正反向引物各 1.5 μL, 2×EasyTaq mix 25 μL, dd H₂O 17 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 34 个循环, 每个循环 94℃ 变性 30 S, 60℃ 退火 30 S, 72℃ 延伸 1 min, 72℃ 延伸 10 min。

表 2 COI 基因和 *Tpi* 基因片段扩增引物信息

Table 2 Primers of COI gene and *Tpi* gene fragments used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	扩增区域 Target
COI-F	5'-TTCGAGCTGAATTAGGGACTC-3'	COI
COI-R	5'-GATGTAAATATGCTCGTGT-3'	COI
<i>Tpi</i> -F	5'-GGTGAAATCTCCCTGCTATG-3'	<i>Tpi</i>
<i>Tpi</i> -R	5'-AATTTTATTACCTGCTGTGG-3'	<i>Tpi</i>

PCR 扩增结束后, 使用 1% 琼脂糖电泳检测扩增结果, 选取与目标片段长度一致的单一片段 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司切胶测序, 测序引物采用各自片段 PCR 扩增引物。

1.3 数据分析

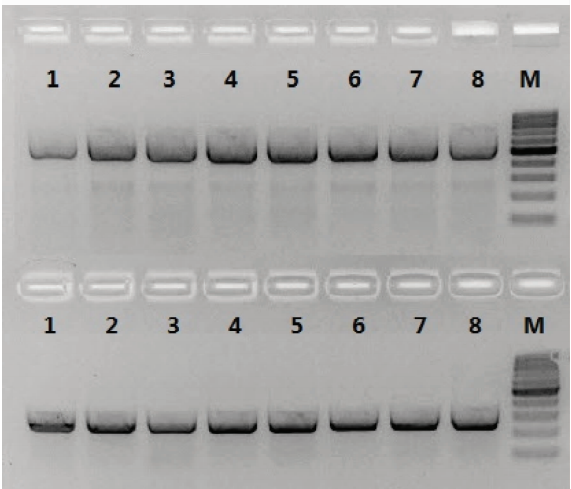
利用 SeqMan 和 BioEdit 软件对正反向测序序列进行人工拼接及峰图校正, 获得准确的 COI 和 *Tpi* 基因片段序列。同时从 GenBank 数据库下载已经发布的草地贪夜蛾对应基因序列以及 *Spodoptera* 属近缘物种的对应基因序列, 去除低质量序列, 所有核酸序列采用 MEGA5.0 软件进行比对, 截去两端多余的序列, 选取 Kimura-2 参数模型, 依据邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统进化树, 系统树各分支的自举检验值 (bootstrap) 1 000 次重复检

验。针对已经报道的基于 *Tpi* 基因序列的“玉米型”和“水稻型”单倍型特点^[27],运用 DNAMAN 软件进行特异位点差异比对,以此确认本研究草地贪夜蛾具体的亚型。

2 结果与分析

通过 PCR 扩增,CO I 引物及 *Tpi* 引物在所有 83 份样品中均得到很好的扩增效果,条带单一整齐,其中 COI 基因片段长度约 800 bp, *Tpi* 基因片段长度约 400 bp,均与预期片段大小一致(图 1)。该结果表明两种基因片段均适合作为草地贪夜蛾分子鉴定的 DNA 条码,引物显示出很强的种属扩增特异性。

通过序列测定和峰图校正分析,得到了所有 83 份样品准确的 CO I 基因片段和 *Tpi* 基因片段序列,其中 CO I 片段长度均为 789 bp,除了采自芒市的 1 号样品之外,其余 82 份样品的 CO I 序列完全一致。*Tpi* 片段长度为 386~388 bp,其中芒市的 1 号样品序列长度为 388 bp,其余 82 份样品的序列长度均为 386 bp 且序列完全一致。序列比对结果显示芒市 1 号样品与其余样品的 CO I 序列相似度为 92.9%, *Tpi* 序列相似度仅为 83.76%,表明芒市 1 号样品极有可能为不同的物种,而其余 82 份样品为同一物种。



上图 CO I 基因,下图 *Tpi* 基因, M 代表 DL5000 DNA Marker
Above is the CO I gene, below is the *Tpi* gene, M represents DL5000 DNA Marker

图 1 部分 PCR 扩增产物琼脂糖电泳检测图
Fig. 1 Gel electrophoresis of partial PCR products

根据本研究测定的 CO I 序列及 GenBank 数据库中下载的 18 条 *Spodoptera* 属近缘物种 CO I 序列,以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* CO I 序列作为外群,采用 NJ 法构建系统发育树(图 2),由于本研究中有 82 份样品序列完全一致,仅选取瑞丽 1 号样品作为代表。

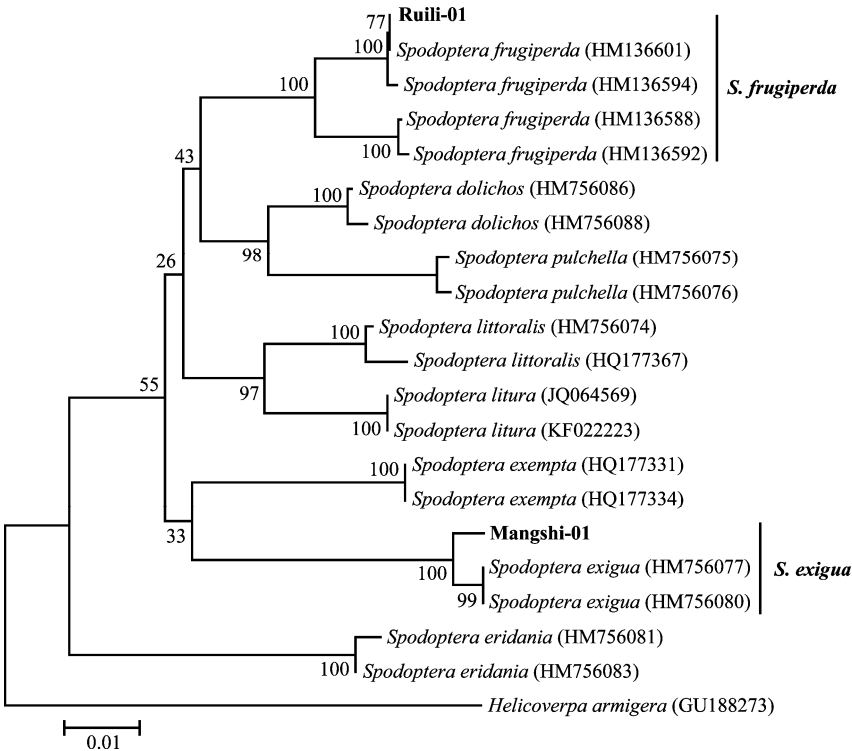


图 2 基于 CO I 序列构建的 NJ 系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by NJ analysis based on CO I gene fragments

从系统树可以看出,CO I 基因片段能够将 *Spodoptera* 属不同个体按照各自所属的物种明显地区分开来,来自同一物种的不同个体均优先聚在一起,且各分支均具有较高的支持率。其中采自云南的样品与之前研究发表的草地贪夜蛾聚为一支,表明云南的所有 82 份样品均为草地贪夜蛾,而采自芒市的 1 号样品与甜菜夜蛾聚为一支,可将芒市 1 号样品鉴定为甜菜夜蛾。且从系统进化树可以看出,草地贪夜蛾与 *S. dolichos* 和 *S. pulchella* 显示

出更近的亲缘关系。

将本研究测定的草地贪夜蛾 *Tpi* 基因序列与之前研究发表的两种亚型对应的 *Tpi* 基因序列进行单倍型比对分析,结果显示在能够区分“水稻型”和“玉米型”的 10 个多态性单倍型中,云南样品在所有 10 个位点与“玉米型”单倍型完全一致(图 3),证明所鉴定的 82 份草地贪夜蛾样品均为“玉米型”。鉴于本研究采样地点全部来自玉米种植区,因此更加确认早期入侵我国的草地贪夜蛾属于“玉米型”。

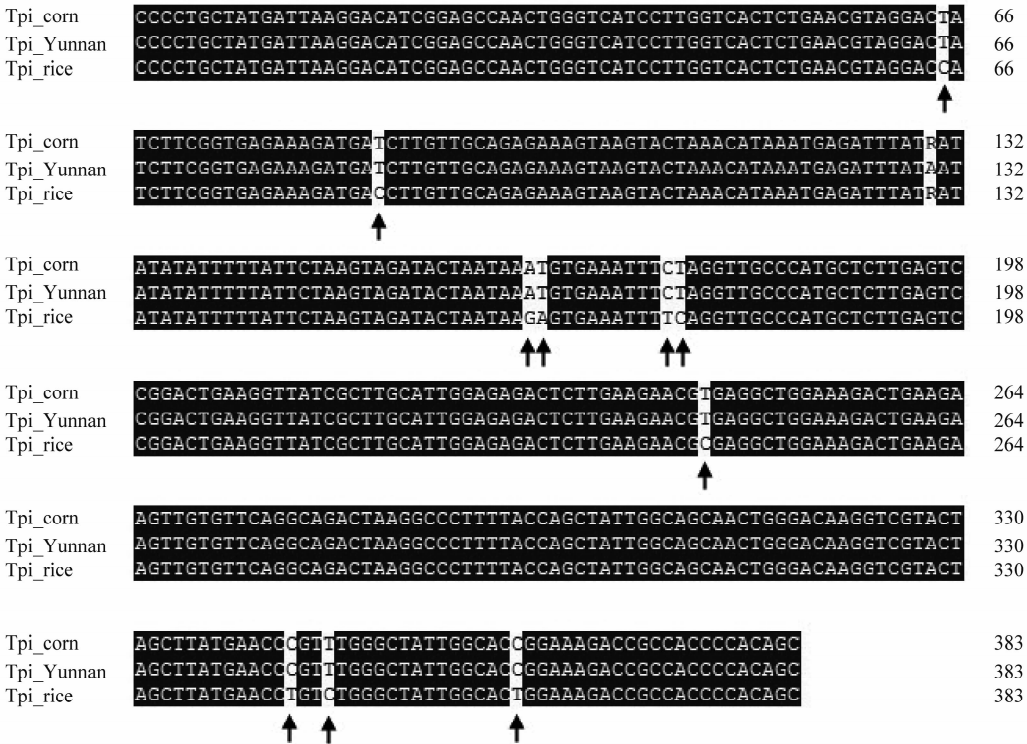


图 3 基于 *Tpi* 基因片段单倍型位点比较,箭头表明区分“玉米型”和“水稻型”的多态性单倍型位点

Fig. 3 Haplotype analysis based on *Tpi* gene fragments, arrows indicate corn or rice strain-specific polymorphic loci

3 讨论

草地贪夜蛾作为一种入侵性极强的毁灭性害虫,其入侵风险评估、快速识别技术和监测预防工作显得尤为重要。当前,由草地贪夜蛾的快速扩散和严重为害引发全球关注,多国已经启动应急处置预案,联合制定综合治理方案,欧洲已将其作为检疫害虫^[28]。由于我国并没有草地贪夜蛾本地种,此次草地贪夜蛾从缅甸入侵我国,如不引起足够重视,一旦全面暴发,后果将难以控制,给我国农业发展带来严峻挑战。

草地贪夜蛾在原产地美洲长期进化过程中分化成两种生态型,根据取食寄主植物的不同分为“玉米

型”和“水稻型”,前者主要取食玉米和高粱,后者主要取食水稻和狗牙根等草坪草^[11,29]。这两种生态型在雌性性信息素成分、交配行为等生理学方面具有较为明显的差异^[11,30-33],然而两种亚型之间并没有绝对的生殖隔离,有报道显示两种亚型之间存在一定比例的杂交^[19,22],给基于生理学差异和基于寄主选择性的表型鉴定带来更多的不确定性,并且两种亚型在外部形态特征上基本一致,无法进行有效的形态学区分^[29,33-35],目前开发分子标记是对两种亚型进行区分的最有效手段。除此之外,草地贪夜蛾在低龄幼虫期以及卵阶段难以与其他近缘物种进行区分,也需要借助分子手段的辅助鉴定。对入侵害虫进行快速准确的鉴定分型,明确其为害特征,有助

于提前科学布局和开展针对性的防控措施,减少农林经济损失,因此,开展基于分子辅助手段的鉴定工作很有必要且意义重大。

本研究采用分子标记手段,对入侵我国的草地贪夜蛾进行了准确的物种鉴定。所选取的两个片段在所有样品均得到较好的扩增,表明两种标记都能够达到对该物种进行快速鉴定的目的。同时,本研究采用的引物通用性强,对甜菜夜蛾 DNA 也能进行有效扩增,可以应用于 *Spodoptera* 属近缘物种的分子鉴定。且进一步通过 *Tpi* 基因序列特异位点单倍型分析,确认入侵我国的草地贪夜蛾为“玉米型”。由于本次研究的 82 份草地贪夜蛾样品 *CO I* 和 *Tpi* 两个基因片段序列完全一致,推测入侵云南 5 个县(市)的草地贪夜蛾均来自同一虫源地,或侵入中国之后进行的扩散。

作为一种国际性重大迁飞农业害虫,当前针对草地贪夜蛾的研究日益增多,采用 *CO I* 和 *Tpi* 等分子条码能够有效地对草地贪夜蛾进行物种鉴定,很容易与其他物种进行区分^[36]。但是,对于“玉米型”和“水稻型”的区分依然是研究的难点^[29,37],当前也仅仅是依靠个别基因有限 SNP 位点的单倍型进行鉴定^[38-41],由于草地贪夜蛾迁飞性强且分布广泛,候选基因往往变异速率快,不少研究表明在相关位点出现杂合的现象,给鉴定分型带来困扰^[23,26]。一直以来针对两种亚型分析的方法也不断改进,对鉴定的准确性要求不断提高^[23,27],然而,依然需要开发更多与取食寄主关联的遗传标记位点,达到鉴定的系统性和多重验证。尽管目前两种亚型的基因组数据已经发布,然而关于两者取食不同寄主直接的基因和相关机制并未阐明^[42-43],因此仅能通过与表型性状关联的分子特征进行亚型区分^[23]。

两种不同亚型的草地贪夜蛾往往同时发生,目前非洲已经有两种亚型的定殖为害^[2,21]。本研究虽然鉴定入侵我国云南地区的草地贪夜蛾均为“玉米型”,但是由于取样地点和取样数目的局限性,并不能完全排除“水稻型”草地贪夜蛾已经侵入我国,需要做好更大范围的监测和调查。此外,关于本次研究的草地贪夜蛾的最初来源仍需要进一步确认,通过序列比对构建系统树从而分析源头的方法已证实可行^[26]。由于缅甸以及中国并没有草地贪夜蛾本地种,需要深入厘清其来源,

从源头进行控制和管理,明确草地贪夜蛾发生动态规律,为指导草地贪夜蛾的科学防控提供更加可靠的信息。

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]. Annals of the Entomological Society of America, 1980, 73(6): 722–738.
- [2] 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/OL]. 植物保护,2019,https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019047.
- [3] SPARKS A N. A review of the biology of the fall armyworm [J]. Florida Entomologist, 1979,62(2): 82–87.
- [4] MITCHELL E R, MCNEIL J N, WESTBROOK J K, et al. Seasonal periodicity of fall armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae) in the Caribbean basin and northward to Canada [J]. Journal of Entomological Science, 1991, 26(1): 39–50.
- [5] COCK M J W, BESEH P K, BUDDIE A G, et al. Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4103.
- [6] CHAPMAN D, PURSE B V, ROY H E, et al. Global trade networks determine the distribution of invasive non-native species [J]. Global Ecology and Biogeography,2017,26(8):907–917.
- [7] GOERGEN G, KUMAR P L, SANKUNG S B, et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(10): e0165632.
- [8] 郭井菲,赵建周,何康来. 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.
- [9] SHARANABASAPPA D, KALLESHWARASWAMY C M, ASOKAN 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.
- [10] CRUZ-ESTEBAN S, ROJAS J C, SANCHEZ-GUILLEN D, et al. Geographic variation in pheromone component ratio and antennal responses, but not in attraction, to sex pheromones among fall armyworm populations infesting corn in Mexico [J]. Journal of Pest Science, 2018, 91(3): 973–983.
- [11] PASHLEY D P, MARTIN J A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1987, 80(6): 731–733.
- [12] MCMICHAEL M, PROWELL D P. Differences in amplified

- fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1999, 92(2): 175–181.
- [13] MEAGHER R L, CALLO-MEAGHER M. Identifying host of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers [J]. *Florida Entomologist*, 2003, 86(4): 450–455.
- [14] CANO-CALLE D, ARANGO-ISAZA R E, SALDAMANDO-BENJUMEA C I. Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (CO I) and a PCR of the gene FR (for rice) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2015, 108(2): 172–180.
- [15] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, ADAMCZYK J J. New restriction fragment length polymorphisms in the *Cytochrome oxidase I* gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2006, 99(3): 671–677.
- [16] LU Y J, ADANG M J. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker [J]. *Florida Entomologist*, 1996, 79: 48–55.
- [17] NAGOSHI R N, MURUA M G, HAY-ROE M, et al. Genetic characterization of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Argentina [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105(2): 418–428.
- [18] NAGOSHI R N. The fall armyworm triosephosphate 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.
- [19] PROWELL D P, MCMICHAEL M, SILVAIN J F. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2004, 97(5): 1034–1044.
- [20] LU Y J, KOCHERT G D, ISENHOUR D J. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 1994, 3(2): 123–130.
- [21] JACOBS A, VAN VUUREN A, RONG I. Characterisation of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) from South Africa [J]. *Africa Entomology*, 2018, 26(1): 45–49.
- [22] NAGOSHI R N, MEAGHER R L, NUSSELY G, et al. Effects of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) interstrain mating in wild populations [J]. *Environmental Entomology*, 2006, 35: 561–568.
- [23] 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 Molecular Biology*, 2016, 25(3): 324–337.
- [24] JUA'REZ M L, SCHOFI G, VERA M T, et al. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2014, 152(3): 182–199.
- [25] MURU'A M G, NAGOSHI R N, DOS SANTOS D A. Demonstration using field collections that Argentina fall armyworm populations exhibit strain-specific host plant preferences [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108(5): 2305–2315.
- [26] 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/OL]. *PLoS ONE*, 2017, 12(7): e0181982.
- [27] 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.
- [28] JEGER M, BRAGARD C, CAFFIER D, et al. Pest categorisation of *Spodoptera frugiperda* [J]. *European Food Safety Authority Journal*, 2017, 15(7): 4927.
- [29] PASHLEY D P. Host-associated genetic differentiation in fall army worm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1986, 79(6): 898–904.
- [30] GROOT A T, MARR M, SCHOFI G, et al. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2008, 5: 20.
- [31] KOST S, HECKEL D G, YOSHIO 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.
- [32] LIMA E R, MCNEIL J N. Female sex pheromones in the host races and hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Chemoecology*, 2009, 19(1): 29–36.
- [33] PASHLEY D P, HAMMOND A M, HARDY T N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera, Noctuidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1992, 85(4): 400–405.
- [34] PASHLEY D P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm [J]. *Evolution*, 1988, 42(1): 93–102.
- [35] PASHLEY D P, SPARKS T C, QUISENBERRY S S, et al. Two fall armyworm strains feed on corn, rice and bermudagrass [J]. *Louisiana Agriculture Magazine*, 1987, 30: 8–9.

- diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(1):171–181.
- [19] KOVACH M E, ELZER P H, HILL D S, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes [J]. Gene, 1995, 166(1):175–176.
- [20] ZHANG Xiaoxiao, ZHAO Mei, YAN Jianpei, et al. Involvement of *hrpX* and *hrpG* in the virulence of *Acidovorax citrulli* strain Aac5, causal agent of bacterial fruit blotch in cucurbits [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:507.
- [21] 陈亮. 西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*) III型分泌系统抑制剂的高通量筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [22] ZHANG Yanbao, WEI Chao, JIANG Wendi, et al. The HD-GYP domain protein RpfG of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(3):e59428.
- [23] PHILIPPE N, ALCARAZ J P, COURSANGE E, et al. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria [J]. Plasmid, 2004, 51(3):246–255.
- [24] WALCOTT R R, GITAITIS R D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2000, 84(4):470–474.
- [25] BAHAR O, KRITZMAN G, BURDMAN S. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity [J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(1):71–83.
- [26] BAHAR O, GOFFER T, BURDMAN S. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(8):909.
- [27] REN Zhengguang, JIANG Wenjun, NI Xingya, et al. Multiplication of *Acidovorax citrulli* in planta during infection of melon seedlings requires the ability to synthesize leucine [J]. Plant Pathology, 2014, 63(4):784–791.
- [28] 张爱萍, 张晓晓, 吴林娜, 等. 西瓜噬酸菌趋化性及鞭毛素基因 $\Delta cheA \Delta fliC$ 双突变体构建及功能 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(11):1838–1850.
- [29] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402–408.
- [30] 张鼎鼎, 邹丽芳, 赵梅勤, 等. *hrcQ* 基因决定水稻条斑病菌在非寄主烟草上的过敏反应和在寄主水稻上的致病性 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1):11–18.
- [31] WANG Tielin, GUAN Wei, HUANG Qi, et al. Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac-5 of *Acidovorax citrulli* [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 100:133–140.
- [32] TIAN Yanli, ZHAO Yuqiang, WU Xinrong, et al. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(1):38–47.
- [33] HOPKINS D L, THOMPSON C M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits [J]. Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science, 2002, 37(6):924–926.
- [34] MOSS W, BYRNE J, CAMPBELL H, et al. Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. Biological Control, 2007, 41(2):199–206.
- [35] THARAUD M, LAURENT J, FAIZE M, et al. Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora* [J]. Microbiology, 1997, 143(2):625–632.
- (责任编辑: 田 喆)
- ~~~~~
- (上接 24 页)
- [36] NAGOSHI R N, BRAMBILA J, MEAGHER R L. Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida [J]. Journal of Insect Science, 2011, 11: 154.
- [37] UNBEHEND M, HANNIGER S, VASQUEZ G M, et al. Geographic variation in sexual attraction of *Spodoptera frugiperda* corn-and rice-strain males to pheromone lures [J]. PLoS ONE, 2014, 9: e89255.
- [38] NAGOSHI R N, SILVIE P, MEAGHER R L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil [J]. Journal of Economic Entomology, 2007, 100(3): 954–961.
- [39] 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.
- [40] NAGOSHI R N, ROSAS-GARCIA N M, MEAGHER R L, et al. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior [J]. Journal of Economic Entomology, 2015, 108(1): 135–144.
- [41] 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.
- [42] GOUIN A, BRETAUDEAU A, NAM K. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11816.
- [43] LIU Q N, CHAI X Y, BIAN D D. The complete mitochondrial genome of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Genes & Genomics, 2016, 38:205–216.
- (责任编辑: 田 喆)