



郭木娟, 陈诗敏, 庾家琪, 叶翠怡, 邱宝利, 李文香, 潘慧鹏. 马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫 SCAR 标记的建立及应用 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 434–440.

马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫 SCAR 标记的建立及应用

郭木娟¹, 陈诗敏¹, 庾家琪¹, 叶翠怡¹, 邱宝利¹, 李文香^{2*}, 潘慧鹏^{1*}

(1. 华南农业大学农学院/广东省生物农药创制与应用重点实验室/广东省农业害虫生物防治工程技术研究中心, 广州 510642;

2. 河北北方学院农林科技学院, 河北张家口 075000)

摘要: 为了探索快速鉴定马铃薯瓢虫 *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motschulsky) 和茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Fabricius) 的分子生物学方法, 本研究在随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 的基础上, 分别设计了可以鉴别两个物种的序列特征扩增区域 (sequence characterized amplified regions, SCAR) 标记。从随机合成的 60 条引物中筛选出来 2 条特异性引物 (分别为 OPI-6 和 OPJ-15), 引物 OPI-6 在马铃薯瓢虫中扩增出约 750 bp 的特异性条带, 引物 OPJ-15 在茄二十八星瓢虫中扩增出约 750 bp 的特异性条带, 根据测序结果设计了两对 SCAR 引物对筛选结果进行验证, 发现根据 OPI-6 的测序结果所设计的 SCAR 引物 (OPI-6 test) 仅能在马铃薯瓢虫中扩增出 645 bp 的条带, 而根据 OPJ-15 的测序结果所设计的 SCAR 引物 (OPJ-15 test) 仅能在茄二十八星瓢虫中扩增出 436 bp 的条带。这两对 SCAR 引物能够准确、稳定且快速地区分马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫, 对这两种害虫的精准防控具有重要意义。

关键词: 马铃薯瓢虫; 茄二十八星瓢虫; RAPD 标记; SCAR 标记; 分子鉴定

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-0434-07

Establishment and application of SCAR marker for *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motschulsky) and *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Fabricius)

GUO Mu-Juan¹, CHEN Shi-Min¹, YU Jia-Qi¹, LE Cui-Yi¹, QIU Bao-Li¹, LI Wen-Xiang^{2*}, PAN Hui-Peng^{1*} (1. Agricultural College of South China Agricultural University/Key Laboratory of Biopesticide Creation and Application of Guangdong Province/Guangdong Agricultural Pest Biocontrol Engineering Research Center, Guangzhou 510642, China; 2. College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract: To explore a molecular method for the rapid identification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motschulsky) and *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Fabricius), sequence characteristic amplified regions (SCAR) makers were designed respectively to identify two ladybird beetles based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). Two specific primers (OPI-6 and OPJ-15) were screened out from 60 randomly synthesized RAPD primers. The primer OPI-6 only amplified approximately 750 bp amplicon in *H. vigintioctomaculata*, whereas the primer OPJ-15 only amplified approximately 750 bp amplicon in *H.*

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200900); 广州市科技计划项目 (201804020070)

作者简介: 郭木娟, 女, 1998 年生, 本科生, 主要研究方向昆虫分子生态学, E-mail: 1140513247@qq.com

* 通讯作者: 潘慧鹏, 男, 1984 年生, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫功能基因组学, E-mail: panhuipeg@scau.edu.cn; 李文香, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫化学生态, E-mail: liwenxiang9769@163.com

收稿日期: 2019-03-28; 接受日期 Accepted: 2019-06-17

vigintioctopunctata. Two pairs of SCAR primers were designed based on the sequencing results to validate the screening results. It was found that the SCAR primers (OPI-6 test) based on OPI-6 could amplify 645 bp amplicon in *H. vigintioctomaculata*, whereas SCAR primers (OPJ-15 test) based on OPJ-15 could amplify 436 bp amplicon in *H. vigintioctopunctata*. These two pairs of SCAR primers can distinguish *H. vigintioctomaculata* and *H. vigintioctopunctata* accurately, steadily, and rapidly, which is of great significance for the accurate control of these two pests in the field.

Key words: *Henosepilachna vigintioctomaculata*; *Henosepilachna vigintioctopunctata*; RAPD marker; SCAR marker; molecular identification

马铃薯瓢虫 *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motschulsky) 和茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Fabricius) 均被称为二十八星瓢虫, 属鞘翅目瓢虫科。马铃薯瓢虫以成虫越冬, 多分布在我国北方地区, 其成虫体形为半球形、赤褐色, 各鞘翅上均具有 14 个黑斑 (郭文英等, 2005), 其主要为害的经济作物有马铃薯、茄子、番茄及辣椒等茄科蔬菜, 但以危害马铃薯为主 (高芳瑞, 2018)。茄二十八星瓢虫的外形与马铃薯瓢虫相似度极高, 危害的农作物种类也几乎相同, 但茄二十八星瓢虫以危害茄子为主, 分布的范围更为广泛 (张晓宁和欧晓红, 2010)。两种瓢虫的幼虫及成虫均以叶片为食, 初孵幼虫主要群集于叶片背面取食叶肉, 幼虫稍大后扩散危害, 受害叶片通常形成不规则透明斑或穿孔, 后期变为褐色凹陷斑痕。此外, 嫩茎、花瓣、萼片、果实等也会受其危害, 导致植株产量下降、果实品质不佳或植株枯死, 严重影响马铃薯、茄子等农作物的经济价值 (宋萍等, 2008; 王婧瑜等, 2018)。

虽然有文献提出利用二十八星瓢虫外表形态在细微结构上的区别来鉴定马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫的方法 (王波, 2012), 但是这两种害虫外部形态的区分对于非昆虫分类专业人员来说仍比较困难。近几年来, 随着气候变暖、贸易发展及种植业结构的调整, 马铃薯瓢虫和茄二十八星瓢虫的危害越发严重, 发生范围有扩大蔓延的趋势 (Lü *et al.*, 2019)。然而这两种二十八星瓢虫经常被人们混为一谈, 导致难以制定针对性的田间防治方案, 因此寻找一种能快速区分马铃薯瓢虫及茄二十八星瓢虫的方法十分有必要。

序列特征扩增区域 (sequence characterized amplified regions, SCAR) 是基于随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 发展而来, 经过对 RAPD 标记技术所扩增的目的

片段进行克隆、测序并分析序列, 而后根据测序结果设计出来的稳定性标记 (黄茜等, 2016)。Paran 等 (1993) 首次提出 SCAR 标记技术后, 近二十多年来 SCAR 标记技术被广泛地应用于不同研究领域。其中, 在昆虫的种类鉴定方面也被广泛应用, 例如, 王金娜等 (2012) 利用 SCAR 标记技术筛选出能准确鉴定温室白粉虱 *Trialeurode vaporariorum* 的特异性引物; 孟祥钦等 (2010) 通过 SCAR 标记技术确立了快速鉴定西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 的分子生物学方法。与其它分子标记方法相比, SCAR 标记具有稳定性高、操作简便、特异性强等优点 (马丽娜等, 2017)。

本研究通过对马铃薯瓢虫及茄二十八星瓢虫进行 RAPD 扩增, 找到两种二十八星瓢虫中具有的特异性扩增条带后, 通过切胶回收、克隆及测序后设计 SCAR 标记引物, 从而在分子水平上建立快速区分马铃薯瓢虫和茄二十八星瓢虫的方法, 该鉴定方法高效便捷, 且对二十八星瓢虫的田间精准性防控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试虫

马铃薯瓢虫 2018 年 5 月采于河北省张家口北方学院的教学基地, 经形态学鉴定, 确定为马铃薯瓢虫; 茄二十八星瓢虫 2018 年 4 月采自华南农业大学校园内的龙葵上, 经形态学鉴定, 确定为茄二十八星瓢虫。

1.2 供试试剂

随机引物采用生工生物工程 (上海) 股份有限公司的 RAPD 通用引物系列, 分别为 OPH、OPI、OPJ, 每个系列的引物各 20 条。特异性引物合成以及 DNA 序列测序均委托广州擎科生物技术有限公司完成。PCR 扩增中所用到的 2XPCR Taq MasterMix 购自 abm 生物科技有限公司, DNA 提取

所用试剂盒、DNA 纯化回收所用的试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司、克隆试剂盒购自 TAKARA 生物技术有限公司; DNA 标准 Maker 购自深圳辉诺生物科技有限公司。

1.3 单头马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫 DNA 提取

单头马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫成虫 DNA 提取使用 DNA 提取试剂盒, DNA 浓度用微量核酸浓度测定仪测定, 放置 -20°C 保存备用。

1.4 RAPD 扩增

分别以两种二十八星瓢虫的 DNA 溶液作为模板, 利用合成的 60 条随机引物进行 PCR 扩增, 两种瓢虫分别设置 4 个重复, 以确保筛选出稳定的特异性条带。PCR 扩增体系为 $20\ \mu\text{L}$, 其中包括 $6\ \mu\text{L}$ ddH₂O、 $10\ \mu\text{L}$ 2XPCR Taq MasterMix、 $1\ \mu\text{L}$ DNA 模板及 $3\ \mu\text{L}$ RAPD 引物 ($10\ \text{mM}$)。PCR 反应程序为: 首先进行 94°C 预变性 $4\ \text{min}$, 之后进行 40 个循环 (包括 94°C 变性 $1\ \text{min}$ 、 37°C 退火 $50\ \text{s}$ 、 72°C 延伸 $95\ \text{s}$), 最后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。PCR 程序反应完成后, 从各样品的 PCR 扩增产物中吸取 $5\ \mu\text{L}$ 于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳 ($120\ \text{V}$, $20\ \text{min}$), 并利用凝胶成像分析仪对结果进行分析, 明确特异性扩增的条带。

1.5 特异性扩增产物的回收克隆

对经 RAPD 扩增后在两种二十八星瓢虫中获得的特异性条带, 采用 DNA 纯化回收试剂盒对其进行纯化回收。然后使用克隆试剂盒, 根据说明书步骤, 将纯化回收的目的片段连接到 PMD-18T 载体上, 并转化到 JM109 感受态细胞中, 37°C 过夜培养, 挑白色阳性克隆于 $10\ \mu\text{L}$ ddH₂O 中作为模板, 利用通用引物 M13 (F: $5'\text{-CGCCAGGGTTT TCCCAGTCACGAC-3'}$, R: $5'\text{-CACACAGGAAACAG CTAT-3'}$) 进行 PCR 扩增验证目的条带, 根据电泳结果确定目的条带成功连接到 PMD-18T 载体上后, 将具有目的条带的模板加入 $5\ \text{mL}$ 含 Amp 的 LB 培养基中过夜振荡培养 ($200\ \text{rpm}$, 37°C), 将菌液送广州擎科生物技术有限公司进行测序。

1.6 SCAR 引物设计及 PCR 扩增

基于测序结果, 在 <https://sg.idtdna.com/Primerquest/Home/Index> 网页上设计 SCAR 标记特异性引物, 并利用所提取的马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫的 DNA 作为模板, 验证所设计引物的特异性。PCR 反应体系为 $20\ \mu\text{L}$, 其中包括去离子水 $7\ \mu\text{L}$ 、2XPCR Taq MasterMix $10\ \mu\text{L}$ 、正向引物

$1\ \mu\text{L}$ 、反向引物 $1\ \mu\text{L}$ 及 DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 首先进行 94°C 预变性 $3\ \text{min}$, 之后进行 35 个循环 (包括 94°C 变性 $30\ \text{s}$, 55°C 退火 $45\ \text{s}$, 72°C 延伸 $1\ \text{min}$), 最后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。扩增反应在 PCR 仪上进行, 反应产物同样使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增

在 60 条随机引物中, 引物 OPI-6 (AAGGCGGCAG) 在马铃薯瓢虫中扩增到一条约为 $750\ \text{bp}$ 的条带, 而在茄二十八星中没有扩增到此大小的条带; 另外, 引物 OPJ-15 (TGTAGCAGGG) 在茄二十八星中扩增到一条约为 $750\ \text{bp}$ 的条带, 而在马铃薯瓢虫中没有扩增到此大小的条带。图 1 显示了 OPI-6 在马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫中的随机扩增结果图谱, 图 2 显示了 OPJ-15 在马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫中的随机扩增结果图谱。

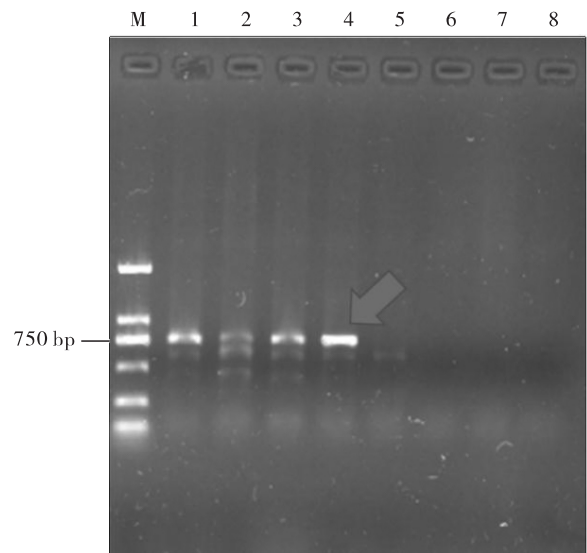


图 1 引物 OPI-6 在两种二十八星瓢虫中的 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 RAPD amplification profiles in two 28-spotted ladybeetles with primer OPI-6

注: M, $2\ 000\ \text{bp}$ 分子量标准; 1-4, 马铃薯瓢虫; 5-8, 茄二十八星瓢虫。Note: M, $2\ 000\ \text{bp}$ marker; 1-4, *H. vigintioctomaculata*; 5-8, *H. vigintioctopunctata*.

2.2 SCAR 引物扩增

对经 RAPD 扩增在两种瓢虫中分别得到的特异性条带进行 DNA 切胶回收、克隆并测序后 (表 1), 根据测序得到的片段设计了两对 SCAR 引

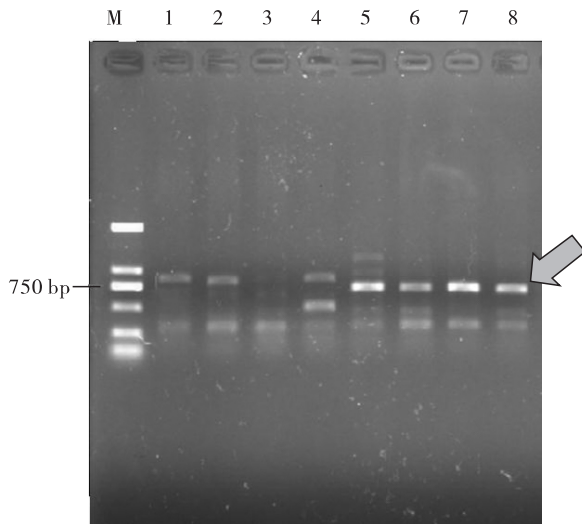


图2 引物 OPJ-15 在两种二十八星瓢虫中的 RAPD 扩增图谱

Fig. 2 RAPD amplification profiles in two 28-spotted ladybeetles with primer OPJ-15

注: M, 2 000 bp 分子量标准; 1-4, 马铃薯瓢虫; 5-8, 茄二十八星瓢虫。Note: M, 2 000 bp marker; 1-4, *H. vigintioctomaculata*; 5-8, *H. vigintioctopunctata*.

物, 分别为 OPI-6 test F: 5'-CGTCTCGGGTCTAGAGAT-3', OPI-6 test R: 5'-GACATACCGCCCGATTAG-3' 和 OPJ-15 test F: 5'-GGTATGGAGTATCACCAAT-3', OPJ-15 test R: 5'-ATTCCTCCGTATCTCTTTC-3'。经过 PCR 及凝胶电泳检测, 确定根据 OPI-6 test 的测序结果所设计的 SCAR 引物仅能在马铃薯瓢虫中扩增出大小为 645 bp 的条带, 而根据 OPJ-15 test 的测序结果所设计的 SCAR 引物仅能在茄二十八星瓢虫中扩增出大小为 436 bp 的条带。

2.3 SCAR 引物灵敏度检测

经微量核酸浓度测定仪检测, 单头马铃薯瓢虫 DNA 浓度为 146.4 ng/ μ L, 单头茄二十八星瓢虫 DNA 浓度为 300.4 ng/ μ L, 将这两种 DNA 溶液均依次稀释 10 倍作为模板, 在马铃薯瓢虫中选取 OPI-6 test 引物, 在茄二十八星瓢虫中选取 OPJ-15 test 引物, 进行 PCR 扩增和检测, 结果表明当马铃薯瓢虫 DNA 浓度稀释到 10^3 倍时仍能检测到目的扩增条带, 而茄二十八星瓢虫 DNA 浓度稀释到 10^4 倍时仍可以检测到目的扩增条带, 引物灵敏度分别达到 0.1464 ng/ μ L 和 0.03004 ng/ μ L。图 4 显示了 OPI-6 test 在马铃薯瓢虫不同稀释倍数 DNA 中的扩增结果, 图 5 显示了 OPJ-15 test 在茄二十八星瓢虫不同稀释倍数 DNA 中的扩增结果。

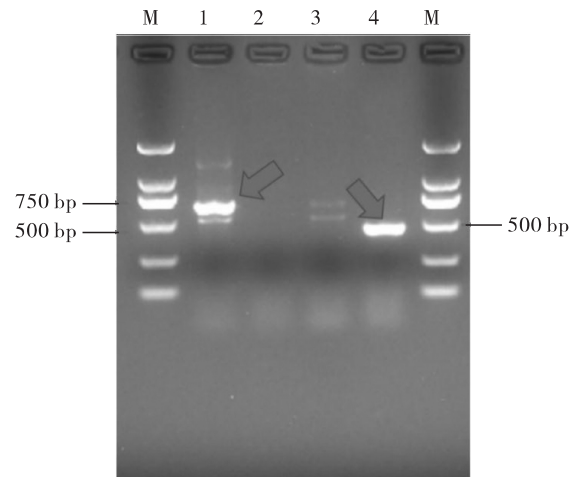


图3 两对 SCAR 引物在两种二十八星瓢虫中的扩增图谱
Fig. 3 The amplification profiles of two pairs of SCAR markers in the two 28-spotted ladybeetles

注: M, 2 000 bp 分子量标准; 1-2, OPI-6 test (1, 马铃薯瓢虫; 2, 茄二十八星瓢虫); 3-4, OPJ-15 test (3, 马铃薯瓢虫; 4, 茄二十八星瓢虫)。Note: M, 2 000 bp marker; 1-2, OPI-6 test (1, *H. vigintioctomaculata*; 2, *H. vigintioctopunctata*); 3-4, OPJ-15 test (3, *H. vigintioctomaculata*; 4, *H. vigintioctopunctata*).

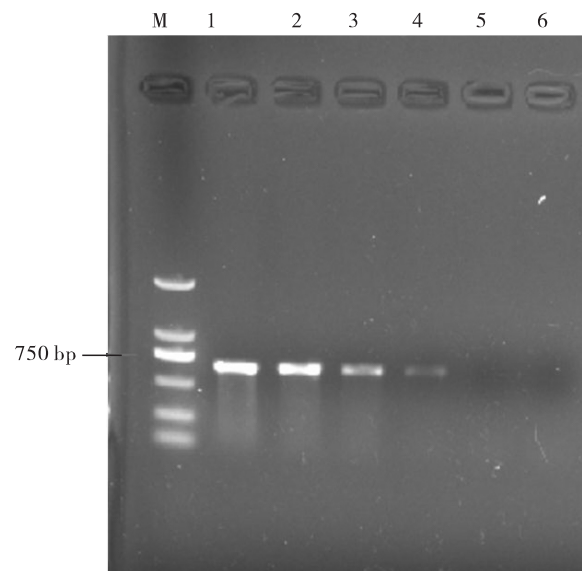


图4 OPI-6 test 引物在马铃薯瓢虫不同稀释倍数 DNA 中扩增结果

Fig. 4 Amplification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* with OPI-6 test under different DNA dilution series

注: M, 2 000 bp 分子量标准; 1, 单头马铃薯瓢虫 DNA 原液 146.4 ng/ μ L; 2, DNA 浓度稀释 10 倍; 3, DNA 浓度稀释 10^2 倍; 4, DNA 浓度稀释 10^3 倍; 5, DNA 浓度稀释 10^4 倍; 6, DNA 浓度稀释 10^5 倍。Note: M, 2 000 bp marker; 1, the concentration of original DNA of *H. vigintioctomaculata* was 146.4 ng/ μ L; 2-6, represents 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} of the original DNA of *H. vigintioctomaculata*.

表 1 OPI-6 在马铃薯瓢虫与 OPJ-15 在茄二十八星瓢虫中特异性扩增子核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of the specific amplicons from OPI-6 in *Henosepilachna vigintioctomaculata* and OPJ-15 in *Henosepilachna vigintioctopunctata*

引物 Primers	核苷酸序列 Nucleotide sequences
OPI-6	GAAGGGGGGGGGGAGGCTAGCGACGGCCAGTGTCTGAGGCTCGGCTGCAATCGCGTGTCCGCTTAAGGGCGGC AGGAAGGTAAGTCCACTATCTAAAATACTCCGAGATACTTTTGTTCGCTGCTCCACCTGACAGGCCGGTCATAAA GACGAATCGAAGGTGGTCTCTCGGCTCTAGAGATCCCTTAAGGAGCAGGGCACCCGTCTTTCTCGGAGAGATGC GCAGATAATTTTCTCTAGCCACTGAGCAGTAGCATCGAGGAAGCGCTGTAGTCTGTCTCCAGTAGTCGTCGGCT GTCAGCCCCCACAAGGAGAGCTAAGTCGTGCGGCTACGCAATACAGGTCCCTCCCAACGAGTTTATATAGGTCAG GCACTCGTCAAAGACCATATTCCACAGAAAAGGCCCCAGAATGGAGCCCTGGGGGCAGCCGCGCGAGAGCTGAC GTGTCTGCTGGTAAGAACCCTGGTTATAGATCAAGGAACGGTCTGTAAATAGCTGGTGAGTAGCAGGTAACAT CCCCCGAAAACCCGCAAGCGAGCCCTCTGAGGACGCTCGCCACCACAAACCGTCAAATGCACCATCTATGT CAATAAAAAATTGAGCTAACATATTTACGGTCAGACTCCCGCGCAAAACGGAGCAAGGCCCCACGGCGTCTCAG TCCCCAGGCCAGAACGAAAACCATATTGACACGAGTTGGCTAAGCCTGATGACGAATATGAGACCTGCATGCGAG CCAGCATGAGGCGCTCCAGCAATTTGCCAAGCTCCGACAGGAGGCTAATCGGGCGGTATGTCTTCGGGTCTGCC TAGGCCTGTCTGCCGCTTAAGGGCAACACGCGATTGCAGTCAATACTGACG
OPJ-15	GTATGGAGTATCACCAATCATTTTTAATAACGTTTGTAGAAAAGATCATCAGAAAATGATAACCTCATATAAGGGG CATAAAAGTTTTCATCACAAAAGAAAATCGGATGAAAGTCAGTTGTCTCGCCTTTGCAAACTACATTGCTGTCAAT ACATATAACAGAACTGAAGTGATTACTGTGAAAACTAAAAATGAAATTACACAGAAAACAGAAATCACGAAT CTACAATATGTAGAAAGTTAGTCAGAAAATAAACCTAAATCACAAGACGTGGCCAAATTCATAATCCAGCCACTT TAAAGACCTCGGAGATCTTATACTTCACAATGCGAATTTACAGCCTCAAAATTAAGGCATTTTAACATAATGATT TTTCCAGAAGCGGTATACGCAGCTGAAACAAAAATTCTCAGAAAAGAGATACGGAGGAATCAATACGAGATCAAT AATGAGACTTAGATTGGAAGACTTCGGAAGGTATGTTATAAAAAAGCAAATATACTGAGAGAAGAAATCAGAAA AAGCCGATCAAAGCCGAGACGAAGTGATGGGAAAACTTGTGGCCTGATCACATCCAGCAACAGTAAACATC CTTCGAAACAAATGTTTTGGGGTTTTTCACAACCAATGGCACTGGACGATTACCTCTTATAACATGGATGATGAA TTCAGTGAAATATATGGAATATTGCGCACCAGGATTGTCCCATTCGTAGAAACGTTTGATGGATCATTTACGAC GACCTAGCTCCCTGCT

3 结论与讨论

本研究共筛选出两条可用于鉴别马铃薯瓢虫和茄二十八星瓢虫的 RAPD 引物, 分别为 OPI-6 和 OPJ-15。其中根据 OPI-6 扩增序列设计的 SCAR 引物 OPI-6 test 能在马铃薯瓢虫中扩增出大小为 645 bp 的条带, 在茄二十八星瓢虫中无扩增条带; 而根据 OPJ-15 扩增序列设计的 SCAR 引物 OPJ-15 test 能在茄二十八星瓢虫中扩增到大小为 436 bp 的条带, 在马铃薯瓢虫中无扩增条带。马铃薯瓢虫和茄二十八星瓢虫的 SCAR 引物在其 DNA 的浓度很低时, 仍能检测到目的扩增条带。所以, 这两对 SCAR 引物能够准确且灵敏的区分两种二十八星瓢虫。

马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫均为我国重要

的农业害虫, 两者外形相似度极高, 寄主植物也几乎相同, 但对于寄主植物的嗜好不同, 且对不同种的化学农药所表现的抗药性也不相同 (张贵森等, 2014; 牛建群等, 2016)。但目前, 对于这两种瓢虫的防治, 还是简单粗糙的采用同样的化学杀虫剂。随着近几年蔬菜种植面积的不断扩增, 二十八星瓢虫在我国蔬菜种植区频繁爆发 (魏鸿钧, 1995; 周雷等, 2014), 严重影响马铃薯、辣椒及茄子等茄科蔬菜的经济效益。因此, 准确区分这两种二十八星瓢虫, 能够针对性地制定防治方案。但是, 目前只有文献提出利用外表形态特征的细微差异对马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫进行鉴别 (虞国跃, 2000; 张迎春等, 2002), 利用该方法对两种二十八星瓢虫进行鉴别难度较大, 且对于标本的完整程度有较高的要求。本文首次开发了快速鉴别马铃薯瓢虫与茄二十八星瓢虫的

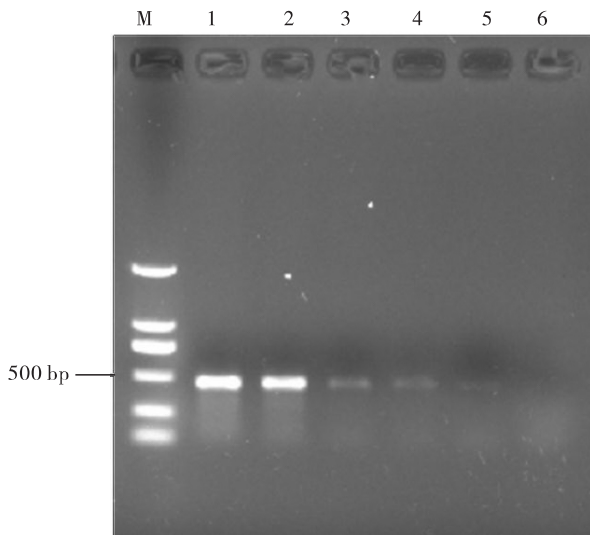


图5 OPJ-15 test 在茄二十八星瓢虫不同稀释倍数 DNA 中的扩增结果

Fig. 5 Amplification of *Henosepilachna vigintioctopunctata* with OPJ-15 test under different DNA dilution series

注: M, 2 000 bp 分子量标准; 1, 单头茄二十八星瓢虫 DNA 原液 300.4 ng/ μ L; 2, DNA 浓度稀释 10 倍; 3, DNA 浓度稀释 10^2 倍; 4, DNA 浓度稀释 10^3 倍; 5, DNA 浓度稀释 10^4 倍; 6, DNA 浓度稀释 10^5 倍。Note: M, 2 000 bp marker; 1, the concentration of original DNA of *H. vigintioctopunctata* was 300.4 ng/ μ L; 2–6, represents 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} of the original genomic DNA of *H. vigintioctopunctata*.

分子生物学方法, 该方法操作简单方便且对标本的完整性无要求, 对二十八星瓢虫的精准防控有重要的意义。

本研究中所设计的两对 SCAR 引物在两种二十八星瓢虫中的扩增图谱单一, 灵敏度高, 且实验操作简单方便, 鉴别准确且快速, 成本较低。所以, 该鉴别方法能够及时监测田间两种二十八星瓢虫的发生动态, 掌握其发生规律, 为制定精准防治方案提供技术支持。

参考文献 (References)

- Gao FR. Feeding Preference and Sensilla of Antenna and Maxillary Palpus of *Henosepilachna vigintioctopunctata* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University Master Thesis, 2018. [高芳瑞. 马铃薯瓢虫取食选择性与触角和下颚须感受器的研究 [D]. 保定: 河北农业大学硕士论文, 2018]
- Guo WY, Yu XT, Zhou CM. Occurrence regularity and control technology of *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Motschulsky)

- [J]. *Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry*, 2005, 6: 24–25. [郭文英, 于喜田, 周春敏. 马铃薯瓢虫的发生规律及防治技术 [J]. 天津农林科技, 2005, 6: 24–25]
- Huang Q, Chen K, Liu JR, et al. Study on sex identification of ginkgo biloba by SCAR molecular markers and leaf shape analysis [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2016, 38 (3): 62–69. [黄茜, 陈珂, 刘霁瑶, 等. SCAR 分子标记和叶形分析对银杏性别鉴定的研究 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2016, 38 (3): 62–69]
- Lü J, Chen SM, Guo MT, et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis of the ladybird beetle *Henosepilachna vigintioctopunctata* [J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 981.
- Ma LN, Qian L, Li J, et al. Advances in the application of SCAR markers in plant quarantine [J]. *South China Agriculture*, 2017, 11 (29): 85–86. [马丽娜, 钱路, 李健, 等. SCAR 标记在植物检疫中应用的研究进展 [J]. 南方农业, 2017, 11 (29): 85–86]
- Meng XQ, Min L, Wang FH, et al. SCAR marker for rapid identification of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53 (3): 323–330. [孟祥钦, 闵亮, 万方浩, 等. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术 [J]. 昆虫学报, 2010, 53 (3): 323–330]
- Niu JQ, Cao DQ, Liu YG, et al. Field efficacy of different insecticides on *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Fabricius) [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44 (10): 150–151. [牛建群, 曹德强, 刘延刚, 等. 不同杀虫剂对茄二十八星瓢虫的田间防效 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44 (10): 150–151]
- Paran I, Michelmore RW. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85 (8): 985–993.
- Song P, Wang QY, Wu HX, et al. Identification of cry gene and its toxicity from *Bacillus thuringiensis* strain WZ-9 against *Henosepilachna vigintioctopunctata* [J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 3: 515–520. [宋萍, 王勤英, 吴会贤, 等. 苏云金芽胞杆菌 WZ-9 菌株对马铃薯瓢虫的毒力及其杀虫基因的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2008, 3: 515–520]
- Wang JY, Wang HX, Wang ZL, et al. Selectivity of adults of *Henosepilachna vigintioctopunctata* to different host plants [J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2018, 15 (22): 1–4. [王婧瑜, 王洪萱, 王在凌, 等. 茄二十八星瓢虫成虫对不同寄主植物的选择性研究 [J]. 长江大学学报 (自然科学版), 2018, 15 (22): 1–4]
- Wang B. Research progress on biological characteristics and control of *Henosepilachna vigintioctopunctata* [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 58 (6): 135–136. [王波. 二十八星瓢虫的生物学特性及生物防治研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2012, 58 (6): 135–136]
- Wang JN, Wang XJ, Zhang YJ, et al. Establishment and application of

- SCAR marker for rapid identification of *Trialeurodes vaporariorum* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2012, 34 (3): 295 – 301. [王金娜, 王相晶, 张友军, 等. 温室白粉虱 SCAR 分子鉴定技术的建立及应用 [J]. 环境昆虫学报, 2012, 34 (3): 295 – 301]
- Wei HJ. Occurrence dynamics of *Henosepilachna vigintioctopunctata* and *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1995, 3: 187 – 188. [魏鸿钧. 马铃薯瓢虫与马铃薯甲虫发生动态 [J]. 昆虫知识, 1995, 3: 187 – 188]
- Yu GY. Identification of ladybug "Twenty – eight stars lady beetles" [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2000, 4: 239 – 242. [虞国跃. “二十八星”瓢虫的辨识 [J]. 昆虫知识, 2000, 4: 239 – 242]
- Zhang XN, Ou XH. Studies on the flora of some species of the subfamily ladybug (Coleoptera: Ladybugidae) in Yunnan Province [J]. *Entomotaxonomia*, 2010, 32 (S1): 53 – 60. [张晓宁, 欧晓红. 云南食植瓢虫亚科部分种类区系研究 (鞘翅目: 瓢虫科) [J]. 昆虫分类学报, 2010, 32 (S1): 53 – 60]
- Zhang GS, Liu HQ, Li YR, et al. Monitoring for insecticides resistance on *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Motschulsky) in Jinzhong and Datong [J]. *Shanxi Agricultural Science*, 2014. [张贵森, 刘慧芹, 李彦蓉, 等. 晋中、大同两地马铃薯瓢虫成虫抗药性监测 [J]. 山西农业科学, 2014]
- Zhang YC, Liu HJ, Zheng ZM. Comparative studies on the surface microstructures of *Henosepilachna vigintioctopunctata* and *Henosepilachna vigintioctopunctata* [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2002, 2: 132 – 135. [张迎春, 刘慧娟, 郑哲民. 马铃薯瓢虫和茄二十八星瓢虫体表细微结构的比较研究 [J]. 昆虫知识, 2002, 2: 132 – 135]
- Zhou L, Wang XP, Li CR, et al. Life table of the laboratory population of *Henosepilachna vigintioctopunctata* at different temperatures [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36 (4): 494 – 500. [周雷, 王香萍, 李传仁, 等. 不同温度下茄二十八星瓢虫的实验种群生命表 [J]. 环境昆虫学报, 2014, 36 (4): 494 – 500]