

基于种特异性标记鉴定不同虫态草地 贪夜蛾的技术研究*

李清文^{1,4**} 张 静² 栗智平³ 战一迪¹ 刘 勇^{1***}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 烟台海关技术中心, 烟台 264000;

3. 济南海关技术中心, 济南 250014; 4. 黄山区农业农村水利局, 黄山 245700)

摘 要 【目的】草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的卵、低龄幼虫、蛹甚至成虫和其他鳞翅目害虫混合发生时, 常难以准确识别; 植保监测站以及海关等获取的可能包括草地贪夜蛾等大量昆虫残片的混合样品, 也需要快速准确的物种鉴定。本文构建了基于种特异性标记的草地贪夜蛾的快速准确鉴定方法。

【方法】利用线粒体 DNA CO I 基因通用引物 LCO1490/HCO2198 扩增 11 种供试鳞翅目昆虫的 CO I 序列, 然后根据草地贪夜蛾的保守序列片段设计 6 对 PCR 特异性引物、1 对 qPCR 特异性引物和探针, 提取供试昆虫的 DNA, 并以此为模板对引物进行种特异性检测。【结果】PCR 引物 SF_F3/SF_R3 和 qPCR 引物 60F/154R 可特异性扩增不同虫态 (卵、幼虫、蛹和成虫) 的草地贪夜蛾基因组模板; 灵敏度检测表明, PCR 和 qPCR 引物对草地贪夜蛾 DNA 模板的最低检测浓度分别为 1 ng/μL 和 10 pg/μL。【结论】本研究建立的基于种特异性标记的物种快速鉴定方法, 提高了不同虫态的草地贪夜蛾的鉴定效率和准确度。

关键词 草地贪夜蛾; 线粒体 DNA CO I 基因; PCR; 实时荧光定量 PCR

Identification of different developmental stages of *Spodoptera frugiperda* using species-specific markers

LI Qing-Wen^{1,4**} ZHANG Jing² SU Zhi-Ping³ ZHAN Yi-Di¹ LIU Yong^{1***}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Technology Center of Yantai Customs District, Yantai 264000, China; 3. Technology Center of Jinan Customs District, Jinan 250014, China; 4. Agriculture Rural Affairs and Water Conservancy Bureau of Huangshan District, Huangshan 245700, China)

Abstract 【Objectives】To develop a rapid, and accurate, method of identifying all developmental stages of *Spodoptera frugiperda* based on a species-specific marker in order to enable the detection of this important invasive pest in the mixed samples of insect fragments commonly obtained by customs and plant protection monitoring stations. 【Methods】The mtDNA CO I gene universal primer LCO1490/HCO2198 was used to amplify CO I gene sequences of 11 lepidopteran species. Six pairs of PCR specific primers, and one pair of qPCR specific primers and a probe, were designed according to a conserved sequence fragment of *S. frugiperda*. The DNA of the tested insect species were extracted as templates to determine the specificity of the primers. 【Results】The PCR primers SF3F/SF3R, and the qPCR primers 60F/154R, had specific amplification capabilities for the genome template of different developmental stages (egg, larva, pupa and adult) of *S. frugiperda*. Sensitivity tests indicate that the minimum PCR and qPCR detection concentrations of the primers for the DNA template of *S. frugiperda* were 1 ng/μL and 10 pg/μL, respectively. 【Conclusion】A rapid identification protocol developed based on species-specific markers can improve the efficiency and accuracy of identifying different developmental stages of *S. frugiperda*.

Key words *Spodoptera frugiperda*; mtDNA CO I gene; PCR; qPCR

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2021YFE0115600)

**第一作者 First author, E-mail: 596817095@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuyong@sdaa.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-07-13; 接受日期 Accepted: 2022-10-04

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae。该虫原产自美洲热带和亚热带地区, 具有寄主范围广、取食量大、迁飞能力强等特点, 是世界性重大迁飞性农作物害虫, 联合国粮农组织也将其列为世界十大害虫之一 (Montezano *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2021)。草地贪夜蛾主要为害玉米、高粱、水稻等农作物, 其幼虫啃食农作物的幼苗心叶以及果穗, 导致农作物减产严重 (Jing *et al.*, 2020; 吴孔明, 2020)。

建立入侵害虫的快速鉴定方法是早期预警、防止其入侵传播的重要步骤。传统的形态学鉴定主要依据成虫的典型特征进行, 易导致对卵、幼虫和蛹物种鉴定的延误。对不同虫态的草地贪夜蛾的形态特征尽管已有描述 (郭井菲等, 2019; 陈琦等, 2020; 张智等, 2020), 但仅从外部形态特征, 其卵、低龄幼虫、蛹甚至成虫常难以和近缘或近似的鳞翅目害虫区分, 继而影响监测预警和科学防控。同时, 对于植保监测站以及海关获取的大量可能包含草地贪夜蛾等昆虫残片的混合样品, 种类繁多, 更难以通过形态识别进行准确鉴定。

本研究以草地贪夜蛾的卵、幼虫、蛹和成虫的线粒体 DNA (mtDNA) 为模板, 以细胞色素 c 氧化酶 I 亚基 (Cytochrome oxidase subunit I, CO I) 基因的保守序列为目标基因, 设计 PCR 特异性引物以及实时荧光定量 PCR 特异性引物和探针, 与其他 10 种鳞翅目昆虫相比较, 建立基于 PCR 和 qPCR 快速鉴定不同虫态草地贪夜蛾的技术体系, 为草地贪夜蛾的监测预警和科学防控提供依据, 同时也可为基于种特异性标记的物种鉴定技术的研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试 11 种蛾类昆虫包括草地贪夜蛾 *S. frugiperda*、斜纹夜蛾 *S. litura*、甜菜夜蛾 *S. exigua*、粘虫 *Mythimna separata*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、亚洲玉米螟 *Ostrinia*

furnacalis 的卵、幼虫、蛹和成虫, 虫源来自山东农业大学和山东省农业科学院植物保护研究所; 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*、苹果异胫小卷蛾 *Thaumatotibia leucotreta*、二点委夜蛾 *Athetis lepigone*、银锭夜蛾 *Macdunnoughia crassisigna*、石榴螟 *Ectomyelois ceratoniae* 成虫, 虫源来自济南海关技术中心。

1.2 供试昆虫 DNA 提取

参考试剂盒说明书采用柱提法提取 11 种蛾类昆虫的 DNA (SteadyPure Universal Genomic DNA Extraction Kit, Accurate Biotechnology co., Ltd)。通过超微量分光光度计 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, USA) 对 DNA 的质量和浓度进行检测, 将 DNA 浓度统一为 50 ng/μL。DNA 样品存放于 -20 °C 冰箱保存。

1.3 供试昆虫 CO I 基因 PCR 扩增和测序

以提取的 11 种供试昆虫 DNA 为模板, 使用动物 mtDNA CO I 的通用引物 LCO1490 和 HCO2198 进行 PCR 扩增 (Zhang *et al.*, 2010)。LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATA-TTGG-3', HCO2198: 5'-T AAACCTTCAGGGT-GACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应条件: 94 °C, 5 min; 35 个循环 (94 °C, 40 s; 48 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C, 10 min; 4 °C 保温。通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并对目的条带进行测序。

1.4 CO I 基因 PCR 种特异性引物设计与筛选

下载 Genbank 中的草地贪夜蛾 CO I 基因序列, 进行 Clustalx 比对, 选择保守的 mtDNA CO I 基因片段, 用 Primer 5.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) 进行特异性引物设计, 对所设计的引物进行 Blast, 共设计 6 对 PCR 特异性引物 (表 1)。所有引物均由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。以草地贪夜蛾 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 以其他 10 种蛾类昆虫 DNA 模板为对照, ddH₂O 为空白对照, 进行 3 组平行 PCR 反应。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 基于草地贪夜蛾 CO I 基因设计的 PCR 特异性引物
Table 1 Primers designed based on CO I gene of *Spodoptera frugiperda*

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增长度 (bp) Product size (bp)
CO I	SF_F1	ACTTTTACCCCCATCTTTAAC	118
	SF_R1	CTACTGAACTACCACCATGAG	
CO I	SF_F2	ACTTTTACCCCCATCTTTAAC	122
	SF_R2	TGAACTACCACCATGAGCAAT	
CO I	SF_F3	ACTTTTACCCCCATCTTTAAC	191
	SF_R3	AGTGGTAATAAAAGTTAATAGCTC	
CO I	SF_F4	TATTAATTTCTAGTAGCATTGTAG	95
	SF_R4	CTACTGAACTACCACCATGAG	
CO I	SF_F5	TATTAATTTCTAGTAGCATTGTAG	99
	SF_R5	TGAACTACCACCATGAGCAAT	
CO I	SF_F6	TATTAATTTCTAGTAGCATTGTAG	168
	SF_R6	AGTGGTAATAAAAGTTAATAGCTC	

SF: 草地贪夜蛾; F: 正向引物; R: 反向引物。表 2 同。
SF: *S. frugiperda*; F: Forward primer; R: Reverse primer. The same as table 2.

1.5 PCR 特异性引物灵敏度检测

将提取的草地贪夜蛾 DNA 样本模板用 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释 (100 ng/μL-10 fg/μL), 以验证特异性引物对草地贪夜蛾 DNA 样本检测的下限。选用特异性较强的引物对各浓度 DNA 样本进行 PCR 特异性反应试验, PCR 反应条件同 1.3, 每种浓度进行 3 组平行试验。

1.6 qPCR 特异性引物的设计与检测

使用 Primer Express 软件设计 CO I 基因保守片段的探针和引物, 并进行 Blast 检验。设计出 1 对实时荧光定量 PCR 特异性引物和探针(表 2)。引物和探针由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。以目标物种草地贪夜蛾 DNA 为模板, 以其他 5 种蛾类昆虫(粘虫、棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾和玉米螟)DNA 模板作为对照, ddH₂O 作为空白对照, 进行 3 组平行 PCR 试验反应。

1.7 qPCR 体系灵敏度检测

将提取的草地贪夜蛾 DNA 模板用 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释 (100 ng/μL-10 fg/μL), 以验证 qPCR 特异性引物对草地贪夜蛾的 DNA 样本检

测的下限。分别进行各浓度 DNA 的 qPCR 特异性反应, 每种浓度进行 3 组平行试验。实时荧光定量 PCR 反应总体系: 2×RealStar Probe Fast Mixture 10 μL, 上下游引物、探针各 0.5 μL, DNA 模板各 1 μL, 加 ddH₂O 至总体积 20 μL。实时荧光定量 PCR 扩增程序为 94 ℃, 2 min; 30 个循环 (94 ℃, 30 s; 60 ℃, 30 s; 72 ℃, 35 s); 72 ℃, 5 min; 4 ℃保温。

表 2 实时荧光 PCR 特异性引物及探针
Table 2 Real time fluorescent PCR specific primers and probes

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
CO I SF_60F	TATTAATTTCTAGTAGCATTGTAG
CO I SF_154R	CTACTGAACTACCACCATGAG
TaqMan 探针	TCTACTGAACTACCACCATGA
TaqMan probe	

2 结果与分析

2.1 CO I 基因扩增与系统发育分析

选用动物通用引物 LCO1490 和 HCO2198, 以提取的 11 种蛾类昆虫样本的 DNA 为模板进行

PCR 扩增, 扩增条带单一且明亮清晰, 长度约为 710 bp (图 1)。将测序结果与 NCBI 数据库比对后, PCR 扩增结果和形态学鉴定一致。采用邻接法对 11 条序列建立系统发育树 (图 2)。草地贪

夜蛾和亲缘关系近的斜纹夜蛾聚为一支。系统进化树分析与形态学鉴定表明选取的供试昆虫包含草地贪夜蛾的近似种和近缘种等, 可用于筛选特异性引物。

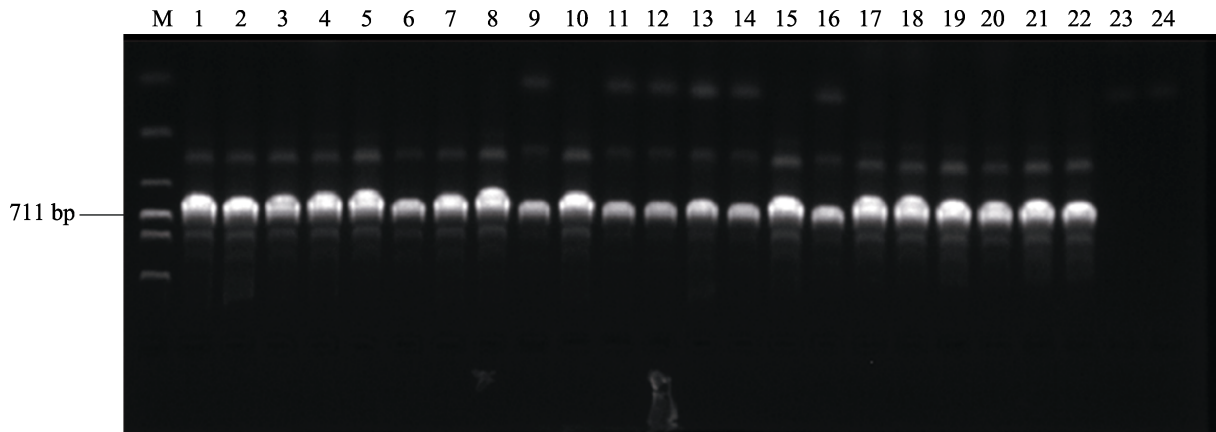


图 1 通用引物对 11 种蛾类 DNA 模板的质量检测结果

Fig. 1 The quality of the DNA template of 11 species of moths measured using universal primers

M: DNA ladder (2 000 bp); 1-2: 草地贪夜蛾; 3-4: 粘虫; 5-6: 棉铃虫; 7-8: 甜菜夜蛾; 9-10: 亚洲玉米螟; 11-12: 斜纹夜蛾; 13-14: 二点委夜蛾; 15-16: 银锭夜蛾; 17-18: 苹果蠹蛾; 19-20: 苹果异胫小卷蛾; 21-22: 石榴螟; 23-24: ddH₂O (空白对照)。图 3 同。
M: DNA ladder (2 000 bp); 1-2: *Spodoptera frugiperda*; 3-4: *Mythimna separata*; 5-6: *Helicoverpa armigera*; 7-8: *S. exigua*; 9-10: *Ostrinia furnacalis*; 11-12: *S. litura*; 13-14: *Athetis lepigone*; 15-16: *Macdunnoughia hybrida*; 17-18: *Cydia pomonella*; 19-20: *Thaumatotibia leucotreta*; 21-22: *Ectomyelois ceratoniae*; 23-24: ddH₂O (Blank control). The same as Fig. 3.

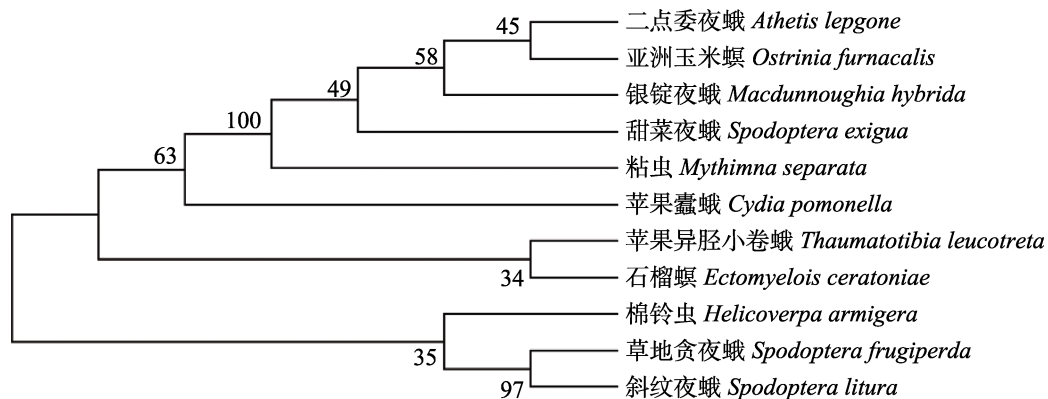


图 2 草地贪夜蛾及其他供试蛾类昆虫的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Spodoptera frugiperda* and the other tested species of moths

2.2 PCR 引物特异性验证

通过筛选发现, 引物 SF_F3/SF_R3 特异性最强。特异性检测结果显示, 只有在以草地贪夜蛾 DNA 为模板时, 才扩增出明亮单一条带, 在其他供试昆虫和空白对照中均未出现任何条带, 表明引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾具有特异

性和稳定性 (图 3)。

利用引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾 4 种不同虫态 (卵、幼虫、蛹和成虫) 的 DNA 样本进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果均具有单一、明亮清晰的条带, 说明引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾的 4 种不同虫态均可实现准确鉴定 (图 4)。

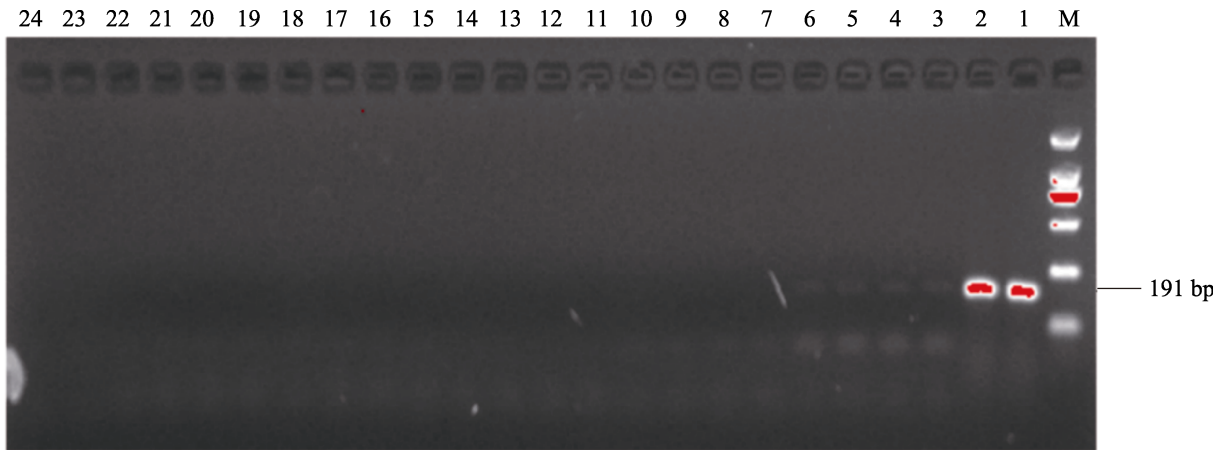


图 3 引物 SF_F3/SF_R3 对 11 种蛾类昆虫的特异性扩增反应
Fig. 3 Specific amplification reactions of primers SF_F3/SF_R3 to 11 species of moths

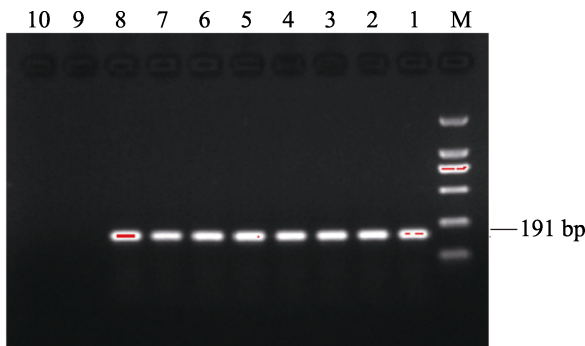


图 4 引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾的卵、幼虫、蛹和成虫的特异性扩增反应
Fig. 4 Specific amplification reactions of primers SF_F3/SF_R3 to the eggs, larvae, pupae and adults of *Spodoptera frugiperda*

M: DNA ladder (2 000 bp); 1-2: 成虫; 3-4: 蛹; 5-6: 幼虫; 7-8: 卵; 9-10: ddH₂O。
M: DNA ladder (2 000 bp); 1-2: Adults; 3-4: Pupae; 5-6: Larvae; 7-8: Eggs; 9-10: ddH₂O.

2.3 PCR 特异性引物灵敏度检测

以浓度 100 ng/μL-10 fg/μL 草地贪夜蛾 DNA 为模板, 利用引物 SF_F3/SF_R3 进行 PCR 特异性扩增 (图 5), SF_F3/SF_R3 特异性引物可扩增出目标条带的最低浓度为 1 ng/μL, 草地贪夜蛾的 DNA 样本浓度为 100 pg/μL 时所扩增出的条带不清晰。因此, 利用 PCR 特异性反应对草地贪夜蛾基因模板检测的浓度下限为 1 ng/μL。

2.4 qPCR 引物和探针的特异性检测

只有在以草地贪夜蛾 DNA 为模板时, 扩增

曲线才存在特异性扩增。2 个草地贪夜蛾基因样本对应的 Ct 值分别为 16.4 和 16.5, 即从第 16 和第 17 个循环, 荧光信号开始以指数形式增长, 其余对照组 DNA 模板 (粘虫、棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾和玉米螟) 以及空白对照在整个反应中都没有出现荧光值的生长信号 (图 6: A)。表明 qPCR 的引物和探针的组合只对草地贪夜蛾具有特异性。

2.5 qPCR 特异性引物和探针的灵敏度检测

以浓度为 100 ng/μL-10 fg/μL 草地贪夜蛾的 DNA 为模板, 草地贪夜蛾特异性引物 CO I SF_60F/154R 和 TaqMan 探针结合, 进行 qPCR 扩增。当浓度大于 10 pg/μL 时, 有荧光信号。因此, 利用 qPCR 进行草地贪夜蛾 DNA 样本扩增的最低检测浓度为 10 pg/μL (图 6: B)。

3 讨论

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 为物种的分类鉴定提供了新的研究手段 (Hebert *et al.*, 2003)。针对形态鉴定困难、个体小及混合样品的昆虫种类, DNA 条形码技术是昆虫物种鉴定中应用最广泛的分子技术手段 (Zhang *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013)。CO I 基因是全球动物鉴定系统的核心标记基因, 具有高度保守序列和足够的变异位点, 不仅在近缘种之间的序列位点存在差异性, 而且可以被通用引物扩增, 已被

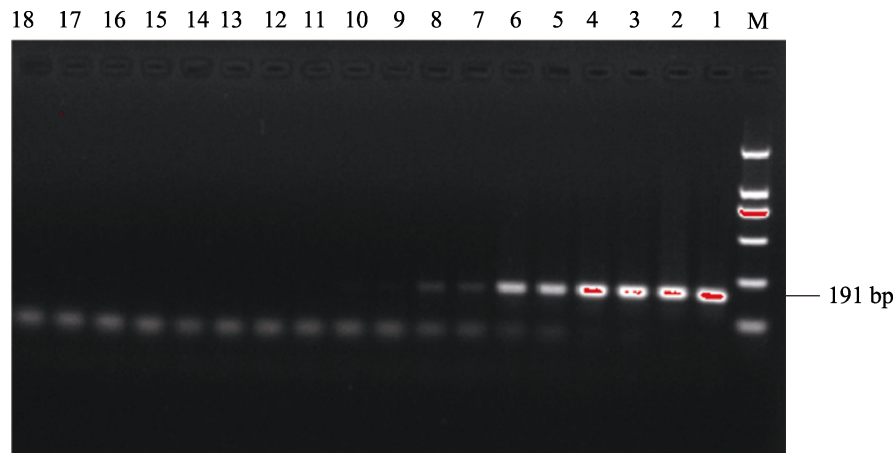


图 5 引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾 PCR 扩增反应的灵敏度检测

Fig. 5 Sensitivity detection of primers SF_F3/SF_R3 to PCR amplification of *Spodoptera frugiperda*

M: DNA ladder (2 000 bp); 1-2: 100 ng/ μ L; 3-4: 10 ng/ μ L; 5-6: 1 ng/ μ L; 7-8: 100 pg/ μ L; 9-10: 10 pg/ μ L; 11-12: 1 pg/ μ L; 13-14: 100 fg/ μ L; 15-16: 10 fg/ μ L; 17-18: ddH₂O (空白对照 Blank control).

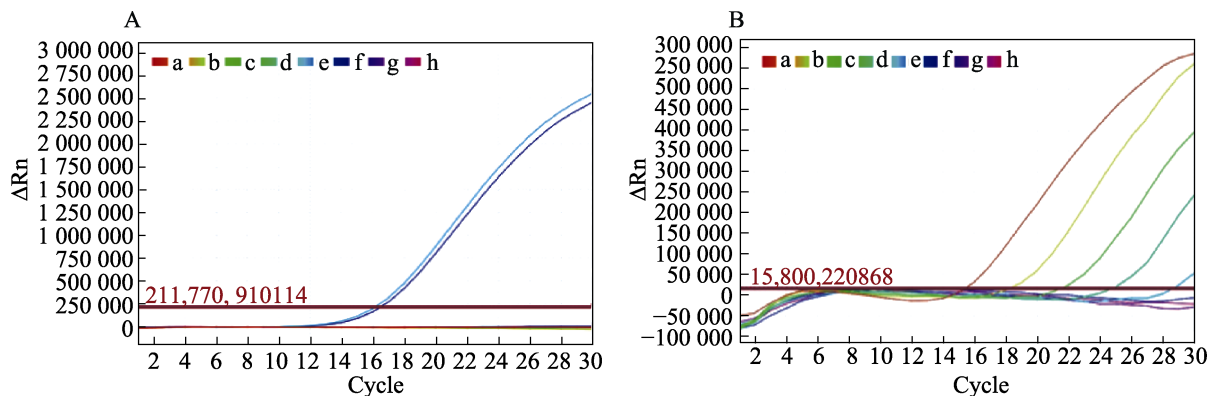


图 6 草地贪夜蛾实时荧光定量 PCR 特异性检测 (A) 与灵敏度检测 (B)

Fig. 6 Real-time PCR Specific detection (a) and sensitivity detection (b) of *Spodoptera frugiperda*

A. 草地贪夜蛾 (e、f), 对照组 (a: 粘虫; b: 棉铃虫; c: 甜菜夜蛾; d: 斜纹夜蛾; g: 玉米螟) 及空白对照 ddH₂O (h); B. a: 100 ng/ μ L; b: 10 ng/ μ L; c: 1 ng/ μ L; d: 100 pg/ μ L; e: 10 pg/ μ L; f: 1 pg/ μ L; g: 100 fg/ μ L; h: ddH₂O (空白对照)。

A. *S. frugiperda* (e, f), control group (a: *Mythimna separata*; b: *Helicoverpa armigera*; c: *S. exigua*; d: *S. litura*; g: *Ostrinia furnacalis*) and ddH₂O (h: Blank control); B. a: 100 ng/ μ L; b: 10 ng/ μ L; c: 1 ng/ μ L; d: 100 pg/ μ L; e: 10 pg/ μ L; f: 1 pg/ μ L; g: 100 fg/ μ L; h: ddH₂O (Blank control).

广泛地应用于昆虫分类和物种分子鉴定研究 (Folmer *et al.*, 1994; Kamran *et al.*, 2020)。基于 mtCO I 基因对入侵山东各地的草地贪夜蛾的分子鉴定, 说明利用 CO I 基因对草地贪夜蛾进行物种鉴定是可行的 (王鹏等, 2020)。

本研究基于 mtDNA COI 基因序列, 根据草地贪夜蛾的保守序列片段设计出 PCR 特异性引物和 qPCR 特异性引物及探针, 并以其他 10 种蛾类昆虫为对照, 对引物的特异性和灵敏度进行

了检测, 确定了草地贪夜蛾的 PCR 特异性引物 SF_F3/SF_R3 和 qPCR 特异性引物 SF_60F/154R 和探针, 对其他 10 种蛾类物种不具有扩增能力。PCR 特异性引物 SF_F3/SF_R3 对草地贪夜蛾卵、幼虫、蛹和成虫均具有同样的扩增效果; 其灵敏度检测限度可达 1 ng/ μ L, DNA 模板为 100 pg/ μ L 时, 出现的目的条带十分微弱。qPCR 特异性引物 SF_60F/154R 和探针只对草地贪夜蛾 CO I 基因具有扩增能力, 对其他 10 种蛾类昆虫基因样

本未有扩增曲线, 其灵敏度检测限度可到 10 pg/ μ L。孔子艺等(2020)利用 mtCOI PCR-RFLP 技术对草地贪夜蛾与斜纹夜蛾、甜菜夜蛾和粘虫成虫进行了鉴别, 可以为草地贪夜蛾的快速鉴定提供支持, 该研究仅证明了以上 3 种对照害虫不存在 *Sbf* I 酶切位点, 并未对更多蛾类昆虫进行验证, 且试虫虫态单一。本研究增加了测试对照物种, 并对不同虫态的草地贪夜蛾进行了扩增鉴定。所筛选出的引物特异性强, 技术方法灵敏度高, 可直接用于草地贪夜蛾不同虫态的物种鉴定及混合样品昆虫残片的物种鉴定。

该研究所建立的基于种特异性种标记的草地贪夜蛾鉴定技术, 不仅特异性高、稳定性好, 而且可在 4 h 内完成对不同虫态草地贪夜蛾及其混合样品的物种鉴定。研究可为其他节肢动物及其混合样品残片的鉴定提供借鉴。

参考文献 (References)

- Chen Q, Duan Y, Hou YH, Chen L, Fan ZY, Shen HL, Liu D, Li LL, Li SM, 2020. Morphological characteristics of *Spodoptera frugiperda* in comparison with three other common noctuidae species at maize filling stage. *Plant Protection*, 46(1): 34–41. [陈琦, 段云, 侯艳红, 陈莉, 范志业, 沈海龙, 刘迪, 李雷雷, 李世民, 2020. 草地贪夜蛾与玉米灌浆期 3 种常见夜蛾科害虫的形态特征比较. 植物保护, 46(1): 34–41.]
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Ge S, Sun X, He W, Wyckhuys KAG, He L, Zhao S, Zhang H, Wu K, 2021. Potential trade-offs between reproduction and migratory flight in *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Insect Physiology*, 132: 104248.
- Guo JF, Jing DP, Tai HK, Zhang AH, He KL, Wang ZY, 2019. Morphological characteristics of *Spodoptera frugiperda* in comparison with three other lepidopteran species with similar injury characteristics and morphology in cornfields. *Plant Protection*, 45(2): 7–12. [郭井菲, 静大鵬, 太红坤, 张爱红, 何康来, 王振营, 2019. 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. 植物保护, 45(2): 7–12.]
- Hebert PDN, Ratnasingham S, De-Waard JR, 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 270(Suppl. 1): S96–S99.
- Jing DP, Guo JF, Jiang YY, Zhao JZ, Sethi A, He KL, Wang ZY, 2020. Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques. *Insect Science*, 27(4): 780–790.
- Kamran M, Yaqub A, Malkani N, Anjum KM, Awan MN, Paknejad H, 2020. Identification and phylogenetic analysis of *Channa* species from riverine system of Pakistan using COI gene as a DNA barcoding marker. *Journal of Bioresource Management*, 7(2): 10.
- Kong ZY, Wang P, Zhu JS, Guo D, Chi XL, Kong BY, Hu L, Chu D, 2020. Rapid differentiation of *Spodoptera frugiperda* from the other three morphologically similar species using mtCOI PCR-RFLP technique. *Journal of Biosafety*, 29(1): 16–22. [孔子艺, 王鹏, 朱军生, 国栋, 迟秀丽, 孔宝玉, 胡磊, 褚栋, 2020. 利用 mtCOI PCR-RFLP 技术鉴别草地贪夜蛾与其他 3 种形态相近昆虫. 生物安全学报, 29(1): 16–22.]
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JA, Hunt TE, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2): 286–300.
- Wang P, He PC, Zhu JS, Guo D, Chu D, 2020. Molecular identification of invasive *Spodoptera frugiperda* individuals in Shandong province based on mtCOI I gene. *Shandong Agricultural Sciences*, 52(2): 97–100. [王鹏, 贺培从, 朱军生, 国栋, 褚栋, 2020. 基于 mtCOI 基因对入侵山东各地草地贪夜蛾的分子鉴定. 山东农业科学, 52(2): 97–100.]
- Wu KM, 2020. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China. *Plant Protection*, 46(2): 1–5. [吴孔明, 2020. 中国草地贪夜蛾的防控策略. 植物保护, 46(2): 1–5.]
- Yang Q, Zhao S, Kučerová Z, Stejskal V, Opit G, Qin M, Cao Y, Li F, Li Z, 2013. Validation of the 16S rDNA and COI DNA barcoding technique for rapid molecular identification of stored product Psocids (Insecta: Psocodea: Liposcelididae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 419–425.
- Zhang B, Liu YH, Wu WX, Wang ZL, 2010. Molecular phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae: Dacini) inferred from mitochondrial sequences of 16S rDNA and COI sequences. *Florida Entomologist*, 93(3): 369–377.
- Zhang Z, Wu CS, Chen ZY, Lin PJ, Zhang YH, Wang JX, Xie AT, Yang JG, Zhao SZ, Yan ZH, Pang HY, 2020. Morphological differences among *Spodoptera frugiperda* and other four similar noctuid species in light trap. *Plant Protection*, 46(1): 42–45, 50. [张智, 武春生, 陈智勇, 林培炯, 张云慧, 王俊侠, 谢爱婷, 杨建国, 赵淑哲, 闫子涵, 庞红岩, 2020. 草地贪夜蛾成虫与灯下 4 种相似种的形态特征比较. 植物保护, 46(1): 42–45, 50.]