



黄卫东, 梁建锋, 彭锋, 桑文, 陈晓胜, 王兴民. 基于通用引物的多重 PCR 对小圆胸小蠹的分子鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 994–1001.

基于通用引物的多重 PCR 对小圆胸小蠹的分子鉴定

黄卫东^{1,2}, 梁建锋¹, 彭锋^{1,2}, 桑文¹, 陈晓胜^{1,2}, 王兴民^{1*}

(1. 广东省生物农药创制与应用重点实验室, 生物防治教育部工程技术研究中心, 广州 510640;

2. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广州 510640)

摘要: 本研究利用通用引物的多重 PCR 方法开展小圆胸小蠹 *Euwallacea fornicatus* 的分子鉴定, 以期探究多重 PCR 在昆虫分子鉴定中的可行性, 并为开展小圆胸小蠹的有效、准确鉴定及综合防治等提供重要依据。使用多重 PCR 方法扩增了小圆胸小蠹的 COI、16S 和 28S 的 3 个分子片段, 并将获得的目的序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对; 利用 MEGA 7 计算方胸小蠹属不同种间的遗传距离, 并基于邻接法和最大似然法分别构建单基因系统发育树。结果表明: 多重 PCR 可以用于小圆胸小蠹分子序列的获取; 基于 COI 和 16S 的遗传距离分析表明了小圆胸小蠹的种内遗传距离均小于 2%; 基于单个基因构建的系统发育树均显示本研究扩增的小圆胸小蠹 COI 和 16S 序列与 GenBank 中获取的小圆胸小蠹 COI 和 16S 序列聚为一支。多重 PCR 可以应用于小圆胸小蠹的分子鉴定, 该方法不仅可以提高物种鉴定的准确率, 还可以减少 PCR 过程中的时间和 DNA 消耗。

关键词: 多重 PCR; 小圆胸小蠹; 分子鉴定; COI; 16S rDNA; 28S rDNA

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0994-08

Molecular identification of *Euwallacea fornicatus* based on multiplex PCR with universal primers

HUANG Wei-Dong^{1,2}, LIANG Jian-Feng¹, PENG Feng^{1,2}, SANG Wen¹, CHEN Xiao-Sheng^{1,2}, WANG Xing-Min^{1*} (1. Key Laboratory of Bio-Pesticide Innovation and Application, Guangdong Province, Engineering Research Center of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510640, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, the multiplex PCR with universal primers was used to conduct molecular identification of *Euwallacea fornicatus*, so as to explore the feasibility of multiplex PCR in the molecular identification of insect and provided an important basis for the effective and accurate identification and integrated control of *E. fornicatus*. Three molecular fragments of COI, 16S and 28S were amplified by multiplex PCR, and the target sequences were blasted in GenBank. The genetic distance of *Euwallacea* was calculated using MEGA 7. Phylogenetic analyses were performed based single-locus using neighbor-joining and maximum likelihood approaches. Our results indicated that the multiplex PCR method could be used to obtain molecular sequences of *E. fornicatus*. The genetic distance analysis based upon single-locus showed that the intra-specific genetic distance within *E. fornicatus* were all less than 2%. Phylogenetic

基金项目: 广州市科技计划重点项目 (201804020070); 广东省潮州市农业农村局项目 (PZH019D021)

作者简介: 黄卫东, 男, 1994 年生, 博士研究生, 研究方向为昆虫分子系统发育, E-mail: wdh6434@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 王兴民, 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为昆虫分类与进化, E-mail: wangxmcn@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2021-04-28; 接受日期 Accepted: 2021-06-07

trees constructed based on a single gene showed that COI and 16S sequences of *E. fornicatus* amplified in this study were clustered together with those COI and 16S sequences of *E. fornicatus* obtained from GenBank. Multiplex PCR could be applied to the molecular identification of *E. fornicatus*, which could not only improve the accuracy of species identification, but also reduced the time and DNA consumption in the PCR process.

Key words: Multiplex PCR; *Euwallacea fornicatus*; molecular identification; COI; 16S rDNA; 28S rDNA

小圆胸小蠹 *Euwallacea fornicatus* Eichhoff, 1868 隶属于鞘翅目 Coleoptera 象甲科 Curculionidae 小蠹亚科 Scolytinae 方胸小蠹属 *Euwallacea* (Smith *et al.*, 2019)。该虫在我国分布广泛, 主要分布于福建、海南、广东、广西、台湾、四川、云南、贵州等地, 国外则分布于东南亚、澳洲、美洲的 23 个国家和地区 (Rabaglia *et al.*, 2006; Huler *et al.*, 2007; 何华和伍苏然, 2016)。小圆胸小蠹是一种国际性的重大林木害虫, 也是近年国内外爆发成灾的重大蛀干害虫之一, 其寄主植物十分广泛, 在全球范围内包括 63 科 342 种 (Cooperband *et al.*, 2016; 李巧等, 2018)。小圆胸小蠹主要通过虫、菌结合来危害寄主植物, 成虫在寄主植物体内羽化后, 即开始钻蛀到新寄主植物枝干内进行产卵。在成虫钻蛀的过程中, 其体表携带的真菌孢子散落在蛀道内, 并开始生长。菌丝的过度生长会阻塞寄主植物的维管束, 影响树体水分传输, 与该虫共同危害树木 (Walgama, 2012; 何华和伍苏然, 2016; 李巧等, 2018)。

对害虫进行快速、准确地鉴定是实施害虫防治的基础和关键。目前, 对于农业害虫的鉴定大都采用传统的形态学方法, 但昆虫形态学鉴定主要是以成虫为研究对象, 而昆虫的卵、幼虫和蛹的形态特征很难辨认。因此, 利用以分子生物学手段为基础的 DNA 条形码技术对害虫进行分子鉴定, 能够在很大程度上弥补形态学鉴定中的不足。Hebert 等 (2003) 首次提出 DNA 条形码的概念, 即利用线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, COI) 约 658 bp 的分子片段对物种进行快速鉴定。目前, 该技术已广泛应用于象甲科昆虫的新种描述和物种鉴定等领域, 并展现出了极大的应用潜力 (Skuhrovec *et al.*, 2018; Cognato *et al.*, 2020)。除序列 COI 外, 在鞘翅目昆虫 DNA 条形码研究中涉及的分子片段还包括核基因的 28S rDNA (28S)、18S rDNA (18S)、延长因子 EF-1 α 等, 线粒体基因的 16S

rDNA (16S)、12S rDNA (12S)、COII 等 (张媛等, 2011)。

多重 PCR (multiplex PCR) 是指在一次 PCR 反应体系中同时加入多对引物, 从而产生多条目的片段的技术, 最早由 Chamberlain 等 (1988) 提出。目前, 多重 PCR 技术主要应用于病原微生物的快速检测: 如 Potrykus 等 (2014) 利用多重 PCR 成功检测了欧洲马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 上侵染的 *Pectobacterium* 病原菌; Kim 等 (2015) 则利用多重 PCR 成功检测了感染人类的 5 种 *Vibrio* 病原菌。该技术目前也被应用于节肢动物物种的鉴定中, 如王彦坤等 (2020) 利用 COI 和 16S 的通用引物结合双重 PCR 技术对 3 纲 8 目 14 科的 14 种节肢动物物种进行了鉴定, 结果显示双重 PCR 技术不仅可以保证物种鉴定的高准确率, 还可以明显减少时间与 DNA 样本量的消耗。然而, 关于使用多重 PCR 技术 (即在一个反应体系内同时扩增 3 个或 3 个以上的分子标记) 对昆虫进行快速鉴定仍未见报道, 其可行性需要进一步探究。

本研究选择在鞘翅目分子鉴定中常用的 COI、16S 和 28S 三个分子片段, 利用多重 PCR 的方法开展小圆胸小蠹的分子鉴定。目的在于: 一方面探究多重 PCR 在昆虫分子鉴定中的可行性, 另一方面建立小圆胸小蠹的分子鉴定方法, 以期开展小圆胸小蠹的有效、准确鉴定及综合防治等提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

小圆胸小蠹成虫样本采自于广东省潮州市潮安区凤凰镇 (纬度: 23.851108; 经度: 116.632647; 海拔: 539.32 m)。田间采集后, 至于无水乙醇中保存, 带回实验室至于 -20°C 低温贮存备用。成虫的形态鉴定主要依据 Gomez 等 (2018) 和 Smith 等 (2019) 的文献描述。

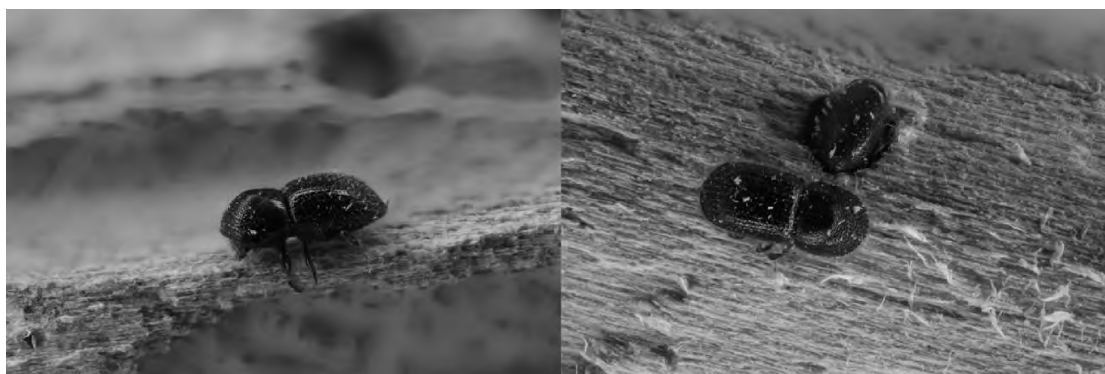


图1 小圆胸小蠹成虫生态照

Fig. 1 Ecological photograph of the adults of *Euwallacea fornicatus*

1.2 基因组 DNA 的提取

血液/组织/细胞基因组提取试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit) 用于目标昆虫 DNA 的提取。选择小圆胸小蠹后足组织用于 DNA 的提取, 详细的提取步骤严格按照试剂盒的说明书进行。提取后的 DNA 至于 -20°C 保存备用。

1.3 PCR 扩增及测序

试验设计了 4 组多重 PCR 体系, (1) COI + 28S + 16S; (2) COI + 16S; (3) COI + 28S; (4) 16S + 28S; 并且分别扩增了 28S、16S 和 COI 的单

个片段。引物序列信息和参考文献见表 1。

PCR 扩增体系为 $50\ \mu\text{L}$: PCR Mix $24\ \mu\text{L}$ (TransGen Biotech, Beijing), 上下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, 然后使用无菌水补充至 $50\ \mu\text{L}$ 。反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72°C 最终延伸 5 min。最后将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 经 EB 染色后, 在紫外灯下照射, 对符合目的片段长度的产物进行回收, 并送至上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	引物 Primers	序列 Sequences	参考文献 References
COI	LC01490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA	
16S	16S-F	TRACTGTRCAAAGCTAGC	Schulmeister, 2003
	16S-R	TTAATTC AACATCGAGGTC	
28S	28S Rd 4. 8a	ACCTATTCTCAAACCTTTAAATGG	Robertson <i>et al.</i> , 2013
	28S Rd 7b1	GACTTCCTTACCTACAT	

1.4 序列分析

在软件 Geneious 7.1.4 (Kearse *et al.*, 2012) 中将测序获得的基因序列进行拼接和人工校准, 去除两端引物。然后将拼接完成的序列输出文件格式为 FASTA, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上进行 BLAST 序列同源性分析, 以确认目的片段被扩增。使用软件 MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) 分别统计了小圆胸小蠹 COI、16S 和 28S 的碱基组成。为了计算种间的遗传距

离, 本研究从数据库中下载了部分小圆胸小蠹和其它方胸小蠹属的分子序列, 并利用 MUSCLE (Edgar, 2004) 对序列进行比对, 然后使用 MEGA 7 分析各种间的遗传距离 (表 2)。由于本研究扩增的小圆胸小蠹的 28S 片段与数据库中小圆胸小蠹的 28S 片段不属于同一区域, 因此本研究中 28S 的扩增仅用于探究多重 PCR 的可行性而不用用于后续的遗传距离计算和系统发育树的构建。

表 2 本研究所用到的序列信息

Table 2 Information of sequences used in this study

基因	编号	物种	GenBank 登录号
Gene	No.	Species	GenBank ID
COI	1	小圆胸小蠹 <i>Euwallacea fornicatus</i> *	MT946291
	2	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i>	MG642816
	3	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i>	MH729189
	4	<i>E. funereus</i>	MN619929
	5	<i>E. semirudis</i>	MN619944
	6	方胸小蠹某种 <i>Euwallacea</i> sp.	KM406725
	7	阔面方胸小蠹 <i>E. validus</i>	KP250549
	8	<i>Xylosandrus borealis</i>	MN620064
16S	9	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i> *	MT946906
	10	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i>	KU727059
	11	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i>	KU727060
	12	小圆胸小蠹 <i>E. fornicatus</i>	KU727063
	13	坡面方胸小蠹 <i>E. interjectus</i>	KM406655
	14	方胸小蠹某种 <i>Euwallacea</i> sp.	KM406651
	15	阔面方胸小蠹 <i>E. validus</i>	KM406662
	16	单刻材小蠹 <i>Xyleborus monographus</i>	AJ495567

注: * 表示本研究新生成的序列。Note: * represented these sequences were new generated in this study.

1.5 系统发育树构建

本研究分别基于单个分子片段使用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 用于系统发育树的构建。NJ 树的构建实施于 MEGA 7 中, 基于 K2P (Kimura-2-parameter) 双参数模型。ML 树的构建实施于 RAxML 8.2.8 (Stamatakis, 2014) 中, 同时使用自举值重复 1 000 次以检验各节点的可信度。在 ML 树构建之前, 使用 Modeltest (Posada and Crandall, 1998) 分别推算 COI 和 16S 数据集的最佳替换模型。ML 分析在 CIPRES Science Gateway 上运行 (Miller *et al.*, 2010)。

2 结果与分析

2.1 通用引物的多重 PCR 检测

基于通用引物的小圆胸小蠹的多重 PCR 检测

结果显示: 在包含 COI、16S 和 28S 的反应体系 1 中产生 3 条目的条带, 但 COI 条带较弱。在包含 COI 和 16S 的体系 2 中, COI 条带也较弱, 16S 则产生明亮条带。对比包含 COI 和 28S 的体系 3 中, COI 和 28S 均产生明亮条带。在包含 16S 和 28S 的反应体系 4 中, 也产生了 2 条明亮条带。此外, 基于单个 PCR 反应的 COI、16S 和 28S 均产生了符合目的片段大小的明亮条带 (图 1)。

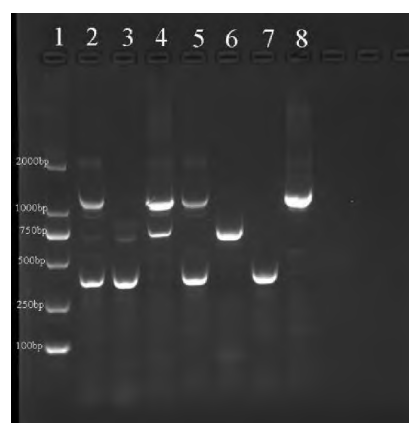


图 2 小圆胸小蠹的多重 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification result of *Euwallacea fornicatus* with multiplex PCR

注: 1, Marker 2000; 2, COI + 16S + 28S; 3, COI + 16S; 4, COI + 28S; 5, 16S + 28S; 6, COI; 7, 16S; 8, 28S。

2.2 基因序列分析

将序列拼接完成、去除两端引物后, 扩增得到小圆胸小蠹的 COI 序列长度为 658 bp, 16S 序列长度为 302 bp, 28S 序列长度为 908 bp。在 GenBank 中进行 BLAST 检索显示所获得序列为目的序列。在 COI 的所有位点中, 碱基 A、T、G 和 C 的含量分别为 33.0%、33.1%、14.9% 和 19.0%, 且 A + T 含量高于 G + C 含量。在 16S 的所有位点中, 碱基 A、T、G 和 C 的含量分别为 37.4%、39.0%、15.1% 和 8.5%, 且 A + T 含量高于 G + C 含量。在 28S 的所有位点中, 碱基 A、T、G 和 C 的含量分别为 24.3%、21.8%、29.9% 和 24.0%, 而 A + T 含量稍低于 G + C 含量。本研究新测序的分子序列均已上传至 GenBank 中; COI 登录号为 MT946291, 16S 登录号为 MT946906, 28S 登录号为 MT940909。

2.3 遗传距离分析

基于 COI 的遗传距离分析显示本研究扩增获取的序列与数据库中小圆胸小蠹的 COI 序列的遗传距离为 0.009 ~ 0.014; 而与其它方胸小蠹属的

遗传距离为 0.104 ~ 0.162 (表 3)。基于 16S 的遗传距离分析显示本研究扩增获取的序列与数据库中小圆胸小蠹的 16S 序列的遗传距离为 0.000 ~

0.007; 而与其它方胸小蠹属的遗传距离为 0.081 ~ 0.114 (表 4)。

表 3 基于 COI 基因的小圆胸小蠹与其它小蠹的遗传距离分析

Table 3 Genetic distance between *Euwallacea fornicatus* and other species of *Euwallacea* based on COI gene

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7
1							
2	0.014						
3	0.014	0.009					
4	0.134	0.140	0.148				
5	0.147	0.161	0.153	0.159			
6	0.104	0.113	0.110	0.130	0.155		
7	0.162	0.160	0.164	0.172	0.153	0.158	

注: 表中编号 1~7 与表 2 中编号相对应。Note: Number 1~7 in this table correspond to those in table 2.

表 4 基于 16S 基因的小圆胸小蠹与其它小蠹的遗传距离分析

Table 4 Genetic distance between *Euwallacea fornicatus* and other species of *Euwallacea* based on 16S gene

编号 No.	8	9	10	11	12	13	14
8							
9	0.007						
10	0.000	0.007					
11	0.004	0.011	0.004				
12	0.089	0.097	0.089	0.085			
13	0.081	0.085	0.081	0.081	0.109		
14	0.114	0.122	0.114	0.118	0.119	0.140	

注: 表中编号 8~14 与表 2 中编号相对应。Note: Number 8~14 in this table corresponded to those in table 2.

2.4 系统发育树构建

系统发育分析结果表明,无论是基于何种建树方法还是不同的分子片段,本研究扩增的小圆胸小蠹的分子序列与数据库中小圆胸小蠹的分子序列均聚为一支,且得到较高的支持率(图 2,图 3)。此外,小圆胸小蠹与其它方胸小蠹属的物种区分明显,表明 COI 和 16S 分子序列可作为小圆胸小蠹分子鉴定的依据。

3 结论与讨论

DNA 条形码鉴定的前提是 DNA 条形码间隙(barcode gap)的存在,即种间遗传距离大于种内遗传距离(Hebert *et al.*, 2003; 2004; Puillandre

et al., 2012; Taylor and Harris, 2012)。Hebert 等(2004)指出种间遗传距离分化至少应大于种内遗传分化的 10 倍;然而,后续的研究表明遗传距离阈值对于不同类群来说是不一致的(Havermans *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2018)。例如,2%~3% 被表明适用于膜翅目、蜉蝣目、襁翅目和毛翅目部分类群的种类鉴定(Monaghan *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010; Webb *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2015); 3%~5% 适用于一些双翅目和鞘翅目物种的种类鉴定(Lin *et al.*, 2015; Nzelu *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2020); 而 6%~8% 则适用于毛翅目纹石蛾科 Hydropsychidae 的物种鉴定(Pauls *et al.*, 2010)。在本研究中,基于 COI 基因的遗传距离分析表明本研究扩增的小圆胸小蠹的 DNA 条形码序列与数据库中的序列差异小于 2%,

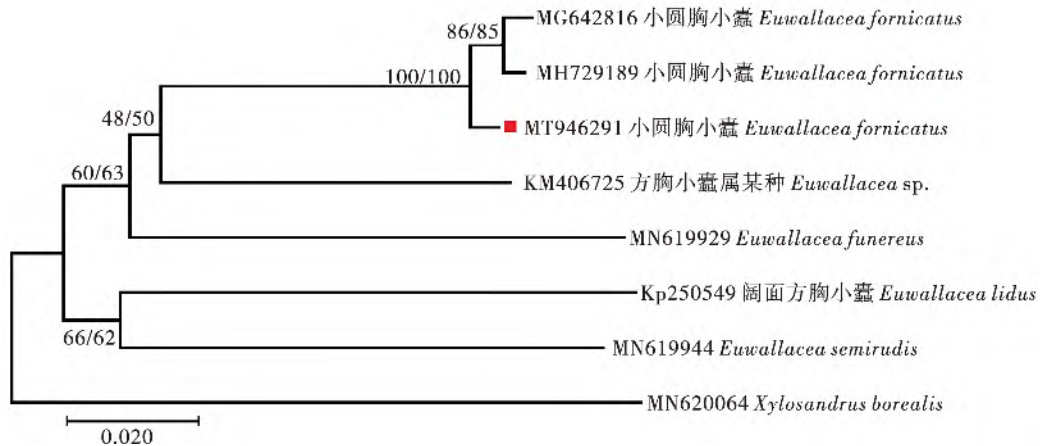


图3 基于 COI 基因的小圆胸小蠹与其它小蠹构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Ewallacea fornicatus* and other species of *Ewallacea* based on COI gene
注: 图中节点旁边为自举值 (左: NJ; 右: ML), 红色方形表示本研究中生成的序列。Note: Numbers at nodes represented bootstrap value for NJ (left) and ML (right). Red rectangle represented this sequence was new generated in this study.

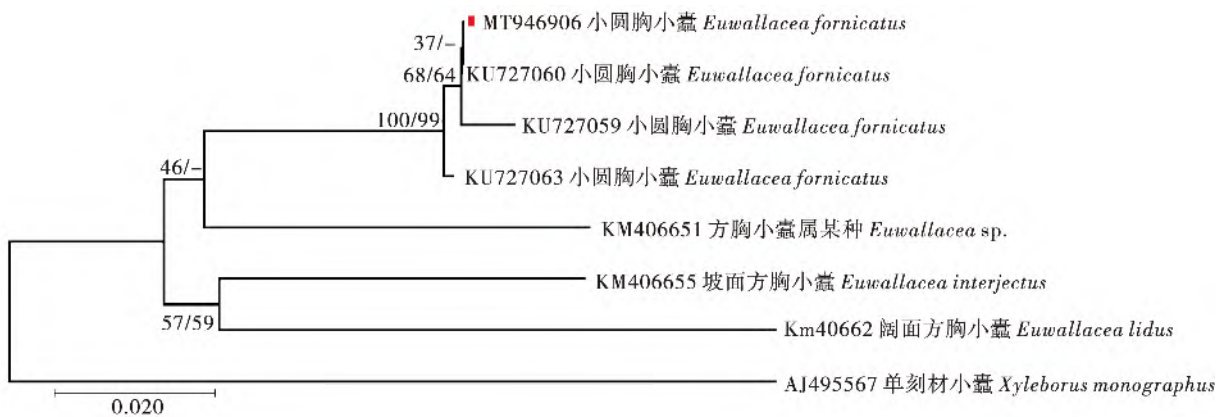


图4 基于 16S 基因的小圆胸小蠹与其它小蠹构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Ewallacea fornicatus* and other species of *Ewallacea* based on 16S gene
注: 图中节点旁边为自举值 (左: NJ; 右: ML), 红色方形表示本研究中生成的序列。Note: Numbers at nodes represented bootstrap value for NJ (left) and ML (right). Red rectangle represented this sequence was new generated in this study.

而和其它方胸小蠹属的序列差异则为 10.4% ~ 16.2%。同样地, 在基于 16S 基因的遗传距离分析中也揭示了本研究扩增的小圆胸小蠹的 16S 序列与数据库中小圆胸小蠹的 16S 序列具有极高的相似性。目前, 一些研究表明基于 COI 单个分子的物种鉴定结果经常被一些偏差所影响, 包括假基因的存在、不完全谱系选择和基因渗透 (Funk and Omland, 2003; Dupuis *et al.*, 2012; Talavera *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2020)。因此, 为了增加分子鉴定的可信度, 其它的基因片段, 如 12S、16S、18S 和 28S 被提出作为互补的分子片段用于物种鉴定 (Leray *et al.*, 2013; Elbrecht *et al.*, 2016)。本

研究中, 利用多个分子片段同时用于小圆胸小蠹的分子鉴定, 遗传距离和系统发育分析的结果表明 COI 和 16S 分子片段可用于小圆胸小蠹的快速、准确鉴定, 同时也强调了使用多个分子片段在准确鉴定物种方面的重要性。

在本研究中, 首次使用 3 对通用引物来开展小圆胸小蠹的分子鉴定, 并探究多重 PCR 在昆虫中应用的可行性。结果表明, 在设置的 4 个多重 PCR 反应体系中均可以产生符合目的片段大小的单一条带。但在体系 1 和体系 2 中, COI 产生的条带则较暗, 通过比较体系 3 和体系 4 中的引物配置, 推测由于体系 1 和体系 2 中包含了 16S 的扩增

引物,从而影响了 COI 的扩增效果。引物的选择与优化被认为是影响多重 PCR 效果的最主要因素 (Elnifro *et al.*, 2000)。由于 COI 和 16S 同属于线粒体基因,且大多数昆虫线粒体基因组排列与昆虫线粒体基因组原始排列顺序一致 (Cameron, 2014),因此这两个片段的引物可能会发生相互干扰。由于本研究中的多重 PCR 反应体系为 50 μ L,使得仍可以通过胶回收获取足量的 COI 扩增产物以满足测序的要求。为解决在多重 PCR 反应中部分条带较弱的问题,一些研究提出在反应体系中增加对应引物的量,可以有效的增加引物与模板结合的概率 (Elnifro *et al.*, 2000; 郝少东等, 2015)。

本研究证实了多重 PCR 应用于昆虫分子鉴定的可行性。在一个 PCR 反应体系中产生的多条分子序列,不仅提高了物种鉴定的准确率,而且节省了 PCR 反应所需时间和模板的消耗;在样品材料十分珍贵的情况下,这两点显得尤为重要。此外,通过 COI、16S 和 28S 提供的序列信息和多重 PCR 方法,建立了小圆胸小蠹的分子鉴定方法,为开展小圆胸小蠹的准确鉴定及综合防治等奠定了基础。考虑到当前数据库丰富的分子序列和引物设计的便捷,建议在研究不同类群时挑选合适的基因和不同的引物组合,采用多重 PCR 开展物种的鉴定工作,以增加物种鉴定的准确性。

参考文献 (References)

- Cameron SL. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny [J]. *Annual Review of Entomology*, 2014, 59: 95 – 117.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (23): 11141 – 11156.
- Cognato AI, Sari G, Smith SM, *et al.* The essential role of taxonomic expertise in the creation of DNA databases for the identification and delimitation of Southeast Asian ambrosia beetle species (Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini) [J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2020, 8: 27 – 44.
- Cooperband MF, Stouthamer R, Carrillo D, *et al.* Biology of two members of the *Euwallacea fornicatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), recently invasive in the USA, reared on an ambrosia beetle artificial diet [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2016, 18 (3): 223 – 237.
- Dupuis JR, Roe AD, Sperling FAH. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: One marker is not enough [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21 (18): 4422 – 4436.
- Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (5): 1792 – 1797.
- Elbrecht V, Taberlet P, Dejean T, *et al.* Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e1966.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, *et al.* Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (4): 559 – 570.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3 (5): 294 – 299.
- Funk DJ, Omland KE. Species – level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2003, 34 (1): 397 – 423.
- Gomez DF, Skelton J, Steininger MS, *et al.* Species delineation within the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae) complex revealed by morphometric and phylogenetic analyses [J]. *Insect Systematics and Diversity*, 2018, 2 (6): 1 – 11.
- Hao SD, Chen YQ, Wang JZ, *et al.* Multiplex – PCR for identification of two *Hishimonus* species (Hemiptera: Cicadellidae) in jujube orchards and detection of jujube witches' broom (JWB) phytoplasma in their bodies [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 58 (3): 264 – 270. [郝少东, 陈昱圻, 王进忠, 等. 多重 PCR 法区分枣园两种菱纹叶蝉及检测其体内枣疯病植原体 [J]. 昆虫学报, 2015, 58 (3): 264 – 270]
- Havermans C, Nagy ZT, Sonet G, *et al.* DNA barcoding reveals new insights into the diversity of antarctic species of *Orchomene sensulato* (Crustacea: Amphipoda: Lysianassoidea) [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58 (1): 230 – 241.
- He H, Wu SR. Research progress on *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Scolytidae) [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2016, 36 (12): 66 – 69. [何华, 伍苏然. 小圆胸小蠹的研究进展 [J]. 热带农业科学, 2016, 36 (12): 66 – 69]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2003, 270 (1512): 313 – 321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biology*, 2004, 2 (10): e312.
- Huang WD, Xie XF, Huo LZ, *et al.* An integrative DNA barcoding framework of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 1 – 10.
- Hulcr J, Mogia M, Isua B, *et al.* Host specificity of ambrosia and bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae) in a New Guinea rainforest [J]. *Ecological Entomology*, 2007, 32: 762 – 772.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, *et al.* Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (12):

- 1647–1649.
- Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, *et al.* Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15 (1): 239–249.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870–1874.
- Leray M, Yang JY, Meyer CP, *et al.* A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents [J]. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10 (1): 34–47.
- Li Q, Han CX, Sun JH. Research advance on *Euwallacea fornicatus* and its fungal symbionts [J]. *Journal of Biosafety*, 2018, 27 (3): 164–170. [李巧, 韩春绪, 孙江华. 小圆胸小蠹及其真菌共生体研究进展 [J]. 生物安全学报, 2018, 27 (3): 164–170]
- Lin X, Stur E, Ekrem T. Exploring genetic divergence in a species-rich insect genus using 2790 DNA barcodes [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (9): e0138993.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees [C]. 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). Ieee, 2010: 1–8.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, *et al.* DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360 (1462): 1925–1933.
- Nzulu CO, Cáceres AG, Arrunátegui – Jiménez MJ, *et al.* DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru [J]. *Acta Tropica*, 2015, 145: 45–51.
- Pauls SU, Blahnik RJ, Zhou X, *et al.* DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean Smicridea (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae) [J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2010, 29 (3): 1058–1074.
- Posada D, Crandall KA. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14 (9): 817–818.
- Potrykus M, Sledz W, Golanowska M, *et al.* Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction [J]. *Annals of Applied Biology*, 2014, 165 (3): 474–487.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, *et al.* ABGD, Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21 (8): 1864–1877.
- Rabaglia RJ, Dole SA, Cognato AI. Review of American Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring north of Mexico, with an illustrated key [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2006, 99 (6): 1034–1056.
- Robertson JA, Ślipiński A, Hiatt K, *et al.* Molecules, morphology and minute hooded beetles: A phylogenetic study with implications for the evolution and classification of Corylophidae (Coleoptera: Cucujoidea) [J]. *Systematic Entomology*, 2013, 38 (1): 209–232.
- Schmidt S, Schmid-Egger C, Morinière J, *et al.* DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: Identifications for Central European bees (Hymenoptera, Apoidea partim) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15 (4): 985–1000.
- Schulmeister S. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): Introducing robust-choice sensitivity analysis [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2003, 79 (2): 245–275.
- Skuhrovec J, Gosik R, Caldara R, *et al.* Morphological characters of immature stages of Palaearctic species of *Cleopomiarus* and *Miarus* and their systematic value in Mecinini (Coleoptera, Curculionidae, Curculioninae) [J]. *ZooKeys*, 2018, 808: 23–92.
- Smith SM, Gomez DF, Beaver RA, *et al.* Reassessment of the species in the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) complex after the rediscovery of the “lost” type specimen [J]. *Insects*, 2019, 10 (9): 261–271.
- Song C, Lin XL, Wang Q, *et al.* DNA barcodes successfully delimit morphospecies in a superdiverse insect genus [J]. *Zoologica Scripta*, 2018, 47 (3): 311–324.
- Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (9): 1312–1313.
- Talavera G, Dincă V, Vila R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: Insights from a butterfly survey [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2013, 4 (12): 1101–1110.
- Taylor HR, Harris WE. An emergent science on the brink of irrelevance: A review of the past 8 years of DNA barcoding [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12 (3): 377–388.
- Walgama RS. Ecology and integrated pest management of *Xyleborus fornicatus* (Coleoptera: Scolytidae) in Sri Lanka [J]. *Journal of Integrated Pest Management*, 2012, 3 (4): 1–8.
- Wang YK, Li TC, Nian JZ, *et al.* Application of duplex PCR with universal primers in arthropod species identification [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2020, 63 (1): 97–103. [王彦坤, 李天楚, 粘景梓, 等. 通用引物双重 PCR 在节肢动物物种鉴定中的应用 [J]. 昆虫学报, 2020, 63 (1): 97–103]
- Webb JM, Jacobus LM, Funk DH, *et al.* A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: Progress and prospects [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (5): e38063.
- Zhang Y, Guo XH, Liu GC, *et al.* Application of DNA barcodes to molecular systematics of Coleoptera [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (2): 410–416. [张媛, 郭晓华, 刘广纯, 等. DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (2): 410–416]
- Zhou X, Jacobus LM, DeWalt RE, *et al.* Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): Insights into biodiversity patterns from DNA barcoding [J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2010, 29 (3): 814–837.