不同 COⅠ基因序列区域在粉蚧科物种识别和系统发育研究中的应用比较*

李 焱[1**] 王戌勃[2] 武三安[1***]

（1. 北京林业大学林学院，北京 100083；2. 西南林业大学生物多样性保护学院，昆明 650224）

摘 要 **【目的】** 粉蚧是一类以吸食植物汁液为生的半翅目昆虫，大多为农林生产的害虫。COⅠ基因是粉蚧分子系统学研究中较为常用的基因，根据不同的引物常分为 2 个区域：HCO-LCO region 和 region 2。为了促进粉蚧科的分类研究工作，探究这 2 个区域哪个在粉蚧物种分类中具有更高的准确性。**【方法】** 本研究从 GenBank 数据库中下载了粉蚧科中同时具有 HCO-LCO region 和 region 2 区域序列信息的共 48 种粉蚧的数据，计算遗传距离条形码间隙和鉴定准确率，并采用 ML 法分别构建系统发育树。**【结果】** HCO-LCO region 的准确鉴定率高于 region 2；基于 HCO-LCO region 的粉蚧科遗传距离均随分类阶元的上升而增加，而 region 2 则出现了种间最大遗传距离大于属间最大遗传距离的现象；基于 HCO-LCO region 构建的系统发育树也更符合粉蚧的形态研究结果。**【结论】** HCO-LCO region 在物种识别鉴定方面优于 region 2，能够更好的体现粉蚧科昆虫的系统发育关系，更适于粉蚧科的分类研究。

关键词 COⅠ；HCO-LCO region；region 2；粉蚧科

Phylogeny of the Pseudococcidae based on COⅠ gene sequence variation

LI Yan[1**] WANG Xu-Bo[2] WU San-An[1***]

(1. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract **[Objectives]** To identify COⅠ sequence regions useful for resolving the taxonomy of the Pseudococcidae (mealybugs) and thereby improve understanding of the phylogenetic relationships within this family. Mealybugs are Hemipteran insects that feed on plant sap, and most are agricultural and forestry pests. The COⅠ gene is commonly used in molecular phylogeny and is often divided into two regions according to different primers; the HCO-LCO region and region 2. **[Methods]** Sequence information on both the HCO-LCO region and region 2 from 48 Mealybugs was downloaded from the GenBank database. The genetic distance, barcode gap and BCM were calculated and a phylogenetic tree constructed using the ML method. **[Results]** The rate of accurate species identification using the HCO-LCO region was higher than that using region 2. Genetic distances estimated based on HCO-LCO region variation increased with taxonomic level but those based on region 2 ranked the maximum genetic distance between species as greater than that between genera. A phylogenetic tree based on HCO-LCO region variation was more consistent with the morphological classification than one based on region 2. **[Conclusion]** The HCO-LCO region was more useful than region 2 for species identification, and better reflects the developmental and evolutionary relationships among the Pseudococcidae than region 2.

Key words COⅠ; HCO-LCO region; region 2; Pseudococcidae

---

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31772488）

**第一作者 First author，E-mail：794476090@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：sananwu@bjfu.edu.cn

收稿日期 Received：2019-09-26；接受日期 Accepted：2020-03-28

粉蚧科 Pseudococcidae 昆虫是一类以吸食植物汁液为生的小型昆虫，因雌虫体覆盖有蜡粉而得名，是半翅目 Hemiptera 蚧次目 Coccomorpha 中的第二大科，世界已知 2 000 余种，许多种类是世界性的农林业害虫，如扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*、大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor* 等（王戍勃，2017）。由于粉蚧体型微小，形态多样，传统形态鉴定对于虫龄和玻片标本制作技术要求也过高，因此需要一种新型和快速的鉴定方法加以辅助。

线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅰ基因（CO Ⅰ）是线粒体 DNA 上的一段蛋白质编码基因，该基因序列中没有内含子，插入和缺失的现象也很少见，且不会像核 DNA 那样发生基因的重组，同时具有相对的种内保守性和足够的种间变异性（田虎，2013），被广泛应用于物种的识别鉴定和系统发育的研究当中（Hebert *et al.*，2004；Smith *et al.*，2005；Ward *et al.*，2005；Kharlamenko *et al.*，2019）。然而，并不是所有的 CO Ⅰ基因都是容易获取的，CO Ⅰ在蚧次目中的扩增率就不太理想（Kondo *et al.*，2008）。

根据所用引物的不同，扩增获得的 CO Ⅰ片段长度和区域也有所不同，可分为 HCO-LCO region 和 region 2 两个区域（Malausa *et al.*，2011）。HCO-LCO region 和 region 2 为略有重叠的 CO Ⅰ两个区域。HCO-LCO region 位于 CO Ⅰ基因序列从 5′端到 3′端的前半部分，全长 710 bp 左右，由 Folmer 等（1994）为无脊椎动物设计的 CO Ⅰ序列的通用引物 LCO-1490&HCO-2198 的名字进行命名（图 1）。此区域为国际条形码应用较多的区域，多种引物被设计用以此区域的扩增，在粉蚧中较为常用的有：LCO-1490&HCO-2198、PCO-F1 &Lep-R1、C1-1554F&C1-2342R、MLCOn-F&MLCOn-R 等。因所用引物和 PCR 反应体系不同，扩增所得的序列长度也有所不同，大致在 400-710 bp 之间（表 1）。

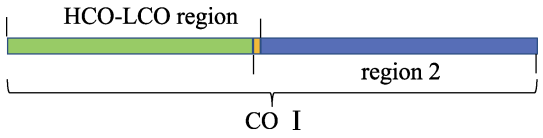


图 1　CO Ⅰ的不同区域划分

Fig. 1　Division of different CO Ⅰ regions

region 2 位于 CO Ⅰ基因序列从 5′端到 3′端自 690 bp 以后的位置，全长 800 bp 左右（图 1）。扩增此区域的引物多参考 Simon 等（1994）的文章，所用引物为 C1J2195&TL2N3014 和 C1-J-2183(aka Jerry)&C1-N-2568(aka Ben)。前者扩增所得序列长度多在 800 bp 左右，后者多在 380 bp 左右（表 2）。

表 1　HCO-LCO region 常用引物

Table 1　Common primers of HCO-LCO region

序号 No.	引物名称 Name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	扩增长度 Length	引物序列来源 Reference of primers
1	LCO-1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	710 bp	Folmer *et al.*，1994
	HCO-2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
2	Pco-F1	CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG	649 bp	Park *et al.*，2010
	Lep-R1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA		
3	C1-1554F	CAGGAATAATAGGAACATCAATAAG	788 bp	Deng *et al.*，2012
	C1-2342R	ATCAATGTCTAATCCGATAGTAAATA		
4	MLCOn-F	AYAATATAATRATTACWWTWCATGC	760 bp	Abd-Rabou *et al.*，2012
	MLCOn-R	TTTWCCATTTAAWGTTATTATTC		
5	Forward	CTGATTTCCTTTATTAATTAATTCAAC	400 bp	Daane *et al.*，2011
	Reverse	CAATGCATATTATTCTGCCATATTA		
6	LCO-M-2d-F	ATAACTATACCTATYATTATTGGAAG	419 bp	Malausa *et al.*，2011
	LCO-M-2d-R	AATAAATGTTGATATAAAATTGG		
7	CO Ⅰ-FI	TTTACCAGGATTTGGAGCTA	577 bp	徐浪等，2009
	CO Ⅰ-RI	AACGACGAGGTATTCCATTTATTCC		

表 2 region 2 常用引物
Table 2 Common primers of region 2

序号 No.	引物名称 Name	引物序列（5′-3′）Primer sequence（5′-3′）	扩增长度 Length	参考文献 Reference of primers
1	C1J2195	TTGATTYTTTGGTCATCCAGAAGT	800 bp	Simon *et al.*，1994
	TL2N3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA		
2	MFCO1	ATATCTCAAATTATAAATCAAGAA	379 bp	Wetten *et al.*，2016
	MRCO1	ATTACACCTATAGATAAAACATAATG		
3	C1-J-2183	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	385 bp	Gullan *et al.*，2003
	C1-N-2568	GCWACWACRTAATAKGTATCATG		

截止目前，在 GenBank 上能搜索到粉蚧 CO Ⅰ序列 2 200 余条，其中覆盖 HCO-LCO region 的 1 500 余条，覆盖 region 2 的 740 余条。虽然不同学者已获取粉蚧 CO Ⅰ基因 2 个区域的大量序列，但这 2 个区域在粉蚧鉴定上的准确性却不得而知，这严重阻碍了其在粉蚧系统学研究上的应用。因此本研究将从 GenBank 下载已有的粉蚧 CO Ⅰ序列，整理区分片段后分别计算遗传距离，并通过距离法（Best close match，BCM）、进化树法（最大似然法，ML）比较这 2 个区域在粉蚧识别和系统发育中的效果。

1 材料与方法

1.1 研究材料

在 NCBI 上，以 Pseudococcidae 和 CO Ⅰ为关键词搜索核苷酸序列，下载后用 Mafft 软件进行比对区分 HCO-LCO region 和 region 2，再在 Bioedit 里手动比对序列，删除总长<300 bp 的序列和重复序列，当序列一致长度不一致时，仅保留序列最长的那条，最终将单倍型作为分析数据集。本研究通过 GenBank 获得粉蚧科 1 554 条 HCO-LCO region 片段序列，743 条 region 2 片段序列，同时拥有 2 个片段的粉蚧共 18 属 48 种代表着粉蚧现有 2 个亚科的分类系统（Hardy *et al.*，2008），其中 HCO-LCO region 片段有 262 个单倍型，region 2 片段有 285 个单倍型（附录）。

1.2 研究方法

利用 MEGA-X 计算种间和种内的 K2P（Kimura 2-parameter）遗传距离，条形码间隙（Barcoding gap）图调用 BarcodingR 包进行分析和绘制（Zhang *et al.*，2016）。

距离法：使用 Meier 等（2006）的 best close match（BCM）的标准来评估 CO Ⅰ数据集鉴定的成功率。BCM 依靠一个序列相似度的阈值进行分析。先从一个数据集中获取种内遗传距离的频率分布，然后计算出一个阈值，在这个阈值之下，能包含 95%的种内遗传距离。BCM 的操作流程如下：先鉴定出与问询序列 query 最匹配的条形码 best match，然后比较问询序列和最匹配条形码的距离，当这个值低于先前得出的阈值，就将最匹配条形码的种名赋给问询序列，即准确鉴定。如果问询序列与所有最近条形码的距离都高于阈值的话，则认为是无法鉴定。由于 BCM 分析需要每个物种至少有 2 条序列（问询序列和最匹配条形码），所以单序列 singleton 不参与该分析。使用 SpeciesIdentifier1.7 软件计算种内遗传距离并且评估 BCM 鉴定成功率（Meier *et al.*，2006）。

最大似然树（ML）的构建：使用 raxmlGUI（Silvestro and Michalak，2012）程序里的 RAxML（Stamatakis *et al.*，2008）方法进行最大似然分析，选取 GTRGAMMA 替代模型，通过 100 次重复检验（bootstrap=100）评估节点支持率，吹绵蚧 *Icerya purchasi* 作为外群。

2 结果与分析

2.1 CO Ⅰ两个区域的序列信息和碱基组成

HCO-LCO region 序列区域片段大小为 644 bp，密码子的碱基使用频率存在较高的偏向性。碱基

A、T、C、G 的平均占比为 36.2%、48.2%、10.0%、5.6%，其中 A+T 占比高达 84.4%，C+G 占比则只为 15.6%。

region 2 序列区域片段大小为 767 bp，密码子的碱基使用频率同样存在较高的偏向性。碱基 A、T、C、G 的平均占比为 35.5%、45.3%、9.8%、9.4%，其中 A+T 占比为 80.8%，C+G 占比为 19.2%。

2.2　条形码间隙（Barcode gap）和鉴定准确率（BCM）

如图 2 所示，HCO-LCO region 和 region 2 都没有明显的条形码间隙，但 region 2 的种内和种间遗传距离的重叠度明显高于 HCO-LCO 的，且存在大量种内遗传距离高于种间遗传距离的现象。HCO-LCO region 和 region 2 用于 BCM 计算的序列分别为 248 条和 260 条，HCO-LCO region 的准确鉴定率为 97.98%，高于 region 2 的 83.59%，HCO-LCO region 的模糊鉴定率和错误鉴定率分别是 0 和 0.8%，低于 region 2 的 9.37% 和 4.29%（表 3）。

2.3　粉蚧科昆虫 CO Ⅰ两个区域遗传距离比较

利用 MEGA-X 计算 CO Ⅰ两区域种间和属间的 K2P（Kimura 2-parameter）遗传距离（表 4）。由表 4 可知，基于 HCO-LCO region 的粉蚧科种间遗传距离在 0.2%-16.11%之间，属间遗传距离为 5.93%-18.69%；在 region 2 数据集中，粉蚧科的种间遗传距离则在 0-20.56%之间，属间遗传距离 7.45%-18.46%。整体来看，基于 HCO-LCO region 的种间和属间遗传距离虽略低于 region 2，但是基于 HCO-LCO region 的粉蚧科遗传距离均随分类阶元的上升而增加，体现出物种界限上遗传分化具有明显变异的现象，而 region 2 则出现了种间最大遗传距离大于属间最大遗传距离的现象。

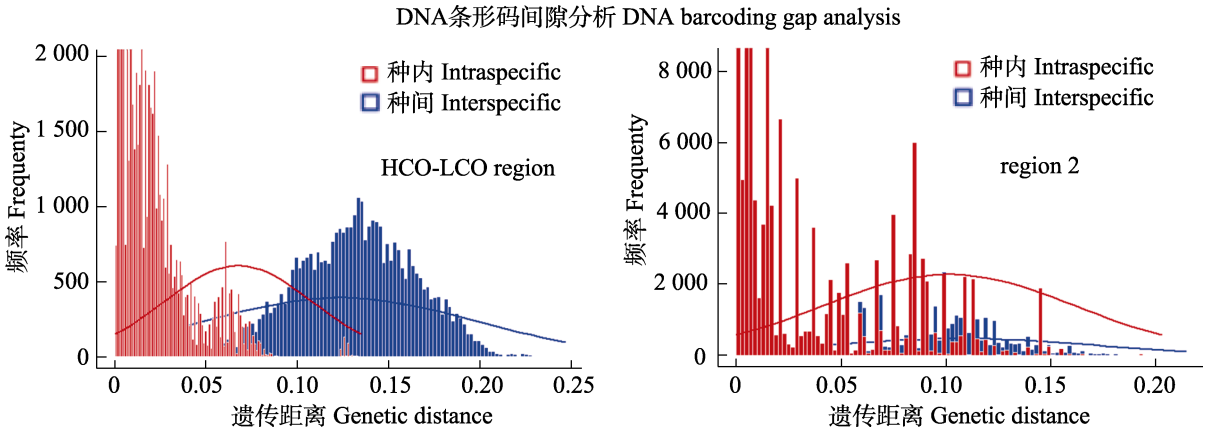


图 2　粉蚧科昆虫 CO Ⅰ基因 2 个区域（HCO-LCO region、region 2）的 DNA 条形码间隙图

Fig. 2　DNA barcode gap in two regions (HCO-LCO region, region 2) of Pseudococcidae

表 3　CO Ⅰ不同区域基于 BCM（best close match）的鉴定结果

Table 3　Identification results of different CO Ⅰ regions based on BCM

鉴定结果 Results	HCO-LCO region (%)	Region 2 (%)
准确鉴定 Accurate identification	97.98 (243/248)	83.59 (214/256)
模糊鉴定 Fuzzy identification	0	9.37 (24/256)
错误鉴定 Error identification	0.8 (2/248)	4.29 (11/256)
阈值内无匹配的序列 No matched sequences within threshold	1.2 (3/248)	2.73 (7/256)

表 4 HCO-LCO region 和 region 2 不同区域的遗传距离（%）
Table 4 Genetic distance between HCO-LCO region and region 2 regions

阶元 Order element	HCO-LCO region			Region 2		
	最小值 Minimum	平均值 Mean	最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Mean	最大值 Maximum
种间 Species	0.20	8.91	16.11	0.00	12.50	20.56
属间 Genera	5.93	13.31	18.69	7.45	12.36	18.64

2.4 粉蚧科昆虫 COⅠ两个区域系统发育比较

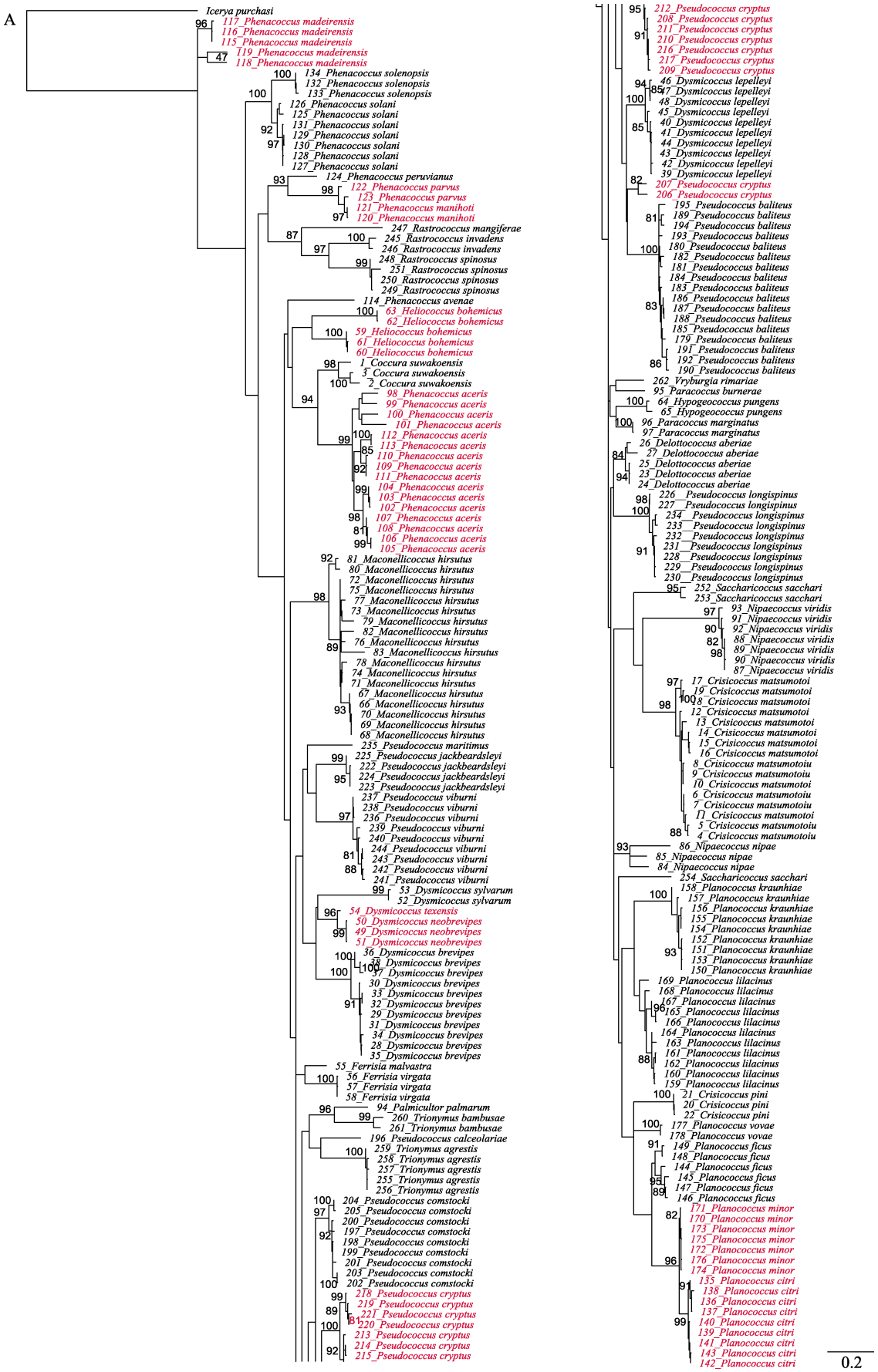
由图 3 可知，在 HCO-LCO 的 ML 树中，美地绵粉蚧 *Ph. madeirensis*、橘小粉蚧 *Pseudococcus cryptus* 并没有形成单系群，而旧北星粉蚧 *Heliococcus bohemicus* 的所有个体形成单系群，但其 2 个互为姐妹群的分支表现出明显的遗传分化（遗传距离为 12.6%）。在 region 2 的 ML 树中，不为单系的物种更多，包括：马缨丹绵粉蚧 *Ph. parvus*、扶桑绵粉蚧 *Ph. solenopsis*、石蒜绵粉蚧 *Ph. solani*、柑橘臀纹粉蚧 *Pl. citri*、无花果臀纹粉蚧 *Pl. ficus*、大洋臀纹粉蚧 *Pl. minor*、菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus brevipes*、李比利氏灰粉蚧 *Dysmicoccus lepelleyi*、双条拂粉蚧 *Ferrisia virgata*。综合来看，在 HCO-LCO 的 ML 树中除粉蚧属 *Pseudococcus* 和灰粉蚧属 *Dysmicoccus* 外的绝大多数同属粉蚧能够较好地聚合在一起；而在 region 2 的 ML 树中，粉蚧属和灰粉蚧属仍未能进行有效地聚合且分支更为混乱，其他属粉蚧的分支情况也未能优于其在 HCO-LCO 的 ML 树中的分支（图 3）。

3 讨论

针对蚧次目昆虫 COⅠ基因扩增率不理想的问题，各种不同的引物被设计并使用（Folmer *et al.*, 1994; Gullan *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2012），这也导致了同一物种不同 COⅠ（HCO-LCO region、region 2）区域片段的出现。Malausa 等（2011）在探讨适合粉蚧科研究的基因序列时，率先较为明确的就这两个区域分别进行了系统发育的研究。之后，除 Beltrà 等（2012）及 Lin 等（2017）少数学者外，其他学者在对蚧总科的研究中，仍未能将 HCO-LCO region 和 region 2 明确的加以区分。而且，Malausa 等（2011）所用 HCO-LCO region 和 region 2 两个区域的序列信息来自不同种的粉蚧，并非严格的对照试验。本研究针对这一现象，以粉蚧科为例，使用具有严格的一一对应关系的 18 属 48 个粉蚧种的 HCO-LCO region、region 2 两个区域的序列信息进行系统发育和遗传距离的探讨，其结果具有更高的科学性和参考价值。

本研究中，HCO-LCO region 和 region 2 都没有明显的 DNA 条形码间隙（Barcode gap），因为一些近缘种的遗传距离非常小，如柑橘臀纹粉蚧和大洋臀纹粉蚧存在 2%的遗传分化，而一些广布种的不同种群又存在明显的遗传分化，如橘小粉蚧（0-5%）、旧北星粉蚧（>10%的遗传分化）等（图 3）。Jiang 等（2014）通过对实蝇的研究发现，复合种的存在会降低 DNA 条形码的鉴定成功率。粉蚧中，存在很多复合种，如双条拂粉蚧种团（Gullan *et al.*， 2010）、槭树绵粉蚧 *Phenacoccus aceris* 种团（Wang and Wu，2017）。这些粉蚧复合种的存在在一定程度上影响着 DNA 条形码的鉴定。此外，在分析 region 2 数据时发现，仅有 1-2 个碱基差异的序列会存在 2 个不同属的名字（如柑橘臀纹粉蚧和菠萝灰粉蚧，种间遗传距离<0.5%），且均由知名的蚧虫分类学家鉴定，是否 region 2 自身在鉴定物种时缺乏足够的变异需要进一步的研究，但这种现象在一定程度上解释了 region 2 的鉴定的错误率比 HCO-LCO 的高 10%左右这一现象。

本研究表明，HCO-LCO region 和 region 2 两个区域的序列信息均能实现粉蚧科物种的分类。相较而言，HCO-LCO region 能够更好的体现粉蚧科昆虫的发育进化关系，整体的遗传距离也略高于 region 2，在物种分类中具有更高的准


A
Icerya purchasi
117_Phenacoccus madeirensis
116_Phenacoccus madeirensis
115_Phenacoccus madeirensis
119_Phenacoccus madeirensis
118_Phenacoccus madeirensis
134_Phenacoccus solenopsis
132_Phenacoccus solenopsis
133_Phenacoccus solenopsis
126_Phenacoccus solani
125_Phenacoccus solani
131_Phenacoccus solani
129_Phenacoccus solani
130_Phenacoccus solani
128_Phenacoccus solani
127_Phenacoccus solani
124_Phenacoccus peruvianus
122_Phenacoccus parvus
123_Phenacoccus parvus
121_Phenacoccus manihoti
120_Phenacoccus manihoti
247_Rastrococcus mangiferae
245_Rastrococcus invadens
246_Rastrococcus invadens
248_Rastrococcus spinosus
251_Rastrococcus spinosus
250_Rastrococcus spinosus
249_Rastrococcus spinosus
114_Phenacoccus avenae
63_Heliococcus bohemicus
62_Heliococcus bohemicus
59_Heliococcus bohemicus
61_Heliococcus bohemicus
60_Heliococcus bohemicus
1_Coccura suwakoensis
3_Coccura suwakoensis
2_Coccura suwakoensis
98_Phenacoccus aceris
99_Phenacoccus aceris
100_Phenacoccus aceris
101_Phenacoccus aceris
112_Phenacoccus aceris
113_Phenacoccus aceris
110_Phenacoccus aceris
109_Phenacoccus aceris
111_Phenacoccus aceris
104_Phenacoccus aceris
103_Phenacoccus aceris
102_Phenacoccus aceris
107_Phenacoccus aceris
108_Phenacoccus aceris
106_Phenacoccus aceris
105_Phenacoccus aceris
81_Maconellicoccus hirsutus
80_Maconellicoccus hirsutus
72_Maconellicoccus hirsutus
75_Maconellicoccus hirsutus
77_Maconellicoccus hirsutus
73_Maconellicoccus hirsutus
79_Maconellicoccus hirsutus
82_Maconellicoccus hirsutus
76_Maconellicoccus hirsutus
83_Maconellicoccus hirsutus
78_Maconellicoccus hirsutus
74_Maconellicoccus hirsutus
71_Maconellicoccus hirsutus
67_Maconellicoccus hirsutus
66_Maconellicoccus hirsutus
70_Maconellicoccus hirsutus
69_Maconellicoccus hirsutus
68_Maconellicoccus hirsutus
235_Pseudococcus maritimus
225_Pseudococcus jackbeardsleyi
222_Pseudococcus jackbeardsleyi
224_Pseudococcus jackbeardsleyi
223_Pseudococcus jackbeardsleyi
237_Pseudococcus viburni
238_Pseudococcus viburni
236_Pseudococcus viburni
239_Pseudococcus viburni
240_Pseudococcus viburni
244_Pseudococcus viburni
243_Pseudococcus viburni
242_Pseudococcus viburni
241_Pseudococcus viburni
53_Dysmicoccus sylvarum
52_Dysmicoccus sylvarum
54_Dysmicoccus texensis
50_Dysmicoccus neobrevipes
49_Dysmicoccus neobrevipes
51_Dysmicoccus neobrevipes
36_Dysmicoccus brevipes
38_Dysmicoccus brevipes
37_Dysmicoccus brevipes
30_Dysmicoccus brevipes
33_Dysmicoccus brevipes
32_Dysmicoccus brevipes
29_Dysmicoccus brevipes
31_Dysmicoccus brevipes
34_Dysmicoccus brevipes
28_Dysmicoccus brevipes
35_Dysmicoccus brevipes
55_Ferrisia malvastra
56_Ferrisia virgata
57_Ferrisia virgata
58_Ferrisia virgata
94_Palmicultor palmarum
260_Trionymus bambusae
261_Trionymus bambusae
196_Pseudococcus calceolariae
259_Trionymus agrestis
258_Trionymus agrestis
257_Trionymus agrestis
255_Trionymus agrestis
256_Trionymus agrestis
204_Pseudococcus comstocki
205_Pseudococcus comstocki
200_Pseudococcus comstocki
197_Pseudococcus comstocki
198_Pseudococcus comstocki
199_Pseudococcus comstocki
201_Pseudococcus comstocki
203_Pseudococcus comstocki
202_Pseudococcus comstocki
218_Pseudococcus cryptus
219_Pseudococcus cryptus
221_Pseudococcus cryptus
220_Pseudococcus cryptus
213_Pseudococcus cryptus
214_Pseudococcus cryptus
215_Pseudococcus cryptus
212_Pseudococcus cryptus
208_Pseudococcus cryptus
211_Pseudococcus cryptus
210_Pseudococcus cryptus
216_Pseudococcus cryptus
217_Pseudococcus cryptus
209_Pseudococcus cryptus
46_Dysmicoccus lepelleyi
47_Dysmicoccus lepelleyi
48_Dysmicoccus lepelleyi
45_Dysmicoccus lepelleyi
40_Dysmicoccus lepelleyi
41_Dysmicoccus lepelleyi
44_Dysmicoccus lepelleyi
43_Dysmicoccus lepelleyi
42_Dysmicoccus lepelleyi
39_Dysmicoccus lepelleyi
207_Pseudococcus cryptus
206_Pseudococcus cryptus
195_Pseudococcus baliteus
189_Pseudococcus baliteus
194_Pseudococcus baliteus
193_Pseudococcus baliteus
180_Pseudococcus baliteus
182_Pseudococcus baliteus
181_Pseudococcus baliteus
184_Pseudococcus baliteus
183_Pseudococcus baliteus
186_Pseudococcus baliteus
187_Pseudococcus baliteus
188_Pseudococcus baliteus
185_Pseudococcus baliteus
179_Pseudococcus baliteus
191_Pseudococcus baliteus
192_Pseudococcus baliteus
190_Pseudococcus baliteus
262_Vryburgia rimariae
95_Paracoccus burnerae
64_Hypogeococcus pungens
65_Hypogeococcus pungens
96_Paracoccus marginatus
97_Paracoccus marginatus
26_Delottococcus aberiae
27_Delottococcus aberiae
25_Delottococcus aberiae
23_Delottococcus aberiae
24_Delottococcus aberiae
226_Pseudococcus longispinus
227_Pseudococcus longispinus
234_Pseudococcus longispinus
233_Pseudococcus longispinus
232_Pseudococcus longispinus
231_Pseudococcus longispinus
228_Pseudococcus longispinus
229_Pseudococcus longispinus
230_Pseudococcus longispinus
252_Saccharicoccus sacchari
253_Saccharicoccus sacchari
93_Nipaecoccus viridis
91_Nipaecoccus viridis
92_Nipaecoccus viridis
88_Nipaecoccus viridis
89_Nipaecoccus viridis
90_Nipaecoccus viridis
87_Nipaecoccus viridis
17_Crisicoccus matsumotoi
19_Crisicoccus matsumotoi
18_Crisicoccus matsumotoi
12_Crisicoccus matsumotoi
13_Crisicoccus matsumotoi
14_Crisicoccus matsumotoi
15_Crisicoccus matsumotoi
16_Crisicoccus matsumotoi
8_Crisicoccus matsumotoiu
9_Crisicoccus matsumotoiu
10_Crisicoccus matsumotoi
6_Crisicoccus matsumotoiu
7_Crisicoccus matsumotoiu
11_Crisicoccus matsumotoi
5_Crisicoccus matsumotoiu
4_Crisicoccus matsumotoiu
86_Nipaecoccus nipae
85_Nipaecoccus nipae
84_Nipaecoccus nipae
254_Saccharicoccus sacchari
158_Planococcus kraunhiae
157_Planococcus kraunhiae
156_Planococcus kraunhiae
155_Planococcus kraunhiae
154_Planococcus kraunhiae
152_Planococcus kraunhiae
151_Planococcus kraunhiae
153_Planococcus kraunhiae
150_Planococcus kraunhiae
169_Planococcus lilacinus
168_Planococcus lilacinus
167_Planococcus lilacinus
165_Planococcus lilacinus
166_Planococcus lilacinus
164_Planococcus lilacinus
163_Planococcus lilacinus
161_Planococcus lilacinus
162_Planococcus lilacinus
160_Planococcus lilacinus
159_Planococcus lilacinus
21_Crisicoccus pini
20_Crisicoccus pini
22_Crisicoccus pini
177_Planococcus vovae
178_Planococcus vovae
149_Planococcus ficus
148_Planococcus ficus
144_Planococcus ficus
145_Planococcus ficus
147_Planococcus ficus
146_Planococcus ficus
171_Planococcus minor
170_Planococcus minor
173_Planococcus minor
175_Planococcus minor
172_Planococcus minor
176_Planococcus minor
174_Planococcus minor
135_Planococcus citri
138_Planococcus citri
136_Planococcus citri
137_Planococcus citri
140_Planococcus citri
139_Planococcus citri
141_Planococcus citri
143_Planococcus citri
142_Planococcus citri
0.2

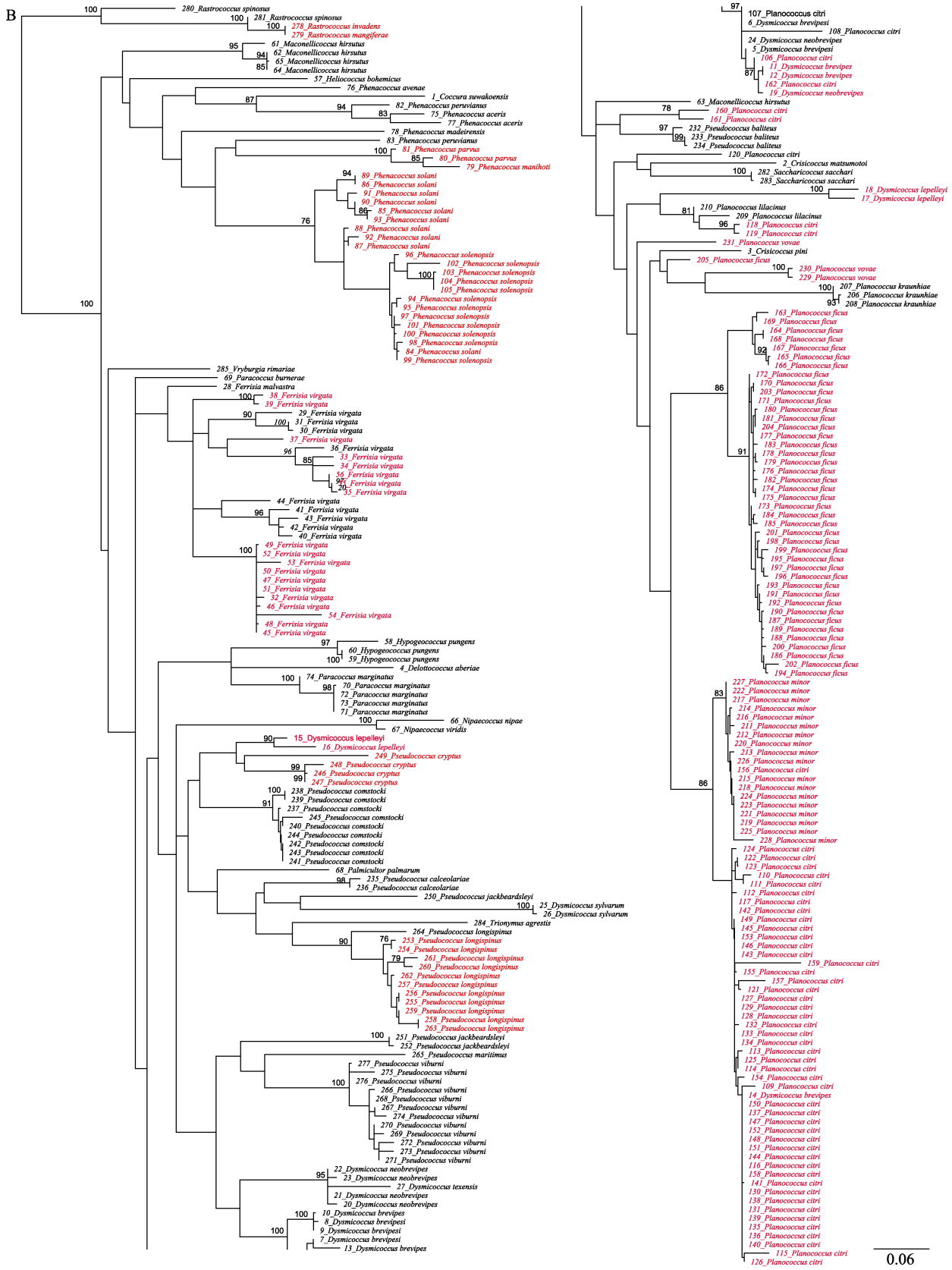


图 3　基于 CO Ⅰ基因 HCO-LCO region（A）和 region 2（B）构建的 ML 树

Fig.3　ML tree based on HCO-LCO region (A) and region 2 (B) of CO Ⅰ

确性；而基于 region 2 构建的系统发育树中各种群之间的进化关系不明确，遗传距离分析也不够稳定。综上所述，HCO-LCO region 更适用于物种的分类研究和系统发育分析。

本次研究中，粉蚧属和灰粉蚧属昆虫在 2 个系统发育树中均出现多个不同分支且两属之间关系较为混乱的现象，Downie 和 Gullan（2004）就曾注意到这种现象，Kaydan 等（2007）也曾提出过这个问题。因此，本研究认为这两个属并非单系，造成原因可能是传统形态分类多以雌成虫为依据，而粉蚧科雌成虫根据环境不同其形态特征会出现多型性或趋同性的现象。

参考文献 (References)

Abd-Rabou S, Shalaby H, Germain JF, Ris N, Kreiter P, Malausa T, 2012. Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding approach. *Bulletin of Entomological Research*, 102(5): 15–23.

Beltrà A, Soto1 A, Malausa T, 2012. Molecular and morphological characterisation of Pseudococcidae surveyed on crops and ornamental plants in Spain. *Bulletin of Entomological Research*, 102(2): 165–172.

Daane KM, Middleton R, Sforza ML, Cooper VM, Walton DB, Walsh T, 2011. Development of a multiplex PCR for identification of vineyards mealybugs. *Environ. Entomol.*, 40(6): 1595–1603.

Deng J, Yu F, Zhang TX, Hu HY, Zhu CD, Wu SA, Zhang YZ, 2012. DNA barcoding of six *Ceroplastes species* (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Molecular Ecology Resources*, 12(5): 791–796.

Dowine DA, Gullan PJ, 2004. Phylogenetic analysis of mealybugs (Heiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher classification. *Systematic Entomology*, 29(2): 238–259.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan in vertebrates. *Biotechnology and Biology Marine Molecular*, 3(5): 294–299.

Gullan PJ, Downie DA, Steffan SA, 2003. A new pest species of the mealybug genus *Ferrisia fullaway* (Hemiptera: Pseudococcidae) from the United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 96(6): 723–737.

Gullan PJ, Kaydan MB, Hardy NB, 2010. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic Entomology*, 35(2): 329–339.

Hardy NB, Gullan PJ, Hodgson CJ, 2008. A subfamily-level classification of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) based on integrated molecular and morphological data. *Systematic Entomology*, 33(1): 51–71.

Hebert PD, Penton EH, Burns JM, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41): 14812–14817.

Jiang F, Jin Q, Liang L, Zhang AB, Li ZH, 2014. Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: A case study in *Bactrocera* spp. *Molecular Ecology Resources*, 14(6): 1114–1128.

Kaydan B, Ulgenturk S, Erkilic L, 2007. Checklist of Turkish Coccoidea species (Hemiptera). *Journal of Agricultural Science*, 17(3): 89–106.

Kondo T, Gullan, PJ, Williams DJ, 2008. Coccidology. The study of scale insects (Hemiptera: Stemorrhyncha: Coccoidea). *Revista Corpoica-Cienciay Technologia Agropecuaria*, 9(2): 55–61.

Lin YP, Robert D, Edwards, Takumasa K, Thomas L. Semple, Lyn G, 2017. Species delimitation in asexual insects of economic importance: The case of black scale (*Parasaissetia nigra*), a cosmopolitan parthenogenetic pest scale insect. *Public Library of Science*, doi: 10.1371/journal.pone.0175889.

Malausa T, Fenis A, Warot S, Germain JF, Ris N, Prado E, Botton M, Vanlerberghe-Masutti F, Sforza R, Cruaud C, Couloux A, Kreiter P, 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*, 135(1): 142–155.

Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PK, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5): 715–728.

Park DS, Suh SJ, Oh HW, Hebert PD, 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 11(1): 423–423.

Silvestro D, Michalak I, 2012. RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(4): 335–337.

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 of America*, 87(6): 651–701.

Smith MA, Fisher BL, Hebert P, 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: The ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360(1462): 1825–1834.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J, 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57(5): 758–771.

Tian H, 2013. DNA barcoding for species identification of scale insects. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [田虎, 2013. 介壳虫类昆虫 DNA 条形码识别技术研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Kharlamenko V, Kiyashko S, Sharina S, Ivin V, Krylova E, 2019. An ecological study of two species of chemosymbiotrophic bivalve molluscs (Bivalvia: Vesicomyidae: Pliocardiinae) from the Deryugin Basin of the Sea of Okhotsk using analyses of the stable isotope ratios and fatty acid compositions. *Deep-Sea Research Part I*, doi: 10.1016/j.dsr.2019.06.004.

Wang XB, 2017. DNA barcoding of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and cophylogenetic study between mealybugs and *Anagyrus* parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae). Beijing: Beijing Forestry University. [王戍勃, 2017. 粉蚧科昆虫分子鉴定及与长索跳小蜂的协同系统发育研究. 博士学位论文. 北京：北京林业大学.]

Wang XB, Wu SA, 2017. A review of species recognition in the *Phenacoccus aceris* species-group (Hemiptera: Coccomorpha: Pseudococcidae) using molecular and morphological data. *Zootaxa*, doi: http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4319.3.4.

Ward RD, Zelak TS, Innes BH, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360(1462): 1847–1857.

Wetten A, Campbell C, Allainguillaume J, 2016. High-resolution melt and morphological analyses of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from cacao: Tools for the control of Cacao swollen shoot virus spread. *Pest Management Science*, 72(3): 527–533.

Xu L, Yu DJ, Jiao Y, Wang YZ, Chen ZL, 2010. TaqMan real-time qualitative PCR for the inspection and identification of *Planococcus minor* and *P. lilacius* (Homoptera: Pseudococcidae). *Plant Quarantine*, 24(2): 24–28 [徐浪, 余道坚, 焦懿, 王银竹, 陈志斐, 2010. 大洋臀纹粉蚧和南洋臀纹粉蚧 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法. 植物检疫, 24(2): 24–28.]

Zhang AB, Hao MD, Yang CQ, Shi ZY, 2016. Barcodingr: An integrated r package for species identification using dna barcodes. *Methods in Ecology and Evolution*, 142(5): 557–565.

附录 (Appendix)

粉蚧科昆虫 CO Ⅰ序列 GenBank 登录号

The ID of CO Ⅰ sequences in GenBank of Pseudococcidae

种名 Name	CO Ⅰ区域 CO Ⅰ region	GenBank 登录号 GenBank ID
日本盘粉蚧 *Coccura suwakoensis*	HCO-LCO region	KP692518、KP692517、KP692514
	region 2	AB439514
松原皑粉蚧 *Crisicoccus matsumotoi*	HCO-LCO region	KY373124、KY372801、KY373061、KY372850、KP692521、KP692520、KP692519、KY372952、KY372954、KY373024、KP692528、KP692526、KP692527、KY373123、KY373028、KY372752
	region 2	LC121498
松白粉蚧 *Crisicoccus pini*	HCO-LCO region	KY373164、KY372662、KY372720
	region 2	AB439515
Delottococcus aberiae	HCO-LCO region	KP771958、KP771957、KP771956、KP771950、KP771951
	region 2	JF714170
菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus brevipes*	HCO-LCO region	KY372817、KY373140、KY373161、KY372940、KY372934、KY373102、KY372848、KY372773、JN128962、LC121502、LC121501、
	region 2	LC121505、LC121504、LC121503、EU267214、LC121502、LC121500、GU134690、KY372475、MG869724、AF483204
李比利氏灰粉蚧 *Dysmicoccus lepelleyi*	HCO-LCO region	KY372813、KY373144、KY372614、KY373072、KY372729、KY372620、KU254167、KY372997、KX015112、KX015108
	region 2	GQ906764、GQ906758、KJ187493、KJ187492

续表（Table continued）

种名 Name	CO Ⅰ区域 CO Ⅰ region	GenBank 登录号 GenBank ID
新菠萝灰粉蚧 *Dysmicoccus neobrevipes*	HCO-LCO region	KY373134、KY372999、JN128959
	region 2	MG833844、EU267213、LC121499、KM378735、MF966992、GQ906757
Dysmicoccus sylvarum	HCO-LCO region	KY372769、KY372424
	region 2	KY372769、KY372424
Dysmicoccus texensis	HCO-LCO region	KY373086
	region 2	KY373086
热带拂粉蚧 *Ferrisia malvastra*	HCO-LCO region	KY372811
	region 2	AY179432
双条拂粉蚧 *Ferrisia virgata*	HCO-LCO region	KY373080、KY372741、LC278435
	region 2	JQ085554、AY179449、AY179444、AY179443、AY179434、AY179438、AY179442、AY179441、AY179448、AY179446、KJ530608、KJ530607、KM378740、GQ906765、GQ906763、KJ187521、KJ187520、KJ187518、MK090646、LC278435、KY656831、KY780497、KY818919、EU267205、EU267204
Heliococcus bohemicus	HCO-LCO region	KP692556、KP692551、KP692554、GU134710、GU134709
	region 2	HM156737
Hypogeococcus pungens	HCO-LCO region	MK086952、JF714204
	region 2	JF714168、EU267216、EU267215
木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus*	HCO-LCO region	KY373152、KY373158、KY373171、KY372837、KY372746、KY372566、KU296035、KY771070、KY771066、KY460552、KY771074、KY771075、KY771065、KY771069、KY373098、KY372938、KY771068、KY771072
	region 2	MG833842、JQ085556、GQ906759、AF483207、EU267199
鳞粉蚧 *Nipaecoccus nipae*	HCO-LCO region	MH290557、MH290547、MH290555
	region 2	MG833840
Nipaecoccus viridis	HCO-LCO region	MH290522、KY373129、KY373007、KY373074、KP692578、KP692577、KU296041
	region 2	MG791824
东亚椰粉蚧 *Palmicultor palmarum*	HCO-LCO region	KY372852
	region 2	EU267218
非洲奥粉蚧 *Paracoccus burnerae*	HCO-LCO region	KP771955
	region 2	FJ786962
木瓜粉蚧 *Paracoccus marginatus*	HCO-LCO region	KP692585、KY372995
	region 2	KF686748、KP745312、KJ187496、JF933768、MG833839
槭树绵粉蚧 *Phenacoccus aceris*	HCO-LCO region	KY373096、KY372587、KY372991、JQ085564、MF460783、KP692602、KP692601、MF460798、KP692603、MF460792、KY939786、KY939841、KY939867、KP692609、KY939791、KP692605

续表（Table continued）

种名 Name	CO Ⅰ区域 CO Ⅰ region	GenBank 登录号 GenBank ID
	region 2	JN546626
Phenacoccus avenae	HCO-LCO region	KY372649
	region 2	AB512120
Phenacoccus madeirensis	HCO-LCO region	MH432263、MH432261、KY372465、KY373109、KY192524
	region 2	JF714167
木薯绵粉蚧 *Phenacoccus manihoti*	HCO-LCO region	KY611349、KP692623
	region 2	EU267196
马缨丹绵粉蚧 *Phenacoccus parvus*	HCO-LCO region	KP692626、GU134711
	region 2	MG833849、KJ530609
Phenacoccus peruvianus	HCO-LCO region	KY373068
	region 2	JF714164
石蒜绵粉蚧 *Phenacoccus solani*	HCO-LCO region	KY372593、MG813765、KY373154、KY372565、KP981089、KP981088、KP981073
	region 2	KP745306、MH260227、KT369528、KP745311、KP745309、MH260244、MH260214、MH260213、MF966991、KJ620517
扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*	HCO-LCO region	KP981099、KP981098、MG813769
	region 2	MH260220、MH260242、JN112802、AB858432、AB499696、KJ620516、GQ903581、KF359477、MH260245、EU267212、EU267209、MH260211
柑橘臀纹粉蚧 *Planococcus citri*	HCO-LCO region	MG813768、MG813762、MG813763、MG813760、KY373108、KY373073、KY372846、MG813767、KY372905
	region 2	KJ187500、KJ187501、KY780492、JF714160、JF714158、JF714157、KJ530615、KJ530612、KJ530611、KR014243、GU134691、AY179431、KM378737、KM378736、MG833841、EU250572、EU250571、EU250570、EU250569、EU250568、EU250548、EU250566、EU250565、EU250560、EU250546、EU250542、EU250562、EU250558、EU250557、EU250554、EU250553、EU250547、EU250535、EU250536、EU250549、EU250552、EU250567、DQ238221、EU250551、EU267198、FJ786963、KP745301、EU250550、LC121493、AB439517、MF952535、JN120843、MF952472、MF952478、JF905461、KP745302、KM378731、KM378738、KY780496、MG866186、MG866185、AF483206
Planococcus ficus	HCO-LCO region	KY373122、JQ085547、JQ085548、JQ085546、KY372626、GU134703
	region 2	JQ085548、JQ085546、MF952534、JN120845、MF952522、MF952543、MF952525、MF952548、MF952491、MF952493、MF952452、MF952508、MF952507、MF952506、MF952501、MF952502、MF952496、MF952545、MF952544、MF952512、MF952485、MF952519、MF952473、MF952521、MF952471、MF952520、MF952468、MF952467、MF952464、MF952463、MF952466、MF952470、MF952517、MF952458、MF952455、MF952474、MF952457、MF952461、MF952479、MF952476、LC190452、DQ238220、KM378734

续表（Table continued）

种名 Name	CO Ⅰ区域 CO Ⅰ region	GenBank 登录号 GenBank ID
藤臀纹粉蚧 *Planococcus kraunhiae*	HCO-LCO region	KY373125、KY372719、KY372698、KP981071、KP692653、KP692652、KP692649、KP692650、KP692651
	region 2	AB513657、AB512112、LC121495
南洋臀纹粉蚧 *Planococcus lilacinus*	HCO-LCO region	KY373178、KY372420、KY373067、KP692656、KX015097、KY373104、KY373168、KY372460、KU254159、KY372494、KY372632
	region 2	GQ906767、KJ187494
大洋臀纹粉蚧 *Planococcus minor*	HCO-LCO region	KY373094、KP692658、KY372790、KY373090、KX015106、KY372523、KX015091
	region 2	GU134694、GU134689、EU250530、KJ187523、KJ187522、EU250529、EU250519、EU250525、EU250522、EU250527、EU250523、EU250517、EU250520、LC121494、EU250521、GQ906761、KM378739、MF966993
柏树臀纹粉蚧 *Planococcus vovae*	HCO-LCO region	JQ085557、JF714206
	region 2	JF714163、JF714162、JF905463
榕树粉蚧 *Pseudococcus baliteus*	HCO-LCO region	KY373148、KY373126、KY372928、KY373002、KY372804、KY372550、KY373070、KY372909、KY372441、KY372453、KY372536、KY372832、KY372805、MG437497、KY372855、KY372802、KY372890
	region 2	GQ906756、KJ187525、KJ187524
柑栖粉蚧 *Pseudococcus calceolariae*	HCO-LCO region	KY372768
	region 2	MG866181、JN112801
康氏粉蚧 *Pseudococcus comstocki*	HCO-LCO region	KY373062、KY373034、KP692668、KP692667、KP692664、KP692666、KP692665、KY373075、KY372442
	region 2	KJ187503、KJ187502、AB512117、AB513658、AB512116、LC121496、JF905462、GU134688、MF966989
Pseudococcus cryptus	HCO-LCO region	KP692673、KP692669、KY373100、KY373138、KY372960、KP692679、MG437494、KP692675、KP692676、KP692674、KY372911、KY372702、KY372962、KY372872、KY372808、KP692678
	region 2	AB512119、LC121497、KY373138、MG887769
杰克贝尔氏粉蚧 *Pseudococcus jackbeardsleyi*	HCO-LCO region	KU296283、KY373149、KC119455、KP981087
	region 2	KT956121、MG940975、KJ187489
Pseudococcus longispinus	HCO-LCO region	KY372759、KY372546、MG866189、MG866187、MG866188、KY372558、KY373106、KY373111、JQ085552
	region 2	AY179439、MG866182、EU267194、DQ238222、MG866183、GU134682、FJ786964、KJ187565、AB512118、KJ187564、JF714161、KP402196
Pseudococcus maritimus	HCO-LCO region	KY373141
	region 2	KJ187490
Pseudococcus viburni	HCO-LCO region	KY372761、KY373025、KY372504、KY372936、KJ530619、KY372929、KY372650、KY372826、KJ530622

续表（Table continued）

种名 Name	CO Ⅰ区域 CO Ⅰ region	GenBank 登录号 GenBank ID
	region 2	JN983137、JN983136、JF714166、KY372936、GU134685、KY372929、KJ530619、KY372826、KR014244、EU267207、FJ786966、JF905460
Rastrococcus invadens	HCO-LCO region	KU296042、KP692694
	region 2	MG833851
杧果平刺粉蚧 *Rastrococcus mangiferae*	HCO-LCO region	KU296039
	region 2	MG833845
蛛丝平刺粉蚧 *Rastrococcus spinosus*	HCO-LCO region	KY373172、KP692696、KP692695、KY372786
	region 2	KJ187527、KJ187526
Saccharicoccus sacchari	HCO-LCO region	KY372912
	region 2	KJ187561、KJ187556
耕葵粉蚧 *Trionymus agrestis*	HCO-LCO region	KP692714、KP692712、KP692713、JF714209、KX619448
	region 2	JF714169
刺竹轮粉蚧 *Trionymus bambusae*	HCO-LCO region	KY372440、KP692733
	region 2	KP692733
Vryburgia rimariae	HCO-LCO region	GU134697
	region 2	GU134680