果 树 学 报 2019,36(9):1130-1139
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20180526

福建新记录入侵害虫木瓜秀粉蚧的分子检测鉴定

林凌鸿[1,2,4],郑丽祯[2],史梦竹[2],李建宇[2],
王秋月[1,2,4],李 銮[1,4],傅建炜[2,3*],吴梅香[1,4*]

([1]福建农林大学植物保护学院,福州 350002;[2]福建省农业科学院植物保护研究所,福州 350013;
[3]福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,福州 350013;[4]福建农林大学省部共建闽台作物
有害生物防控国家重点实验室,福州 350002)

摘 要:【目的】基于核糖体28S rDNA基因序列的种特异性PCR方法,快速鉴定福建新纪录入侵性害虫——木瓜秀粉蚧(*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink)。**【方法】**通过1对扩增粉蚧28S rDNA的通用引物(S3660/A335)扩增以木瓜秀粉蚧为靶标,以野外采集的另外10种粉蚧为对照的11种粉蚧的基因片段序列。根据所得基因序列结果并参照GeneBank数据库中已知粉蚧的28S rDNA基因序列,设计出木瓜秀粉蚧28S rDNA的种特异性引物(28S-ParF/28S-MarR),对该种特异性引物的效果进行检验。**【结果】**该种特异性引物对木瓜秀粉蚧的28S rDNA基因具有扩增能力,得到产物大小为446 bp的扩增片段,对其他10种粉蚧均无扩增效果。该引物不仅对木瓜秀粉蚧雌成虫具有稳定的扩增效果,对不同虫态、不同寄主来源以及不同地区来源的木瓜秀粉蚧均有稳定的扩增效果。**【结论】**对福建发现的木瓜秀粉蚧进行分子鉴定并建立了木瓜秀粉蚧快速分子检测技术,可用于识别和防控木瓜秀粉蚧,有助于遏制木瓜秀粉蚧的入侵危害。

关键词:木瓜秀粉蚧;粉蚧;28S种特异引物;分子检测;快速鉴定
中图分类号:S667.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)09-1130-10

A molecular detection and identification method for papaya mealybug (*Paracoccus marginatus*), the first recorded invasive pest in Fujian province of China

LIN Linghong[1,2,4], ZHENG Lizhen[2], SHI Mengzhu[2], LI Jianyu[2], WANG Qiuyue[1,2,4], LI Luan[1,4], FU Jianwei[2,3*], WU Meixiang[1,4*]

(*[1]College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; [2]Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, Fujian, China; [3]Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, Fujian, China; [4]State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China*)

Abstract:【Objective】*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink is an invasive pest with strong diffusion and fecundity. It has caused serious damage to the papaya industry in Central America, Florida (USA), Guam (USA) and India. *Pa. marginatus* was first discovered in Fujian Province (Fuzhou and Zhangzhou) in 2017, showing great potential risks to papaya and other fruit crops, as well as flower industry in Fujian province. Because of the small body size and similar morphological characteristics, the morphological identification of mealybugs was inefficient. Rapid molecular identification of

收稿日期:2019-01-17 接受日期:2019-06-22
基金项目:福建省科技重大专项(2017NZ0003-1-1);国家重点研发计划(2016YFC1202101-4);福建省农业科学院科技创新团队建设项目(STIT2017-1-12);福建省星火计划项目(2017S0029)
作者简介:林凌鸿,男,在读硕士研究生,研究方向为农业昆虫与害虫防治。Tel:18350057570,E-mail:496688081@qq.com
*通信作者 Author for correspondence. Tel:0591-87413086,E-mail:fjw9238@163.com;Tel:13850120839,E-mail:wuivy2000@126.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

different species could be achieved through the use of DNA barcoding technology. Therefore, a technology for rapid molecular identification of *Pa. marginatus* was established based on the species-specific PCR method.【Methods】A species-specific PCR method based on ribosomal DNA-28S gene fragment (28S rDNA) was exploited to establish one technology for rapid detection and identification of *Pa. marginatus*. The additional 10 species of mealybugs (*Phenacoccus solenopsis*, *Dysmicoccus boninsis*, *Nipaecoccus viridis*, *Phenacoccus solani*, *Pseudococcus comstocki*, *Pseudococcus cryptus*, *Planococcus lilacinus*, *Pseudococcus odermatti*, *Planococcus minor and Phenacoccus madeirensi*) were collected in the fields as the contrast. In order to ensure the uniqueness of the source of DNA, the DNA templates were all extracted from one single female adult of these 11 species of mealybugs, respectively. 28S rDNA of the 11 species was amplified by a pair of universal primers (S3660/A335). The obtained partial fragments of 28S rDNA were sequenced. And the phylogenetic tree was established by using a Neighbor-joining (NJ) method. According to the obtained 28S rDNA gene partial sequence of the 11 species and 28S rDNA gene sequences of *Paracoccus galzerae* in GeneBank database, the sequence alignment and analysis were performed on DNAMAN. 28S rDNA species-specific primers (28S-ParF/28S-MarR) for *Pa. marginatus* were designed by selecting the sites with large differences in the sequence. And then, the specific effects, versatility and sensitivity of the specific primers were examined.【Results】The comparative results showed that the similarity between *Pa. marginatus* and *Paracoccus marginatus* isolate S3-668, KP692333 in the GenBank database was 100%. It was also indicated that the mealybugs were identified as *Pa. marginatus* by molecular identification. Phylogenetic analysis indicated that *Pa. marginatus* from Fuzhou and Zhangzhou was clustered in a clade. And that combined with *Paracoccus galzerae* (inter-species genetic distance is 0.058) to form a clade of the genus *Paracoccus*. The results of specificity tests showed that all *Pa. marginatus* specimens could be detected positively and a 446 bp fragment of the 28S rDNA of *Pa. marginatus* was obtained by the species-specific primers, while there was no cross reactions with other 10 species of mealybugs. The species-specific primers not only had a stable amplification effect on female adults, but also were proved to be applicable for the 2nd instar nymphs and the 3rd instar nymphs. *Pa. marginatus* from three different regions (Fuzhou and Zhangzhou in Fujian province, Jinghong in Yunnan province) and six different host plants (*Carica papaya*, *Solanum melongena*, *Plumeria rubra*, *Solanum tuberosum*, *Tithonia diversifolia* and *Duranta erecta*) was also successfully detected by the species-specific primers.【Conclusion】Molecular identification of *Pa. marginatus* first reported in Fujian province was carried out based on 28S rDNA molecular markers. It was proved by experiments that the 28S rDNA species-specific primers had ideal and stable specificity for *Pa. marginatus* and could be used to identify *Pa. marginatus* accurately. A rapid molecular detection technique for *Pa. marginatus* was established based on the species-specific PCR method. The technology has the characteristics of accuracy, rapidity, sensitivity and simplicity. Our present results indicated that the rapid detection technique should be useful in quarantine at ports, in pest detection and in monitoring during transportation of papaya and other fruit tree seedlings, as well as flowers. However, in view of the fact that no other mealybugs of the genus *Paracoccus* has been reported in China, this study can provide a reference for the molecular identification for the closely related species of *Pa. marginatus*.

Key words: *Paracoccus marginatus*; Ealybugs; 28S rDNA species-specific primers; Molecular detection; Rapid identification

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

木瓜秀粉蚧(*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink),又称木瓜粉蚧,英文名papaya mealybug,隶属于半翅目(Hemiptera)蚧总科(Coccoidea)粉蚧科(Pseudococcidae)秀粉蚧属(*Paracoccus*),是一种扩散性、生命力、繁殖力强的重要入侵性害虫。其寄主包括果树、粮食、观赏花卉以及绿植杂草等68科264种植物[1]。该虫目前被认为原产于墨西哥或(/和)中美洲地区。1955年在墨西哥采集到木瓜秀粉蚧第一批标本[2];1992年Williams和Granara de Willink对从伯利兹、哥斯达黎加、瓜地马拉和墨西哥的新热带地区采集到的木瓜秀粉蚧进行描述并将其发表为新种[3]。木瓜秀粉蚧自1995年报道在圣马丁危害后,随即迅速扩散至北美洲、太平洋地区、非洲等至少20个国家或地区[4-6]。2008年以来,亚洲地区的印度尼西亚、印度、斯里兰卡及泰国等国发现发生木瓜秀粉蚧危害并给当地造成严重的经济损失[7-9]。中国境内,台湾省首次报道发生木瓜秀粉蚧危害[10]。2012年,在云南省勐腊县的调查中发现,木瓜秀粉蚧对当地番木瓜种植园和鸡蛋花造成严重危害[11]。2014年广东检验检疫技术中心截获来自泰国、柬埔寨等国的琴叶珊瑚及番木瓜上的木瓜秀粉蚧[12]。卢辉等[13]于2016年报道木瓜秀粉蚧对海南木薯产业造成危害,并预测分析其在海南的适生区分布情况。福建省于2017年9月首次在福州市仓山区的番木瓜、茄子等多种植物上发现木瓜秀粉蚧危害。

粉蚧类昆虫体型小,形态特征差异不明显,近缘种更是难以区分鉴定。利用分子生物学技术(如DNA条形码技术)鉴定昆虫标本已成为昆虫系统分类领域的研究热点,也为快速检测粉蚧种类提供了可行性[14-17]。Saccaggi等[18]通过分析mt DNA基因序列成功区别葡萄绵粉蚧、柑橘臀纹粉蚧和长尾粉蚧;徐浪等[19]通过COI通用引物扩增蚧虫的COI基因部分序列,再将测序所得的序列与BOLD和GenBank中的DNA条形码数据库比对,实现了对新菠萝灰粉蚧及其近似种进行快速准确鉴定。任竞妹[20]基于COI基因的DNA条形码技术对粉蚧进行系统分类并构建DNA条形码数据库,表明线粒体COI基因可作为DNA条形码对粉蚧科昆虫进行物种鉴定。Pacheco da Silva等[21]基于特异性PCR技术设计多重PCR技术手段,成功实现对巴西葡萄园内的5种粉蚧的快速检测,并研发了试剂盒。基于DNA条形码的种特异性引物技术,可以实现在初步形态鉴定,甚至无形态鉴定基础上直接鉴定粉蚧的种类。

本研究通过比对分析木瓜秀粉蚧、柑橘堆蜡粉蚧、扶桑绵粉蚧、甘蔗灰粉蚧等11种粉蚧的28S rDNA序列,设计了木瓜秀粉蚧的种特异性引物,并基于28S rDNA基因序列的种特异性PCR方法,进行种特异性的验证,以期开发木瓜秀粉蚧快速检测试剂盒,为快速检测鉴定木瓜秀粉蚧及监测其扩散提供技术保障。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

本研究所用的粉蚧虫样分别采自福建省福州市、漳州市及云南省景洪市(表1)。采样期间,对粉蚧自然条件下的危害征状进行记录,并在实验室内对采集的虫样进行形态学初步鉴定。粉蚧标本浸泡于无水乙醇中保存,并置于−20℃的冰箱中冷冻保存。

1.2 基因组DNA的提取

将单头粉蚧置于洁净滤纸上晾干后,置于1.5 mL的离心管中,用玻璃研磨棒磨碎虫体,参照OMEGA昆虫基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)的方法提取粉蚧DNA备用。

1.3 28S rDNA基因序列的扩增及电泳检测

以表1中供试粉蚧所提得的DNA为模板,以扩增粉蚧28S rDNA基因的通用引物[15]进行PCR扩增。其中上游引物S3660:5'-GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC-3',下游引物A335:5'-TCGGARGGAACCAGCTACTA-3'。该引物委托福州擎科生物公司合成。

PCR反应体系(25 μL体系)为:2×Taq PCR MasterMix(TIANGEN)12.5 μL,上游引物、下游引物各1.5 μL,模板DNA 4 μL,ddH_2O 5.5 μL;PCR反应参数为:95℃预变性5 min,94℃变性1 min,52℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,运行40个循环;之后在72℃延伸10 min。

取5 μL PCR产物于1.5%(*w*)的琼脂糖凝胶上,在120 V电压下电泳26 min后在紫外凝胶成像系统分析电泳结果。

1.4 28S rDNA基因序列的测定、比对及结果分析

PCR产物委托广州擎科生物公司纯化、克隆及序列双向测定;利用Chromas软件分析测序所得的

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1　供试昆虫样品的采集信息

Table 1　Collecting information for insects used for the study

编号 No.	种名 Species	采集地 Collecting location	寄主植物 Host species	采集时间 Date	NCBI登录号
1	木瓜秀粉蚧 *Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink	福建福州 Fuzhou, Fujian	番木瓜 *Carica papaya*	2017-09	MK873100
2	木瓜秀粉蚧 *Pa. marginatus*	福建福州 Fuzhou, Fujian	茄子 *Solanum melongena*	2017-09	
3	木瓜秀粉蚧 *Pa. marginatus*	福建福州 Fuzhou, Fujian	鸡蛋花 *Plumeria rubra*	2017-11	
4	木瓜秀粉蚧 *Pa. marginatus*	福建福州 Fuzhou, Fujian	马铃薯 *Solanum tuberosum*	2018-01	
5	木瓜秀粉蚧若虫 *Pa. marginatus* nymph	福建福州 Fuzhou, Fujian	番木瓜 *Carica papaya*	2017-10	
6	木瓜秀粉蚧 *Pa. marginatus*	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	肿柄菊 *Tithonia diversifolia*	2017-10	
7	木瓜秀粉蚧 *Pa. marginatus*	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	番木瓜 *Carica papaya*	2017-10	MK873101
8	木瓜秀粉蚧 Pa. marginatus	云南景洪 Jinghong, Yunnan	假连翘 *Duranta erecta*	2017-11	
9	扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	扶桑 *Hibiscus rosa-sinensis*	2017-10	MK873095
10	甘蔗灰粉蚧 *Dysmicoccus boninsis* Kuwana	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	甘蔗 *Saccharum officinarum*	2017-10	MK873097
11	柑橘堆蜡粉蚧 *Nipaecoccus viridis* Newstead	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	柚子 *Citrus maxima*	2017-10	MK873096
12	美地绵粉蚧 *Phenacoccus madeirensis* Green	云南景洪 Jinghong, Yunnan	假连翘 *Duranta erecta*	2017-11	MK873094
13	大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor* (Maskell)	云南景洪 Jinghong, Yunnan	柚子 *Citrus maxima*	2017-11	MK873093
14	石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani* Ferris	福建福州 Fuzhou, Fujian	马铃薯 *Solanum tuberosum*	2018-03	MK873090
15	康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki* Kuwana	福建福州 Fuzhou, Fujian	重楼 *Paris polyphylla*	2018-05	MK873092
16	南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus* Cockerell	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	番荔枝 *Annona squamosa*	2018-07	MK873099
17	橘小粉蚧 *Pseudococcus cryptus* (Hempel)	福建福州 Fuzhou, Fujian	南瓜 *Cucurbita moschata*	2018-07	MK873091
18	*Pseudococcus odermatti* Miller and Williams	福建福州 Fuzhou, Fujian	葡萄 *Vitis vinifera*	2018-07	MK873098

DNA图谱，对峰图进行分析和序列单一性检查。通过DNAMAN进行序列拼接，去除两端的序列，保留结果一致的28S rDNA基因片段序列；再将所得DNA序列在NCBI上进行BLAST相似性检索；将相似度99%以上的序列下载，经DNAMAN软件的多序列比对再次核对，确定序列检测结果。再利用MEGA7.0.26软件以邻接法（Neighbor-joining Method，NJ）并选择Kimura-2-Parameter遗传距离模型构建系统发育树，同时对各分支进行1 000次Bootstrap检验。

1.5　木瓜秀粉蚧特异性引物设计

根据序列测定结果，以木瓜秀粉蚧、扶桑绵粉蚧、甘蔗灰粉蚧、柑橘堆蜡粉蚧、石蒜绵粉蚧、康氏粉蚧、橘小粉蚧、南洋臀纹粉蚧、*Pseudococcu odermatti*、大洋臀纹粉蚧、美地绵粉蚧和在NCBI数据库已知的木瓜秀粉蚧亲缘种*Paracoccus galzerae*（登录号：KY565044.1）的28S rDNA基因片段序列，在DNAMAN软件上进行比对，选取碱基序列差异较大的位点，设计一对木瓜秀粉蚧特异性引物（28S-parF/marR）。其中，上游引物为28S-parF：5’-CGGAATTCAGAATTTGTGGCGTTTAC-3’；下游引物为28S-marR：5’-CGGCCATATTACAAGAAT-3’。引物由福州擎科生物公司合成。

1.6　木瓜秀粉蚧特异性引物的PCR反应体系和参数

木瓜秀粉蚧种特异性引物（28S-parF/marR）的PCR反应体系（25 μL体系）为：2×Taq PCR Master-Mix（TIANGEN）12.5 μL，上游引物、下游引物各1.5

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

μL，模板DNA 1 μL，ddH_2O 8.5 μL。

木瓜秀粉蚧种特异性引物（28S-parF/marR）的PCR反应参数为：94℃预变性4 min，94℃变性1 min，56℃退火1 min，72℃延伸1.5 min，运行30个循环；最后72℃延伸10 min。

1.7 木瓜秀粉蚧种特异性引物的特异性检测

以福建省内采集的木瓜秀粉蚧、扶桑绵粉蚧、甘蔗灰粉蚧、柑橘堆蜡粉蚧、石蒜绵粉蚧、康氏粉蚧、橘小粉蚧、南洋臀纹粉蚧、*Pseudococcus odermatti*，以及云南省采集的大洋臀纹粉蚧、美地绵粉蚧的单头成虫提取的DNA为模板，检测木瓜秀粉蚧种特异性引物效果；其中，以木瓜秀粉蚧为阳性对照，以双蒸水代替DNA做阴性对照。按1.6提供的体系和参数进行PCR扩增，琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.8 木瓜秀粉蚧种特异性引物的通用性检测

为检测该特异性引物对木瓜秀粉蚧的通用性扩增效果，选取不同寄主来源的木瓜秀粉蚧成虫及番木瓜上的木瓜秀粉蚧若虫为模板并提取DNA，以双蒸水代替DNA做阴性对照，按1.6提供的体系和参数进行PCR扩增，采用琼脂糖凝胶电泳检测结果。

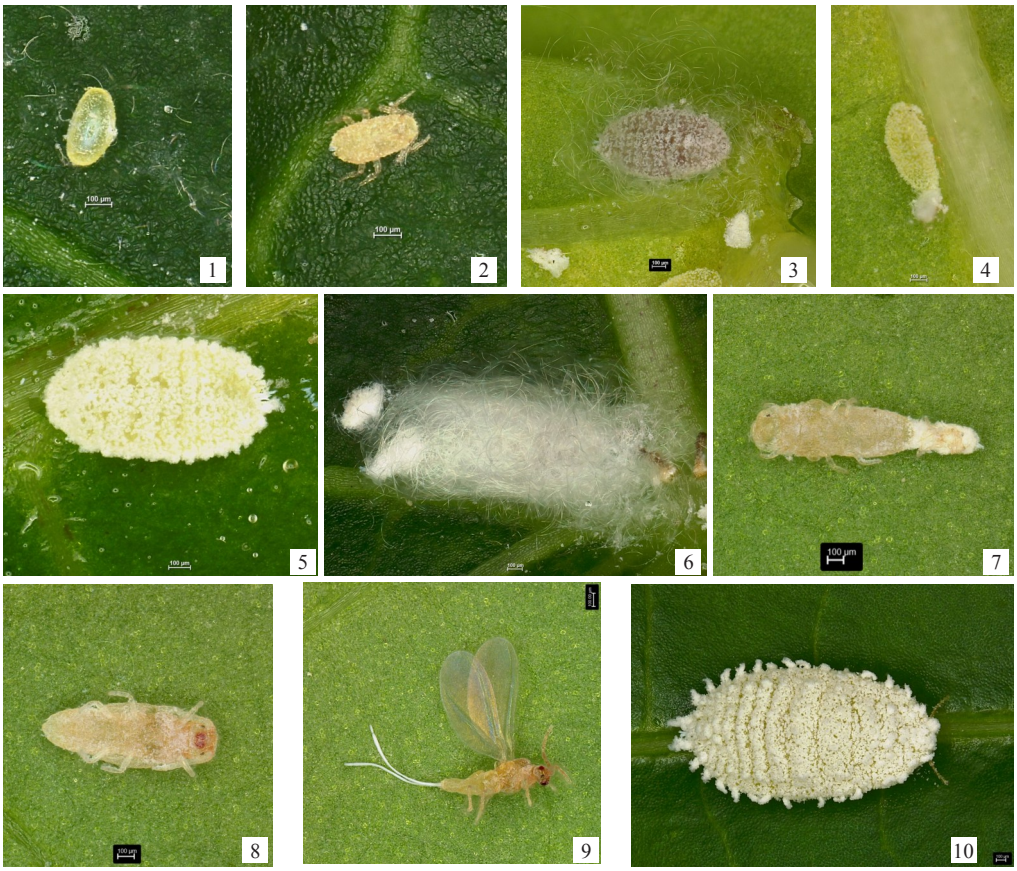
1.9 木瓜秀粉蚧种特异性引物的灵敏度检测

为确定该特异性引物对模板DNA浓度的反应效果，以单头木瓜秀粉蚧提取的DNA为起始参考依据，在NanoDrop 2000C超微量分光光度计上测得DNA浓度，并将该DNA以梯度稀释法，按10倍梯度逐级稀释成5个梯度浓度。以双蒸水代替DNA做阴性对照，按1.6提供的体系和参数进行PCR扩增，采用琼脂糖凝胶电泳检测结果。

2 结果与分析

2.1 木瓜秀粉蚧的形态及其危害

木瓜秀粉蚧是雌雄二型昆虫，各发育阶段形态见图1。雌成虫体型为椭圆形，无翅，体长1.5~2.7 mm，宽0.9~1.7 mm，体被白色薄蜡粉，虫体呈淡黄



1. 卵；2. 1龄若虫；3. 2龄雄若虫；4. 2龄雌若虫；5. 3龄雌若虫；6. 茧（包裹雄若虫）；7. 3龄雄若虫（腹面观）；8. 4龄雄若虫（腹面观）；9. 雄成虫（侧面观）；10. 雌成虫（背面观）。

1. Egg; 2. 1st instar nymph; 3. 2nd instar male nymph; 4. 2nd instar female nymph; 5. 3rd instar female nymph; 6. Cocoon (wrapping male nymph); 7. 3rd instar male nymph (ventral view); 8. 4th instar male nymph (ventral view); 9. Male adult (side view); 10. Female adult (back view).

图1 木瓜秀粉蚧各发育阶段形态

Fig. 1 Morphologiy map of various development stages of *Paracoccus marginatus*

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

色；触角8节，体缘有16对短蜡丝；蕈状腺只分布于虫体边缘，透明孔位于后足基节上，后足胫节没有腺孔。雄成虫呈细长椭圆形，体长0.9~1.1 mm，胸宽最大0.3 mm，体色为粉红色，头胸硬化明显，具发达的2对单眼和1对侧单眼，口器退化，有1对膜质前翅和1对退化为平衡棒的后翅，具有一定的飞行能力[4,22]。

木瓜秀粉蚧营两性生殖，雌性若虫共有3龄，雄性若虫共有4龄。世代历期为40~50 d。木瓜秀粉蚧以口针刺吸寄主植物的汁液，可导致寄主植物的叶片畸形、失绿或脱落，严重影响果实品质，其分泌的蜜露可诱发煤烟病，影响寄主植物的光合作用，甚至导致植株死亡[22-23]。木瓜秀粉蚧对番木瓜的危害见图2。

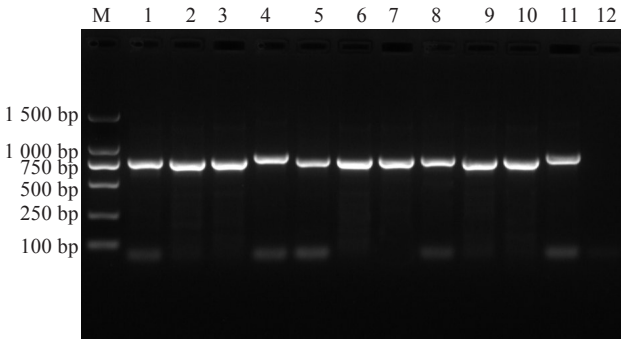
图2　木瓜秀粉蚧对番木瓜的危害

Fig. 2　Damaged of Papaya fruit by the *Paracoccus marginatus*

2.2　粉蚧28S rDNA基因的PCR扩增

通过扩增粉蚧28S rDNA的通用引物S3660/A335对木瓜秀粉蚧、扶桑绵粉蚧、甘蔗灰粉蚧、柑橘堆蜡粉蚧、石蒜绵粉蚧、康氏粉蚧、橘小粉蚧、南洋臀纹粉蚧、*Pseudococcus odermatti*、大洋臀纹粉蚧、美地绵粉蚧总计11种粉蚧进行PCR扩增，电泳结果表明，该通用引物对上述11种粉蚧均扩增到约800 bp的条带（图3）。

经测序并将结果进行分析、序列拼接后得到上述11种粉蚧的28S rDNA基因的片段序列。经与GenBank中已发布的相应种类的基因片段序列相比较，相似度均达99%以上。经比对分析，木瓜秀粉蚧与数据库中*Paracoccus marginatus* isolate S3-668，KP692333的相似度为100%，经分子鉴定，确定该粉蚧为木瓜秀粉蚧。



M. DNA 分子质量标准；1. 木瓜秀粉蚧；2. 扶桑绵粉蚧；3. 甘蔗灰粉蚧；4. 柑橘堆蜡粉蚧；5. 石蒜绵粉蚧；6. 康氏粉蚧；7. 橘小粉蚧；8. 南洋臀纹粉蚧；9. 大洋臀纹粉蚧；10. 美地绵粉蚧；11. *Pseudococcus odermatti*；12. 阴性对照（ddH_2O）。

M. DNA ladder marker; 1. *Paracoccus marginatus*; 2. *Phenacoccus solenopsis*; 3. *Dysmicoccus boninsis*; 4. *Nipaecoccus viridis*; 5. *Phenacoccus solani*; 6. *Pseudococcus comstocki*; 7. *Pseudococcus cryptus*; 8. *Planococcus lilacinus*; 9. *Planococcus minor*; 10. *Phenacoccus madeirensis*; 11. *Pseudococcus odermatti*; 12. ddH_2O control.

图3　粉蚧28S通用引物S3660/A335对11种粉蚧的扩增结果电泳检测

Fig. 3　PCR amplification of 11 mealybug species using 28S rDNA gene universal primer S3660F/A335R of 28S rDNA gene

2.3　系统发育分析

选以NCBI数据库中蜡蚧科的中华蜡蚧*Ceroplastes sinensis*（登录号：KY085826.1），藤壶蜡蚧*Ceroplastes cirripediformis*（登录号：MF491418.1）作为外群。对试验测序所得的11种粉蚧的28S rDNA基因片段序列，以及在NCBI数据库下载的*Paracoccus galzerae*（登录号：KY565044.1）的28S rDNA序列进行系统发育分析。运用MEGA7.0.26软件，采用邻接法并选择Kimura-2-Parameter遗传距离模型构建系统发育树，同时对各分支进行1 000次Bootstrap检验。结果表明（图4），来自福州（寄主为番木瓜）和漳州（寄主为番木瓜）的木瓜秀粉蚧聚为一支，分支支持率为100%。并与*Paracoccus galzerae*汇成一支（遗传距离为0.058），共同构成秀粉蚧属分支。而粉蚧属*Pseudococcus*、臀纹粉蚧属*Planococcus*、绵粉蚧属*Phenacoccus*的粉蚧均各自聚成独立的分支。

2.4　木瓜秀粉蚧28S rDNA种特异性引物特异性检测

利用设计的木瓜秀粉蚧28S rDNA特异性引物28S parF/marR对上述11种粉蚧进行特异性PCR扩增。电泳结果表明，该特异性引物对木瓜秀粉蚧有

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

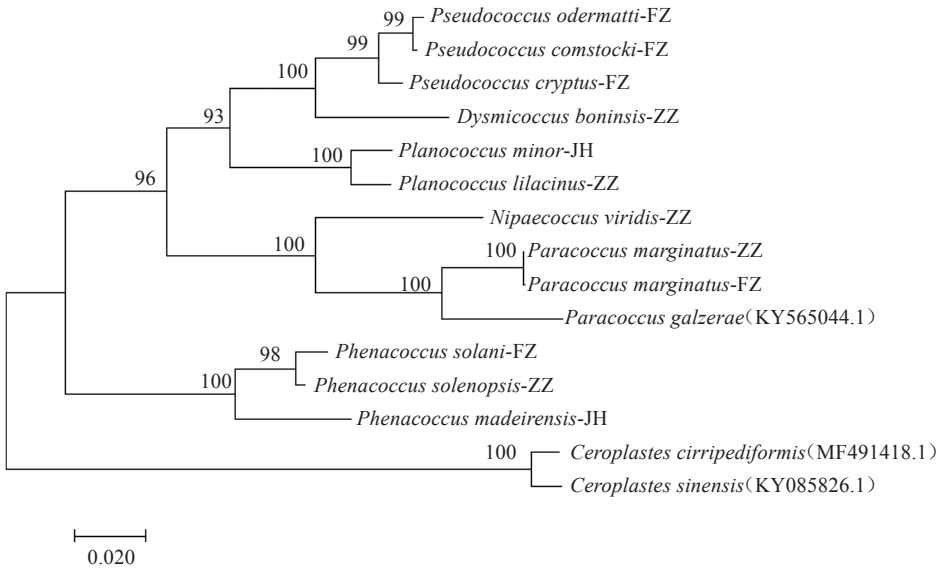
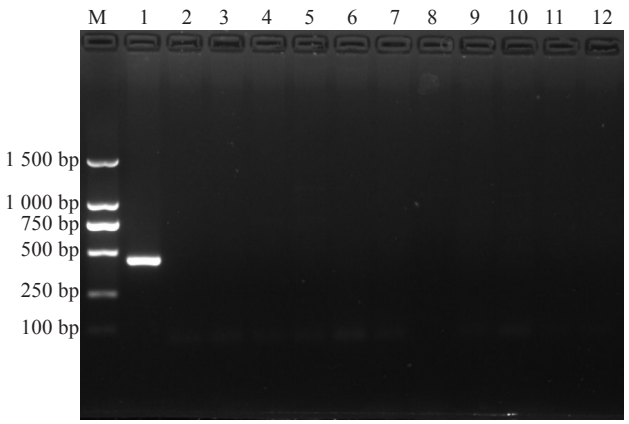


图 4 基于 28S rDNA 基因构建的 NJ 树

Fig. 4 The Neighbor-joining tree based on 28S rDNA

良好的专一性，成功扩增得到约 446 bp 产物（图 5）。同时，对粉蚧科不同种间的其他粉蚧均无扩增产物，因此认为该引物能特异性识别木瓜秀粉蚧，特异性效果理想。



M. DNA 分子质量标准; 1. 木瓜秀粉蚧; 2. 扶桑绵粉蚧; 3. 甘蔗灰粉蚧; 4. 柑橘堆蜡粉蚧; 5. 石蒜绵粉蚧; 6. 康氏粉蚧; 7. 橘小粉蚧; 8. 南洋臀纹粉蚧; 9. 大洋臀纹粉蚧; 10. 美地绵粉蚧; 11. *Pseudococcus odermatti*; 12. 阴性对照（ddH_2O）。

M. DNA ladder marker; 1. *Paracoccus marginatus*; 2. *Phenacoccus solenopsis*; 3. *Dysmicoccus boninsis*; 4. *Nipaecoccus viridis*; 5. *Phenacoccus solani*; 6. *Pseudococcus comstocki*; 7. *Pseudococcus cryptus*; 8. *Planococcus lilacinus*; 9. *Planococcus minor*; 10. *Phenacoccus madeirensis*; 11. *Pseudococcus odermatti*; 12. ddH_2O control.

图 5 木瓜秀粉蚧种特异性引物 28S-parF/marR 的特异性检验

Fig. 5 PCR amplification of *Paracoccus marginatus* and other 10 mealybug species using 28S-parF/marR species-specific primers

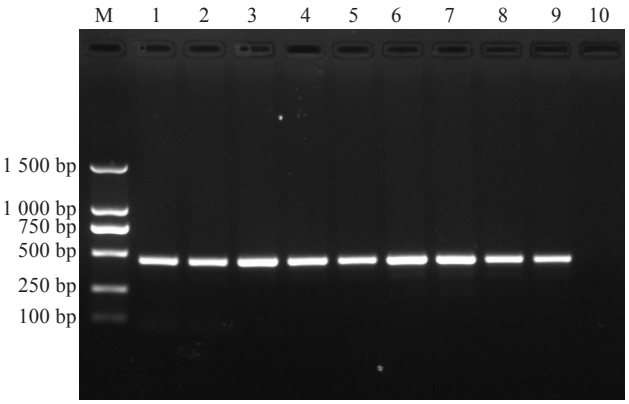
2.5 木瓜秀粉蚧 28S rDNA 种特异性引物通用性检测

利用设计的木瓜秀粉蚧 28S rDNA 特异性引物 28S parF/marR 对不同寄主来源、不同地区来源的木瓜秀粉蚧雌成虫以及番木瓜上不同虫态的木瓜秀粉蚧进行 PCR 扩增，电泳结果表明，该特异性引物对不同寄主来源、不同地区来源及不同虫态的木瓜秀粉蚧均有良好的扩增效果，均能成功扩增得到约 446 bp 产物（图 6）。因此认为该特异性引物对木瓜秀粉蚧通用性扩增效果理想。

2.6 木瓜秀粉蚧 28S rDNA 种特异性引物灵敏度检测

通过 OMEGA 昆虫 DNA 提取试剂盒（柱提法）提取单头木瓜秀粉蚧雌成虫 DNA，并在 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计上测得 DNA 质量浓度为 10.6 $ng \cdot \mu L^{-1}$。按梯度稀释法，将原 DNA 按 10 倍浓度梯度稀释成 1.06、1.06×10^{-1}、1.06×10^{-2}、1.06×10^{-3} $ng \cdot \mu L^{-1}$ 共 5 个梯度浓度。利用设计的木瓜秀粉蚧 28S rDNA 特异性引物 28S-parF/marR 对上述 DNA 进行 PCR 扩增。电泳检测结果表明，当 DNA 质量浓度为 10.6 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 和 1.06 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 时，能扩增得到约 446 bp 的条带；当 DNA 质量浓度为 1.06×10^{-1} $ng \cdot \mu L^{-1}$ 时，能得到较暗的条带；而当 DNA 质量浓度为 1.06×10^{-2} $ng \cdot \mu L^{-1}$ 及 1.06×10^{-3} $ng \cdot \mu L^{-1}$ 时，均无条带。表明当 DNA 质量浓度大于 0.106 $ng \cdot \mu L^{-1}$ 时，能成功扩增出目的条带（图 7）。因此认为，该引物对目标 DNA

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

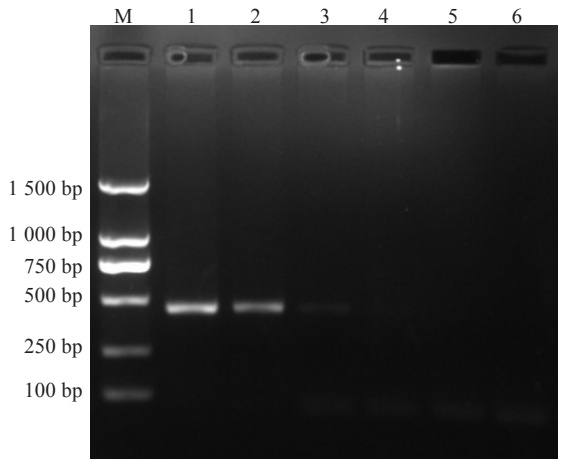


M. DNA 分子质量标准; 1. 福州番木瓜; 2. 福州茄子; 3. 福州马铃薯; 4. 福州鸡蛋花; 5. 漳州番木瓜; 6. 漳州肿柄菊; 7. 云南景洪假连翘; 8. 番木瓜 2 龄若虫; 9. 番木瓜 3 龄若虫; 10. 阴性对照(ddH_2O)。

M. DNA ladder; 1. *Carica papaya* from Fuzhou, Fujian; 2. *Solanum melongena* from Fuzhou, Fujian; 3. *Solanum tuberosum* from Fuzhou, Fujian; 4. *Plumeria rubra* from Fuzhou, Fujian; 5. *Carica papaya* from Zhangzhou, Fujian; 6. *Tithonia diversifolia* from Zhangzhou, Fujian; 7. *Duranta erecta* from Jinghong, Yunnan; 8. The 2nd instar nymphs from *Carica papaya*; 9. The 3rd instar nymphs from *Carica papaya*; 10. ddH_2O control.

图 6　木瓜秀粉蚧种特异性引物 28S-parF/marR 对不同寄主/来源/虫龄的木瓜秀粉蚧通用性检测

Fig. 6　PCR amplification of *Paracoccus marginatus* from different hosts/sources/ages plant using 28S-parF/marR species-specific primers



M. DNA 分子质量标准; 1. 模板 DNA 质量浓度为 10.6 ng·μL^{-1}; 2. 模板 DNA 质量浓度为 1.06 ng·μL^{-1}; 3. 模板 DNA 质量浓度为 1.06×10^{-1} ng·μL^{-1}; 4. 模板 DNA 质量浓度为 1.06×10^{-2} ng·μL^{-1}; 5. 模板 DNA 质量浓度为 1.06×10^{-3} ng·μL^{-1}; 6. 阴性对照(ddH_2O)。

M. DNA ladder marker; 1-5. The concentration of template DNA is 10.6, 1.06, 1.06×10^{-1}, 1.06×10^{-2} and 1.06×10^{-3} ng·μL^{-1}, respectively; 6. Negative control (ddH_2O).

图 7　木瓜秀粉蚧种特异性引物 28S-parF/marR 对不同浓度 DNA 的灵敏度检测

Fig. 7　PCR amplification for diluted DNA concentrations of *Paracoccus marginatus* a single female adult using 28S-parF/marR species-specific primers

浓度有良好的响应。

3　讨　论

随着全球经济一体化和“一带一路”倡议的推行，入侵生物对我国的威胁与危害与日俱增，我国每年由于外来入侵生物造成的经济损失高逾 2 000 亿元[24]。木瓜秀粉蚧是一种扩散性和繁殖力极强的入侵性害虫，其 1 龄若虫具有较强的移动能力，可从带虫植株转移至邻近健康植株上。若虫及成虫亦可随气流、风雨、动物、机械以及果实移动而扩散危害。也能通过苗木运输和果实产品运输而实现远距离扩散[25]。该虫喜食番木瓜，是番木瓜上重要的害虫之一，曾对中美洲地区、美国佛罗里达州、关岛以及印度等地区的番木瓜产业造成严重危害[5,25]。通过风险评估分析认为，福建省是木瓜秀粉蚧的适生区，局部地区是高适生区[26]。2017 年起，在福建中部地区福州市以及南部地区漳州市均有发现木瓜秀粉蚧的危害，因此可以推测福建省闽南地区、闽东地区和闽中地区可能有该虫的发生危害。福建省是中国番木瓜主产区之一，据本项目组不完全统计，2017—2018 年福建省有规模种植的番木瓜产地面积约 170 hm^2，番木瓜产业的年产量约为 6 000 t。因此，希望能引起有关部门的重视，对木瓜秀粉蚧进行适时控制，以防止木瓜秀粉蚧对番木瓜产业造成进一步危害。

针对入侵生物的风险预警和快速检测监测对于保护我国的粮食安全、经济安全、生物安全、生态安全和农产品贸易安全具有重大意义[27]。针对粉蚧种间差异小、较难以简单的形态特征进行识别的特点，徐浪等[28]建立了大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor* Maskell 和南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus* Cockerell 荧光 PCR 特异性检测方法；田虎等[29]根据 CO Ⅰ基因种的特异性，设计了扶桑绵粉蚧种特异性 CO Ⅰ引物，成功鉴别了扶桑绵粉蚧；王玉生等[30]的研究确定了基于 CO Ⅰ基因的条形码用于大洋臀纹粉蚧的快速准确鉴定的方法。黄蓬英等[31]和马光昌等[32]利用 28S rDNA 的种特异性 PCR 方法，成功构建了新菠萝灰粉蚧的快速鉴定技术。

本研究通过对木瓜秀粉蚧、柑橘堆蜡粉蚧、扶桑绵粉蚧、石蒜绵粉蚧、美地绵粉蚧、甘蔗灰粉蚧、康氏粉蚧、橘小粉蚧、*Pseudococcus odermatti*、大洋臀纹粉蚧、南洋臀纹粉蚧 11 种粉蚧的 28S rDNA 基因片段序列进行测定，依据所得序列及 NCBI 数据库中

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

与木瓜秀粉蚧亲缘关系较近的*Paracoccus galzerae*进行比对分析，设计出一对木瓜秀粉蚧种特异引物28S-parF/marR。特异性PCR检测结果表明，该种特异性引物不仅能特异性识别木瓜秀粉蚧，而且对不同寄主来源、不同地区来源以及不同虫态的木瓜秀粉蚧也具有良好的特异性识别效果。该种特异性引物的灵敏度良好，能响应质量浓度大于1.06×10^{-1} ng·μL^{-1}的DNA模板。依据种特异性PCR方法建立的木瓜秀粉蚧快速分子检测技术，仅需进行DNA提取、PCR扩增和电泳检测即可得到准确可靠的结果。免去了序列测定及比对的过程，而且不受虫样完整性和虫龄等因素的制约，能达到快速检测鉴定木瓜秀粉蚧的效果。在此基础上，结合基础的外观形态鉴定可以进一步保证鉴定的准确性，极大降低了对鉴定人员知识技能水平的要求，能应用于农业生产和检验检疫机构对木瓜秀粉蚧的快速鉴别和监测监控，对木瓜秀粉蚧的入侵危害具有一定的遏制作用，对保障我国的番木瓜产业安全和防治木瓜秀粉蚧具有重要的意义。然而鉴于国内尚未报道发现其他秀粉蚧属的粉蚧，因此本研究可以为木瓜秀粉蚧近缘种的分子鉴定提供参考依据。

致谢：木瓜秀粉蚧由北京林业大学武三安教授制片鉴定，谨此谢忱！

参考文献 References：

[1] 张江涛，武三安 . 中国大陆一新入侵种—木瓜秀粉蚧[J]. 环境昆虫学报，2015，37(2): 441-446.
ZHANG Jiangtao，WU Sanan. A new invasive mealybug，*Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae)，in mainland China[J]. Journal of Environmental Entomology，2015，37(2): 441-446.

[2] MILLER D R，WILLIAMS D J，HAMON A B. Notes on a new mealybug (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) pest in Florida and the Caribbean: the papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink[J]. Insecta Mundi，1999，13(3-4): 179-181.

[3] WILLIAMS D J，GRANARA DE WILLINK D C. Mealybugs of Central and South America[M]. Wallingford，UK: CAB International，1992: 635.

[4] AMARASEKARE K G，CHONG J H，EPSKY N D，MANNION C M. Effect of temperature on the life history of the mealybug *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) [J]. Journal of Economic Entomology，2008，101(6): 1798-1804.

[5] WAKER A，HOY M，MEYERDIRK D. Papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink (Insecta: Hemiptera: Pseudococcidae) [M]. EENY- 302. Featured Creatures. Entomology and Nematology Department，Florida Cooperative Extension Service，Institute of Food and Agricultural Sciences，University of Florida，Gainesville，FL.2003.

[6] SENI A，CHONGTHAM S. Papaya mealybug *Paracoccus marginatus* Williams & Granara de Willink (Hemiptera: Pseudococcidae)，a current threat to agriculture - a review[J]. Agricultural Reviews，2013，34 (3): 216-222.

[7] MUNIAPPAN R，SHEPARD B M，WATSON G W，CARNER G R，SARTIAMI D，RAUF A，HAMMING M D. First report of the papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae)，in Indonesia and India[J]. Journal of Agricultural & Urban Entomology，2014，25(1): 37-40.

[8] GALANIHE L D，JAYASUNDERA M U P，VITHANA A，ASSELAARACHCHI N，WATSON G W. Occurrence，distribution and control of papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae)，an invasive alien pest in Sri Lanka[J]. Tropical Agricultural Research & Extension，2011，13(3): 81-86.

[9] SAENGYOT S，BURIKAM I. Host plants and natural enemies of papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand[J]. Thai Journal of Agricultural Science，2011，44(3):197-205.

[10] CHEN S P，WONG J Y，WU W J. Preliminary report on the occurrence of papaya mealybug，*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink，in Taiwan[J]. Journal of Taiwan Agricultural Research，2011，60(1):72-76.

[11] WU F Z，LIU Z H，SHEN H，YU F，MA J，HU X N，ZENG L. Morphological and molecular identification of *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Yunnan，China[J]. Florida Entomologist，2014，97(4):1469-1473.

[12] 顾渝娟，刘海军，梁帆，马骏，李海林 . 一种重要的有害生物—木瓜粉蚧[J]. 植物检疫，2015，29(2): 57-60.
GU Yujuan，LIU Haijun，LIANG Fan，MA Jun，LI Hailin. An important pest: papaya mealybug (*Paracoccus marginatus*) [J]. Plant Quarantine，2015，29(2): 57-60.

[13] 卢辉，卢芙萍，梁晓，伍春玲，陈青 . 木瓜秀粉蚧在海南的适生性及空间分布型研究[J]. 热带作物学报，2016，37(10): 1962-1968.
LU Hui，LU Fuping，LIANG Xiao，WU Chunling，CHEN Qing. The potential geographic distribution and spatial pattern of *Paracoccus marginatus* in Hainan province[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，2016，37(10): 1962-1968.

[14] 何衍彪，万宣伍，詹儒林，孙光明，刘映红，许再福，赵艳龙 . 基于DNA序列的12种粉蚧亲缘关系分析[J]. 热带作物学报，2011，32(12): 2324-2330.
HE Yanbiao，WUAN Xuanwu，ZHAN Rulin，SUN Guangming，LIU Yinghong，XU Zaifu，ZHAO Yanlong. Genetic relationship of 12 species of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on DNA sequences[J]. Chinese Journal of Tropical Crops，2011，32(12): 2324-2330.

[15] GULLAN P J，KAYDAN M B，HARDY N B. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae)[J]. Systematic Entomology，

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2010，35(2): 329-339.

[16] 王芙蓉，吴薇，荣德福 . 分子生物学技术在检疫性昆虫鉴定中的应用前景[J]. 安徽农业科学，2008，36(8): 3149-3151，3162.
WANG Furong，WU Wei，RONG Defu. Application prospect of molecular biological techniques in identification of quarantine insect[J]. Journal of Anhui Agriculture Science，2008，36(8): 3149-3151，3162.

[17] 王玉生 . 我国常见粉蚧类害虫双基因条形码鉴定技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院，2016.
WANG Yusheng. Identification of common mealybug species based on double genes barcoding techniques in China[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences，2016.

[18] SACCAGGI D L，KRÜGER K，PIETERSEN G. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of the mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae)[J]. Bulletin of Entomological Research，2008，98(1): 27-33.

[19] 徐浪，余道坚，焦懿，向才玉，陈志裔，胡远发，王红英 . 新菠萝灰粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定[J]. 植物检疫，2013，27(3): 66-69.
XU Lang，YU Daojian，JIAO Yi，XIANG Caiyu，CHEN Zhilin，HU Yuanfa，WANG Hongying. Molecular identification of *Dysmicoccus neobrevipes* and related species through DNA barcoding[J]. Plant Quarantine，2013，27(3): 66-69.

[20] 任竞妹 . 粉蚧科昆虫 DNA 条形码鉴定技术及数据库的建立[D]. 广州: 华南农业大学，2016.
REN Jingmei. DNA barcoding and database construction of Pseudococcidae[D]. Guangzhou: South China Agricultural University，2016.

[21] PACHECO DA SILVA V C，BERTIN A，BLIN A，GERMAIN J F，BERNARDI D，RIGNOL G，BOTTON M，MALAUSA T. Molecular and morphological identification of mealybug species (hemiptera: pseudococcidae) in brazilian vineyards[J]. PLoS ONE，2014，9(7)，e103267.

[22] 陳敏敏 . 木瓜秀粉介殼蟲於四種寄主植物上之生命表[D]. 台湾: 臺灣大學昆蟲學研究所，2014.
CHEN Minmin. Life table of *Paracoccus marginatus* on four host plant species in Taiwan[D]. Taiwan: Institute of Entomology，National Taiwan University，2014.

[23] 刘志红，沈阳，高亿波，沈鸿，黄娇芬，伍和平，吴福中 . 外来危险性入侵害虫木瓜秀粉蚧的危害与防控[J]. 安徽农业科学，2015，43(31): 91-93.
LIU Zhihong，SHEN Yang，GAO Yibo，SHEN Hong，HUANG Jiaofen，WU Heping，WU Fuzhong. Damage and control of an alien pest *Paracoccus marginatus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences，2015，43(31): 91-93 .

[24] 万方浩 . 重要农林外来入侵物种的生物学与控制[M]. 北京: 科学出版社，2005.
WAN Fanghao. Biology and management of invasive alien species in agriculture and forestry[M]. Beijing: Science Press，2005.

[25] MANI M，SHIVARJU C，SHYLESHA A N. *Paracoccus marginatus*，an invasive mealybug of papaya and its biological Control - an overview[J]. Journal of Biological Control，2012，26(3): 201-216.

[26] 顾渝娟，齐国君 . 警惕一种新的外来入侵生物——木瓜粉蚧 *Paracoccus marginatus*[J]. 生物安全学报，2015，24(1): 39-44.
GU Yujuan，QI Guojun. Precaution of a new invasive pest，papaya mealybug *Paracoccus marginatus*[J]. Journal of Biosafety，2015，24(1): 39-44.

[27] 陈洁君，王晶 . 我国外来入侵生物防控科技进展[J]. 生物安全学报，2018，27(1): 6-19.
CHEN Jiejun，WANG Jing. Progress in prevention and control of invasive species in China[J]. Journal of Biosafety，2018，27 (1): 6-19.

[28] 徐浪，余道坚，焦懿，王银竹，陈志裔 . 大洋臀纹粉蚧和南洋臀纹粉蚧 Taq Man 实时荧光 PCR 检测方法[J]. 植物检疫，2010，24(2): 24-28.
XU Lang，YU Daojian，JIAO Yi，WANG Yinzhu，CHEN Zhilin. TaqMan real-time qualitative PCR for the inspection and identification of *Planococcus minor* and *P.lilacius* (Homoptera: Pseudococcidae)[J]. Plant Quarantine，2010，24(2): 24-28.

[29] 田虎，李小凤，万方浩，张桂芬，张金良 . 利用种的特异性 COI 引物(SS-COI)鉴别扶桑绵粉蚧[J]. 昆虫学报，2013，56(6): 689-696.
TIAN Hu，LI Xiaofeng，WAN Fanghao，ZHANG Guifen，ZHANG Jinliang. Identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) with species-specific COI (SS-COI) primers[J]. Acta Entomologica Sinica，2013，56(6): 689-696.

[30] 王玉生，周培，田虎，万方浩，张桂芬 . DNA 条形码技术对重大潜在入侵害虫大洋臀纹粉蚧的鉴定有效性研究[J]. 昆虫学报，2016，59(7): 747-758.
WANG Yusheng，ZHOU Pei，TIAN Hu，WAN Fanghao，ZHANG Guifen. Validity of DNA barcoding in identification of *Planococcus minor* (Maskell) (Hemiptera: Pseudococcidae)，a potential major invasive alien species to China[J]. Acta Entomologica Sinica，2016，59(7): 747-758.

[31] 黄蓬英，林凌鸿，方志鹏，林玲玲，廖富荣 . 利用 28S rDNA 种特异引物鉴定新菠萝灰粉蚧[J]. 应用昆虫学报，2017，54(4): 646-651.
HUANG Pengying，LIN Linghong，FANG Zhipeng，LIN Lingling，LIAO Furong. Identification of *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley (Hemiptera: Pseudococcus) using 28S rDNA species-specific primers[J]. Chinese Journal of Applied Entomology，2017，54(4): 646-651.

[32] 马光昌，王晓妮，牛黎明，龚治，温海波，金启安，彭正强 . 快速鉴定新菠萝灰粉蚧的分子标记技术[J]. 环境昆虫学报，2017，39(4): 893-897.
MA Guangchang，WANG Xiaoni，NIU Liming，GONG Zhi，WEN Haibo，JIN Qi'an，PENG Zhengqiang. Molecular marker technique for rapid identification of *Dysmicoccus neobrevipes* (Beardsley)[J]. Journal of Environmental Entomology，2017，39 (4): 893-897.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net