

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2024.01.003

基于 mtDNA CO I 基因对榕属植物上粉蚧的分子鉴定和系统发育分析

傅卫民^{1,2}, 刘志红³, 蔡波⁴, 李惠萍⁵, 吴福中^{1,2,6*}

¹深圳城市职业学院, 广东 深圳 518116; ²深圳技师学院, 广东 深圳 518116; ³惠州市惠城区农业技术推广中心, 广东 惠州 516001; ⁴海口海关热带植物隔离检疫中心, 海南 海口 570105; ⁵太原海关技术中心, 山西 太原 030006; ⁶惠州海关综合技术中心, 广东 惠州 516006

摘要:【目的】榕属植物是我国华南地区普遍种植的园林植物,本研究旨在明确榕属植物上发生危害的粉蚧种类。【方法】测定榕属植物上发生为害的9种粉蚧的COI基因序列,利用生物信息学软件分析其序列同源性、遗传结构及系统进化关系。【结果】测出38条粉蚧的COI基因序列相似度达到99.25%~100.00%,9种粉蚧的种间遗传距离为0.070~0.173,其中堆蜡粉蚧与菠萝灰粉蚧遗传距离最大,而康氏粉蚧与橘小粉蚧遗传距离最小,说明康氏粉蚧与橘小粉蚧亲缘关系较近。构建的系统发育树中,每种粉蚧与GenBank数据库下载的已知序列聚在一支,系统发育树结果与形态学鉴定结果一致。【结论】线粒体COI基因序列能够快速准确鉴定榕属植物上的粉蚧,也揭示了榕属植物上粉蚧的遗传结构和系统进化关系,为农林业监测和精准防治粉蚧类害虫提供科学依据。

关键词: 榕属植物; 粉蚧; 分子鉴定; 线粒体COI基因; 系统发育



开放科学标识码
(OSID 码)

Molecular identification and phylogenetic analysis of mealybug species in *Ficus* spp. based on mitochondrial CO I gene

FU Weiming^{1,2}, LIU Zhihong³, CAI Bo⁴, LI Huiping⁵, WU Fuzhong^{1,2,6*}

¹City Polytechnic of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518116, China; ²Shenzhen Institute of Technology, Shenzhen, Guangdong 518116, China; ³Agricultural Technology Promotion Center at Huicheng District Huizhou City, Huizhou, Guangdong 516001, China; ⁴Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plant, Haikou Customs District, Haikou, Hainan 570105, China; ⁵Technology Center of Taiyuan Customs District, Taiyuan, Shanxi 030006, China; ⁶Technology Center of Huizhou Customs House, Huizhou, Guangdong 516006, China

Abstract:【Aim】*Ficus* spp. are commonly planted garden plants in the South China. The aim is to identify the species of mealybugs in *Ficus* spp.【Method】The COI gene sequences of 9 species of mealybugs in *Ficus* spp. were amplified, and their sequence homology, genetic structure, and phylogenetic relationship were analyzed using bioinformatics software.【Result】The similarity of 38 sequences of mitochondrial CO I gene reached 99.25%–100.00%, and the interspecific genetic distance of 9 mealybugs was 0.070–0.173. *Nipaecoccus viridis* and *Dysmicoccus brevipes* had the highest genetic distance, while *Pseudococcus comstocki* and *Pseudococcus cryptus* was the smallest, which indicated that *Pseudococcus comstocki* and *Pseudococcus cryptus* were highly closely related. The phylogenetic tree was constructed with each mealybug clustered together using known mealybug sequences downloaded separately from the GenBank database. The results of molecular identification were found to be the same as those of morphological identification.【Conclusion】The mitochondrial COI gene could rapidly and accurately identify mealybugs in *Ficus* spp. and reveal the genetic structure and phylogenetic relationship of mealybugs. It provided a scientific basis for the monitoring, prevention, and precise control of mealybugs in agriculture and forestry.

收稿日期(Received): 2022-12-01 接受日期(Accepted): 2023-09-18

基金项目: 广东省科技项目(2019A141401001); 广东省科技奖入库培育项目(2021C0405004); 海南省自然科学基金(321RC666); 惠州市科技项目(2017C0424040); 深圳技师学院科研项目(2031001、2314001)

作者简介: 傅卫民, 男, 硕士, 高级讲师、高级技师。研究方向: 园林绿化和病虫害防治。E-mail: fwmgood@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), 吴福中, E-mail: zhongwfu@163.com

Key words: *Ficus* spp.; mealybugs; molecular identification; mitochondrial COI gene; phylogenetic

粉蚧是半翅目 Hemiptera 胸喙亚目 Sternorrhyncha 蚧总科 Coccoidea 粉蚧科 Pseudococcidae 昆虫的统称,该类害虫全球分布,危害各种农作物、森林树种、园林观赏树木、花卉以及果树等。粉蚧通过刺吸寄主植物的叶片、茎干、果实等幼嫩部位,使寄主植物缺乏营养,从而影响植物的生理活动,导致植物叶片枯黄、萎蔫,果实掉落。粉蚧分泌的蜜露,引发“煤烟病”,影响植物生长,使植物失去商品价值。有些种类在刺吸寄主、吸食汁液的同时还传播病毒(吴福中等,2016a,2016b; Wu *et al.*, 2014, 2015)。粉蚧是一类在植物上营寄生生活、体型极微小和形态特征特化的昆虫(吴福中,2015; 吴福中等,2020a,2020b,2014),种类鉴定十分困难,需要通过制作玻片标本观察其显微特征才能开展形态学鉴定,但有些种类存在“相似种”和“姊妹种”,很难通过形态学特征进行识别,野外更是无法通过肉眼观察进行区分。因此,有必要利用分子生物学方法开展粉蚧类微小害虫的分子鉴定研究。

应用分子生物学方法对物种进行鉴定以及大量的基因片段广泛应用于物种鉴定中,极大地促进了物种鉴定的发展。Hebert *et al.* (2003b) 应用线粒体 COI 基因解决鳞翅目 200 个近似种的鉴定难题,并提出线粒体 COI 基因适合作为动物鉴定系统的核心标记基因片段,可以应用于物种鉴定的 DNA 条形码。褚栋等(2009)用线粒体 COI 基因对海南扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 种群进行测序,比较了美国佛罗里达扶桑绵粉蚧种群,发现扶桑绵粉蚧形成 2 个支系。徐浪等(2013)用线粒体 COI 基因设计了 2 条特异性探针,应用荧光 PCR 对 2 种粉蚧进行了快速准确的鉴定。吴福中等(2020c)利用 DNA 条形码技术对外来物种扶桑绵粉蚧及其近似种进行了快速准确的鉴定。以上研究主要针对苗木花卉和水果上发生的粉蚧进行了分子鉴定,但很少见对园林树木发生危害的粉蚧开展分子鉴定,尤其是榕属植物上粉蚧类害虫。

本研究对危害我国热带榕属植物粉蚧类害虫开展了广泛的调查,并采集了大量的粉蚧害虫的标本,在形态学鉴定的基础上,开展分子快速鉴定方法研究和系统进化分析,为加强该类害虫的精准防治,防止粉蚧类害虫种群增长,保护我国园林景观

生态安全,也为防治园林病虫害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2012—2020 年,对广东、广西、福建、海南、云南等地的公园、校园、景点、住宅小区等生境进行调查,调查的榕属植物品种有榕树 *Ficus microcarpa* Linn. f.、橡胶榕 *Ficus elastica* Roxb.、雅榕 *Ficus concinna* Miq.、黄葛榕 *Ficus virens* Aiton、垂叶榕 *Ficus benjamina* L.、竹叶榕 *Ficus stenophylla* Hemsl.、高山榕 *Ficus altissima* Blume、大果榕 *Ficus auriculata* Lour. 等。调查采集的虫源置于盛有 95% 酒精的指形管中保存,通过制作玻片标本,在蔡氏电动体视镜(ZEISS SteREO Discovery.V20)下观察玻片标本的形态显微特征,依据 Williams (2004) 和吴福中(2015)关于粉蚧特征描述,确认具体种类。调查到的粉蚧种类有 9 种,分别为橘小粉蚧 *Pseudococcus cryptus* Hempel、康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki* Kuwana、暗色粉蚧 *Pseudococcus viburni* Signoret、南洋臀纹粉蚧 *Placoccus lilacinus* Cockerell、橘臀纹粉蚧 *Placoccus citri* Risso、堆蜡粉蚧 *Nipaecoccus viridis* Maskell、双条拂粉蚧 *Ferrisia virgata* Cockerell、木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus* Green 和菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus brevipes* Cockerell,其中,南洋臀纹粉蚧为检疫性粉蚧,列入中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录。在调查的榕属植物寄主中,粉蚧主要寄生在榕树上危害,其次是橡胶榕,其他品种较少危害,危害都达到中等程度。从粉蚧危害部位看,粉蚧喜寄生在植物新生的根茎和气生根上,植物主干、枝叶上较少。

1.2 基因组 DNA 提取

参照 Promega 试剂盒提取动物组织 DNA 步骤提取供试样品 DNA, -20 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增引物序列参照 Simon *et al.* (1994) 所用引物,扩增的目的片断为 COI 基因序列中的 650 bp 片断。引物序列为 PCO-F1 (5'-CCTTCAAC-TAATCATAAAAATATYAG-3') 和 LEP-R1 (5'-TA-AACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3')。PCR 反应和凝胶电泳参照吴福中等(2020c)扶桑绵粉蚧鉴定,标准 Marker 作为参照进行比较,若电泳的条带

清晰,收集 25 μ L PCR 产物,送上海立菲生物技术服务有限公司进行双向测序。

1.4 序列分析和系统发育树构建

测得的序列用 BIO-edit 软件核查、编辑、拼接,并在 GenBank 数据库 ([https:// www. ncbi. nlm. nih. gov/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) 中 BLAST,进行同源性分析,查找目标序列。从 GenBank 数据库中下载康氏粉蚧、橘臀纹粉蚧、南洋臀纹粉蚧、暗色粉蚧、菠萝灰粉蚧、堆蜡粉蚧、木槿曼粉蚧、橘小粉蚧和双条拂粉蚧序列,登录号分别为 JQ085562、HM474278、HM474306、JQ085549、JQ085558、MH290520、HM474229、HM474370 和 KP692715。

应用 DnaSP 5.0 软件计算单倍型多样性、核苷酸多样性、基因流等,并进行 Tajima's D 中性检验。Tajima's D 值为正值时说明进化方式为平衡选择,且有一些单倍型分化;Tajima's D 值为负值时为负向选择或群体扩张;而 Tajima's D 值接近 0 时,表明群体处于稳定状态。

选取 K2P 双参模型计算遗传距离,以刷毛绵蚧 *Pulvinaria psidii* Maskell 作为外群,用 Mega 5.0 软件计算榕属植物上粉蚧的种间遗传距离,采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建粉蚧的系统发育树,验证形态鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 粉蚧 COI 基因片段的扩增

如图 1 所示,粉蚧 COI 基因 PCR 反应扩增产物长度为 650 bp,扩增质量好,可以进行后续试验。

2.2 相似性比对

序列经正反向拼接、比对和校对,得到长度为

650 bp 的 COI 基因片段 38 条,经与 GenBank 数据库比对,相似度达到 99.25%~100.00% (表 1)。

2.3 榕属植物上粉蚧遗传多样性分析

测定的 38 条 COI 基因序列,涉及 9 种粉蚧,其中橘小粉蚧有 5 个单倍型,康氏粉蚧有 4 个单倍型,堆蜡粉蚧、木槿曼粉蚧、双条拂粉蚧和菠萝灰粉蚧有 3 个单倍型,暗色粉蚧和南洋臀纹粉蚧有 2 个单倍型,而橘臀纹粉蚧只有 1 个单倍型。9 种粉蚧的多态性位点为 0~35,单倍型多样性指数为 0.000~1.000,核苷酸多样性为 0.00000~0.02960,核苷酸平均差异数为 0.000~19.200。Tajima's D 值为 -1.88947~0.83395,表明粉蚧种间差异显著 (表 2)。

2.4 榕属植物上粉蚧遗传距离分析

基于 K2P 双参模型计算榕属植物上 9 种粉蚧的种间遗传距离为 0.070~0.173,其中堆蜡粉蚧与菠萝灰粉蚧遗传距离最大,为 0.173,而康氏粉蚧与橘小粉蚧遗传距离最小,为 0.070,说明两者亲缘关系较近,其他粉蚧间的遗传距离详见表 3。

2.5 榕属植物上粉蚧遗传结构和基因流

通过 DnaSP 软件对榕属植物上粉蚧的 38 条 COI 基因序列分析表明,9 种粉蚧都有不同程度的遗传变异,种间遗传变异高于种内遗传变异,说明榕属植物上的 9 种粉蚧遗传分化来自种群内部。群体间的遗传分化系数是反映不同群体间的分化程度,基因流表示群体间基因交流的水平及影响遗传分化的现象。榕属植物上粉蚧的群体间的遗传分化系数为 0.95,各种群间的平均基因流为 0.01,说明种群间遗传分化不明显。

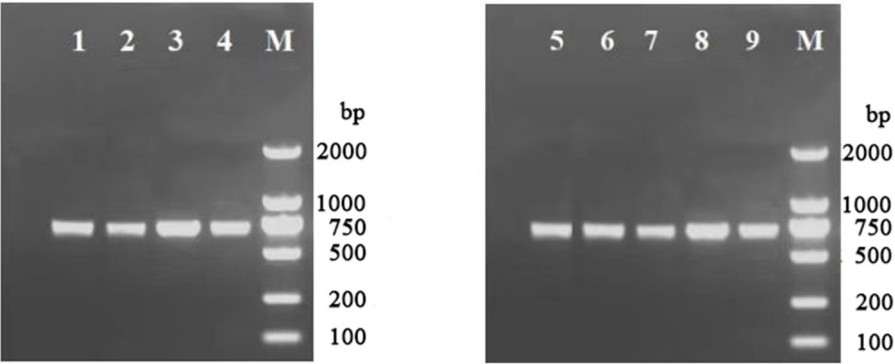


图 1 粉蚧 PCR 扩增图

Fig.1 PCR amplification of mealybugs

1: 康氏粉蚧; 2: 橘臀纹粉蚧; 3: 南洋臀纹粉蚧; 4: 暗色粉蚧; 5: 菠萝灰粉蚧; 6: 堆蜡粉蚧; 7: 木槿曼粉蚧; 8: 双条拂粉蚧; 9: 橘小粉蚧; M: Marker 2000。

1: *Pseudococcus comstocki*; 2: *Placoccus citri*; 3: *Placoccus lilacinus*; 4: *Pseudococcus viburni*; 5: *Dysmicoccus brevipes*; 6: *Nipaecoccus viridis*; 7: *Maconellicoccus hirsutus*; 8: *Ferrisia virgata*; 9: *Pseudococcus cryptus*; M: Marker 2000.

表 1 研究标本与序列信息
Table 1 The information of the mealybug samples and sequences

序号 Slno.	采集地 Locality	采集日期 Collection date	寄主 Host plant	种类 Species	危害程度 Damage rate	凭证标本 Specimen voucher	相似度 Similarity /%
1	厦门 Xiamen	2013-07-10	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	+	FJXM-01	99.85
2	芒市 Mangshi	2014-05-30	雅榕 <i>Ficus concinna</i>	康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	++	YNMS-02	99.25
3	深圳 Shenzhen	2019-08-23	黄葛榕 <i>Ficus virens</i>	康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	++	GDSZ-03	99.70
4	惠州 Huizhou	2020-03-28	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	++	GDHZ-04	99.55
5	蒙自 Mengzi	2012-10-03	雅榕 <i>Ficus concinna</i>	橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	++	YNMZ-01	99.25
6	惠州 Huizhou	2014-02-16	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	++	GDHZ-04	99.80
7	龙岩 Longyan	2013-07-06	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	++	FJLY-02	99.55
8	厦门 Xiamen	2013-07-10	大果榕 <i>Ficus auriculata</i>	橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	++	FJXM-03	99.85
9	惠州 Huizhou	2020-03-28	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>	++	GDHZ-03	100.00
10	深圳 Shenzhen	2019-11-09	垂叶榕 <i>Ficus benjamina</i>	暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>	++	GDSZ-02	100.00
11	河口 Hekou	2013-10-16	竹叶榕 <i>Ficus stenophylla</i>	暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>	++	YNHK-01	99.85
12	汕头 Shantou	2012-08-21	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	+++	GDST-01	99.70
13	梅州 Meizhou	2012-08-22	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	++	GDMZ-02	100.00
14	深圳 Shenzhen	2012-08-23	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	+++	GDSZ-03	100.00
15	中山 Zhongshan	2012-08-25	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	+	GDZS-04	100.00
16	广州 Guangzhou	2012-09-09	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	++	GDGZ-05	100.00
17	版纳 Bannan	2012-10-06	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	++	YNBN-06	99.85
18	厦门 Xiamen	2013-07-10	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	++	FJXM-07	99.85
19	惠州 Huizhou	2014-05-21	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	++	GDHZ-08	99.85
20	韶关 Shaoguan	2012-08-17	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	++	GDSG-01	100.00
21	漳州 Zhangzhou	2013-07-10	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	++	FJZZ-02	100.00
22	芒市 Mangzhi	2014-05-30	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	++	YNMS-03	100.00
23	云浮 Yunfu	2012-07-26	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	+	GDYF-01	99.85
24	文昌 Wenchang	2012-08-10	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	+++	HNWC-02	99.85
25	深圳 Shenzhen	2019-11-09	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	+++	GDSZ-03	100.00
26	深圳 Shenzhen	2012-08-23	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	++	GDSZ-01	99.70
27	版纳 Banna	2012-10-06	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	+	YNBN-02	100.00
28	河口 Hekou	2013-10-16	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	++	YNHK-03	99.70
29	儋州 Danzhou	2012-08-14	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	HNDZ-01	100.00
30	深圳 Shenzhen	2012-08-23	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	GDSZ-02	99.85
31	思茅 Simao	2012-10-10	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	YNSM-03	99.40
32	宾川 Bingchuan	2014-06-03	高山榕 <i>Ficus altissima</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	+	YNBC-04	99.85
33	宾川 Bingchuan	2014-06-05	雅榕 <i>Ficus concinna</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	YNBC-05	99.40
34	深圳 Shenzhen	2019-11-30	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	GDSZ-06	100.00
35	深圳 Shenzhen	2019-12-15	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	GDSZ-07	99.85
36	惠州 Huizhou	2020-04-19	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	++	GDHZ-08	99.85
37	版纳 Banna	2012-10-06	橡胶榕 <i>Ficus elastica</i>	菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	++	YNBN-01	99.85
38	福州 Fuzhou	2013-07-15	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	++	FJFZ-02	99.70
39	版纳 Banna	2012-10-06	金心果 <i>Chrysophyllum cainito</i>	刷毛绵蚧 <i>Pulvinaria psidii</i>			100.00
40	法国 France			康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>		JQ085562	
41	越南 Vietnam			橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>		HM474278	
42	菲律宾 Philippines			南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>		HM474306	
43	法国 France			暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>		JQ085549	
44	法国 France			菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>		JQ085558	
45	美国 American			堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>		MH290520	
46	泰国 Thailand			木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>		HM474229	
47	韩国 South Korea			橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>		HM474370	
48	中国 China			双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>		KP692715	

调查寄主植物每株雌成虫虫量 10 头以下（含 10 头）为轻度危害,以“+”表示；每株雌成虫虫量 10~30 头（含 30 头）为中等程度危害,以“++”表示；每株雌成虫虫量大于 30 头为严重危害,以“+++”表示。

The number of female adults of mealybugs in each host plant was less than 10 (including 10), between 10 to 30 (including 30) and more than 30, which was considered as mild harm, moderate harm, serious harm, and marked as "+", "++" and "+++", respectively.

表 2 榕属植物上粉蚧 COI 基因单倍型及核苷酸多样性分析

Table 2 The analysis of haplotype and nucleotide diversity for COI gene of mealybugs in *Ficus* spp.

物种 Species	多态性位点 Polymorphic sites	单倍型 Haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity	核苷酸平均差异数 Averagenumber of nucleotide differences	中性检验 Tajima's test
康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	15	4	0.900	0.01020	6.600	-0.62926 **
橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	35	5	1.000	0.02960	19.200	0.83395 **
暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>	3	2	0.500	0.00300	1.500	-0.75445 **
南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	1	2	0.222	0.00034	0.222	-1.08823 **
橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	0	1	0.000	0.00000	0.000	
堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	9	3	0.833	0.00693	4.500	-0.82943 **
木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	3	3	1.000	0.00400	2.000	
双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	13	3	0.417	0.00447	2.889	-1.88947 *
菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	3	3	1.000	0.00400	2.000	

* 表示差异显著 ($P<0.05$), ** 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

* indicate significant differences ($P<0.05$), ** indicate extremely significant differences ($P<0.01$) .

表 3 榕属植物上 9 种粉蚧的种间遗传距离

Table 3 The genetic distances of 9 mealybugs in *Ficus* spp.

物种 Species	菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	康氏粉蚧 <i>Pseudo-coccus comstocki</i>	橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>
菠萝灰粉蚧 <i>Dysmicoccus brevipes</i>	0.000								
双条拂粉蚧 <i>Ferrisia virgata</i>	0.105	0.000							
木槿曼粉蚧 <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	0.125	0.106	0.000						
堆蜡粉蚧 <i>Nipaecoccus viridis</i>	0.173	0.159	0.161	0.000					
橘臀纹粉蚧 <i>Placoccus citri</i>	0.123	0.096	0.130	0.158	0.000				
南洋臀纹粉蚧 <i>Placoccus lilacinus</i>	0.107	0.094	0.106	0.157	0.082	0.000			
康氏粉蚧 <i>Pseudococcus comstocki</i>	0.110	0.098	0.092	0.138	0.110	0.091	0.000		
橘小粉蚧 <i>Pseudococcus cryptus</i>	0.121	0.092	0.112	0.138	0.099	0.078	0.070	0.000	
暗色粉蚧 <i>Pseudococcus viburni</i>	0.112	0.110	0.136	0.101	0.101	0.099	0.101	0.092	0.000

2.6 榕属植物上粉蚧系统发育分析

以刷毛绵蚧为外群,用 Mega 5.0 软件采用邻接法构建粉蚧的系统发育树(图 2),康氏粉蚧、橘臀纹粉蚧、南洋臀纹粉蚧、暗色粉蚧、菠萝灰粉蚧、堆蜡粉蚧、木槿曼粉蚧、双条拂粉蚧和橘小粉蚧序列与 GenBank 下载的目标序列 JQ085562、HM474278、HM474306、JQ085549、JQ085558、MH290520、HM474229、KP692715 和 HM474370 分别聚在一起,每种粉蚧单独聚在一支。

系统发育树显示,南洋臀纹粉蚧广东汕头、广州、深圳、梅州、中山、惠州种群,云南版纳种群,福建厦门种群与菲律宾种群聚在一支;橘臀纹粉蚧云南、广东、福建种群与越南种群单独聚为一支;而南洋臀纹粉蚧与橘臀纹粉蚧属于臀纹粉蚧属,亲缘关系较近,所以又聚在一起。在橘小粉蚧种群中,云南蒙自种群、广东惠州种群聚与韩国种群聚在一支,后又与福建厦门、龙岩种群聚在一起,说明橘小粉蚧不同地理种群之间存在遗传距离,部分种群为适应环境发

生了变异。康氏粉蚧云南、广东、福建种群和法国种群聚在一支,但与法国种群存在遗传距离。暗色粉蚧云南、广东种群与法国种群聚在一支,该种群与橘小粉蚧种群、康氏粉蚧种群同属于粉蚧属,但与橘小粉蚧种群、康氏粉蚧种群遗传距离较大。堆蜡粉蚧、木槿曼粉蚧、双条拂粉蚧和菠萝灰粉蚧种群分别与 MH290520(美国种群)、HM474229(泰国种群)、KP692715(中国种群)和 JQ085558(法国种群)独立聚在一支。结果显示,臀纹粉蚧属与粉蚧属亲缘关系较近,堆粉蚧属和曼粉蚧属亲缘关系较近。危害榕属植物害虫粉蚧同属不同种类聚在一支,相同种类的粉蚧不同地理种群也聚在一支,每种粉蚧都各自聚为一支,表明 CO I 基因片段序列能够将为害榕属植物不同种类的粉蚧很好地区分,分子鉴定结果与形态学鉴定结果相同。因此,线粒体 CO I 基因是粉蚧类害虫理想的分子标记,可以用于开展粉蚧等微小害虫的分子鉴定和系统发育分析。

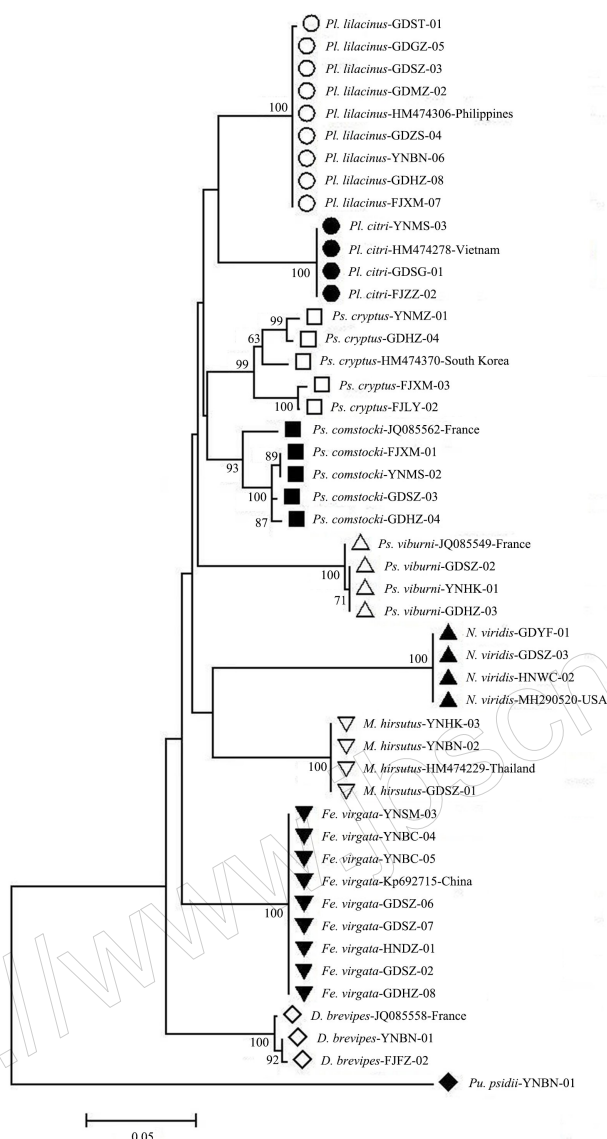


图2 基于 mtDNA COI 基因构建的榕属植物上粉蚧的 NJ 系统发育树

Fig.2 The NJ phylogenetic tree of mealybugs in *Ficus* spp. based on the mtDNA CO I sequences

3 讨论

物种的准确鉴定关系到分类学的发展,传统的分类受研究对象的发育阶段、不同部位以及鉴定人的专业知识和鉴定经验等因素限制,影响了物种鉴定。传统的形态鉴定要求鉴定者具有深厚的专业知识和丰富的鉴定经验,而利用分子生物学方法能够快速、准确鉴定不同粉蚧种类,甚至只用昆虫的部分器官或一段躯体就可鉴定。因此,分子生物学方法可用于微小害虫等有害生物的鉴定,在口岸检疫和农林业害虫防控等领域有广泛的应用前景。

本研究对危害榕属植物的 9 种粉蚧的 CO I 基因进行提取、序列测序以及在 GenBank 数据库中比对分析,结果表明,CO I 基因序列同源性在 99.25% 以上,说明此段序列可信度高。构建的系统发育

树,同种粉蚧单独聚为一支,不同粉蚧种间差异明显,置信度高,系统进化树得出的结果与形态学分类结果一致。榕属植物上 9 种粉蚧的种间遗传距离为 0.070~0.173,其中堆蜡粉蚧与菠萝灰粉蚧遗传距离最大,为 0.173,而康氏粉蚧与橘小粉蚧遗传距离最小,为 0.070,说明两者亲缘关系较近。本研究也符合 Hebert *et al.* (2003a) 利用 CO I 基因鉴定物种时,提出的种间遗传距离应大于种内遗传距离 10 倍、最小种间遗传距离为 2% 的结论。

研究者通过 18S、EF-1 α 、ITS2 和 28S 等基因对粉蚧类进行了鉴定(王玉生等, 2016; 吴媛等, 2022; Alina *et al.*, 2021; Melissa & Monica, 2017; Wu *et al.*, 2014), 结果表明, 线粒体细胞色素 C 氧化酶基因 CO I 具有引物通用性高和进化速率快等

优点,且种内遗传距离小于 1%,是适宜用于开展昆虫等生物鉴定的理想 DNA 条形码,可用于系统发育和遗传进化分析。本研究为国内首次对榕属植物上发生危害的 9 种粉蚧开展分子鉴定,线粒体 CO I 基因序列数据结果与形态鉴定结果一致,说明 CO I 基因开展粉蚧类群的物种鉴定具有可行性,解决了基层农林人员缺乏专业知识和鉴定经验等问题,为农林业害虫的早期预警和精准防治以及口岸防控外来有害生物入侵提供了科学手段。

参考文献

- 褚栋, 刘国霞, 付海滨, 徐卫, 2009. 线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCOI) 序列分析揭示扶桑绵粉蚧复合种存在隐存谱系. *昆虫学报*, 52(11): 89-93.
- 王玉生, 周培, 田虎, 万方浩, 张桂芬, 2016. DNA 条形码技术对重大入侵害虫大洋臀纹粉蚧的鉴定有效性研究. *昆虫学报*, 59(7): 747-758.
- 吴福中, 2015. 重要粉蚧的调查、鉴定和遗传多样性研究. 博士学位论文. 广州: 华南农业大学.
- 吴福中, 李惠萍, 付海滨, 2020a. 扶桑绵粉蚧及其近似种的形态鉴定. *植物检疫*, 34(1): 21-25.
- 吴福中, 李惠萍, 付海滨, 2020b. 危害园林树木扶桑的粉蚧调查和形态鉴定. *环境昆虫学报*, 42(3): 760-765.
- 吴福中, 李惠萍, 刘志红, 付海滨, 奚国华, 谭章龙, 王小勇, 李桂文, 李林鹏, 王徐玫, 胡学难, 2016a. 警惕芒果蚜蚧传入我国. *生物安全学报*, 25(2): 123-126.
- 吴福中, 刘海军, 刘志红, 李惠萍, 王小勇, 胡学难, 付海滨, 奚国华, 2016b. 发生在云南与东盟边境的一种新害虫——热带拂粉蚧. *生物安全学报*, 25(3): 181-184.
- 吴福中, 刘志红, 沈鸿, 于飞, 陈爽爽, 王徐玫, 伍和平, 白学慧, 胡永亮, 曾玲, 2014. 扶桑绵粉蚧对华南地区不同生境园林植物的危害调查及分析. *植物检疫*, 28(4): 64-69.
- 吴福中, 王徐玫, 李惠萍, 付海滨, 2020c. 扶桑绵粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定. *植物检疫*, 34(2): 42-47.
- 吴媛, 黄蓬英, 廖富荣, 方志鹏, 林玲玲, 马克争, 陈劲松, 2022. 甘蔗簇粉蚧的形态和分子鉴定. *植物检疫*, 36(6): 37-41.
- 徐浪, 余道坚, 焦懿, 2013. 新菠萝灰粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定. *植物检疫*, 27(3): 66-69.
- ALINA P, SARAH W Z, STEPHANIE S, JEROME N, JEAN-PHILLIPE M, 2021. Molecular identification of mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae) affecting *Theobroma cacao* for improved pest management. *Proceedings*, 68: 3-7.
- HEBERT P, CYWINSKA A A, BALL S, DEWAARD J, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences*, 270: 313-321.
- HEBERT P, RATNASINGHAM S, DEWAARD J, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B-biological Sciences*, 270: 96-99.
- MELISSA P J, MONICA B M, 2017. Morphological and molecular identification of *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Costa Rica. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2): 1211-1218.
- SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, CRESPI B, LIU H, FLOOK P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society America*, 87(6): 651-701.
- WILLIAMS D J, 2004. *Mealybugs of Southern Asia*. Kuala Lumpur, Malaysia: Southdene Sdn. Bhd.
- WU F Z, MA J, HU X N, ZENG L, 2015. Homology difference analysis of invasive mealybug species *Phenacoccus solenopsis* Tinsley in South China with COI gene sequence variability. *Bulletin of Entomological Research*, 105(1): 32-39.
- WU F Z, LIU Z H, SHEN H, YU F, MA J, HU X N, ZENG L, 2014. Morphological and molecular identification of *Paracoccus marginatus* (Hemiptera pseudococcidae) in Yunan, China. *Florida Entomologist*, 97(4): 1469-1473.

(责任编辑:陈晓雯)