

锈色粒肩天牛幼虫的 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因片段序列分析

叶碧欢¹, 李海波¹, 叶卫邦², 陈友吾¹

(1. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023; 2. 金华森林之宝农林科技开发有限公司, 浙江 金华 321000)

摘要:【目的】基于分子生物学手段, 探讨可快速准确鉴别锈色粒肩天牛 *Apriona swainsoni* 幼虫与其他天牛幼虫的目标基因, 为该保健昆虫的食药安全提供保障。【方法】利用线粒体 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 基因和 28S 细胞核基因的通用引物分别克隆获得 4 种基因片段, 并进行同源序列检索、多重比对、序列信息分析及进化树构建。【结果】基因克隆最终获得锈色粒肩天牛 4 种基因序列的片段大小分别为 817、545、434 和 1 088 bp。特殊位点分布结果显示: 28S 的保守位点占比最高, 其后依次为 *Cytb*、*CO I* 和 *CO II*, 变异率则正好相反。*CO I*、*CO II* 和 *Cytb* 基因片段的碱基组成和替换信息特点均表现为 A+T 含量>G+C 含量, 颠换高于转换, 28S 基因片段则表现为 A+T 含量<G+C 含量, 颠换低于转换。序列信息分析结果表明: 线粒体基因和核基因的序列结构存在差异, 核基因较线粒体基因更为保守。4 种基因序列的分子进化树均能将锈色粒肩天牛幼虫与桑天牛 *A. germari* 等其他天牛幼虫区分开。【结论】*CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因均可作为鉴定该虫的分子生物学参考依据。图 1 表 4 参 42

关键词: 森林保护学; 锈色粒肩天牛幼虫(斗米虫); *CO I*; *CO II*; *Cytb*; 28S; 序列分析; 物种鉴别

中图分类号: S763.38

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2020)02-0303-08

Sequence analysis of *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S gene fragments from *Apriona swainsoni* larvae

YE Bihuan¹, LI Haibo¹, YE Weibang², CHEN Youwu¹

(1. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Jinhua Forest Treasure Technology Development Company, Jinhua 321000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Based on molecular biological methods, this research was intended to explore the the target genes that could identify *Apriona swainsoni* larvae from other Cerambycidae larvae, so as to provide a guarantee for the food and drug use of *A. swainsonias* larvae. [Method] Four different gene fragments were cloned using the general primers of *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S genes before the homologous sequence retrieval, multiple comparison, sequence analysis and molecular phylogenetic tree construction were carried out. [Result] (1) The fragments of the four gene sequences obtained by gene cloning were 817, 545, 434 and 1 088 bp, respectively. (2) In light of the distribution of special loci, 28S had the highest proportion of conserved sites, followed by *Cytb*, *CO I* and *CO II*, while the variability rate was just the opposite. The base composition and replacement of the *CO I*, *CO II* and *Cytb* gene fragments were all shown as A+T contents > G+C contents, with the rate of translocation higher than that of the conversion. However, when it came to the 28S gene fragment, it was A+T cotents < G+C cotents, with the rate of translocation lower than that of the conversion. (3) There existed differences in the sequence structure between mitochondrial genes and nuclear genes with the latter more conservative than the former. (4)The molecular phylogenetic relationship based on those four

收稿日期: 2019-04-10; 修回日期: 2019-08-23

基金项目: 浙江省科技计划项目(2016F30012); 浙江省省属科研院所资助项目(2019F1068-1)

作者简介: 叶碧欢, 助理研究员, 博士, 从事森林病虫害综合防治等研究。E-mail: 393938188@qq.com

gene sequences could distinguish *A. swainsoni* larvae from other Cerambycidae larvae, such as *A. germari*. [Conclusion] *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S genes could be used as the molecular reference for the identification of *A. swainsoni* larvae. [Ch, 1 fig. 4 tab. 42 ref.]

Key words: forest protection; *Apriona swainsoni* larvae; *CO I*; *CO II*; *Cytb*; 28S; sequence analysis; species identification

锈色粒肩天牛 *Apriona swainsoni* 隶属于鞘翅目 Coleoptera 天牛科 Cerambycidae 沟颈天牛亚科 Lamiinae 白条天牛族 Batocerini 粒肩天牛属 *Apriona*^[1-2], 可危害国槐 *Sophora japonica*、黄檀 *Dalbergia hupehana*、三叉蕨 *Tectaria subtriphylla*、悬铃木 *Plantanus acerifoli* 等多种植物^[3-6], 而其寄生于云实 *Caesalpinia decapetala* 树茎的幼虫, 异名云实蛀虫、云实蠹虫、黄牛刺虫、黄寮刺虫, 在民间一直都有食服的习惯, 因“一斗米换一条虫”而得名“斗米虫”^[7-9]。近年来, 斗米虫因其良好的药食功效^[7-8,10-11]日益获得认同。斗米虫野外采集困难, 人工规模化生产尚未成熟, 其市场价格因此逐步走高。受经济利益驱使, 目前市场上时常发生其他天牛幼虫伪充斗米虫的现象, 导致误食中毒等事件, 扰乱药食昆虫市场的秩序。天牛科昆虫分类主要依据其成虫形态特征, 幼虫形态描述信息缺乏, 幼虫分类存在一定难度^[12]。在实际工作中也发现, 斗米虫与其他天牛幼虫, 例如桑天牛 *A. germari* 幼虫, 在形态方面具有一定的相似性, 仅靠幼虫形态特征很容易鉴别错误。此外, 因加工炮制等处理导致幼虫形态被破坏, 也提高了鉴别难度。分子生物学手段的应用在很大程度上弥补了物种形态学鉴定的不足^[13-16]。线粒体细胞色素氧化酶 C 亚基 I (Cytochrome C oxidase subunit I, *CO I*)^[17-20]、*CO II*^[21]、16S 核糖体 RNA (16S rRNA, 16S)^[22]、*ND* 基因 (NADH dehydrogenase subunit, *ND*)^[23] 和细胞色素 B (Cytochrome b, *Cytb*)^[24-25] 等, 以及细胞核 28S 核糖体 RNA (28S rRNA, 28S)^[23] 和核糖体 DNA 的内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS)^[26-28] 等多种基因已广泛应用于多种昆虫的分类鉴别。目前尚未发现锈色粒肩天牛幼虫线粒体基因或核基因序列鉴定的相关报道, 因此, 本研究对锈色粒肩天牛幼虫的 3 种线粒体编码基因 (*CO I*、*CO II* 和 *Cytb*), 以及 1 种核糖体大亚基编码基因 (28S) 共 4 种序列展开了研究。此次也对来自 3 个地区的桑天牛 *A. germari* 幼虫样品进行了测序, 以补充桑天牛幼虫上述 4 种基因的序列信息, 提高天牛幼虫进化树拓扑结构的准确性。本研究通过多种基因片段的序列分析, 为锈色粒肩天牛幼虫的准确鉴定提供依据, 也为该虫的食药安全提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 用于测序的 4 份锈色粒肩天牛幼虫样品分别来自于浙江金华 (S1)、江西上饶 (S2)、浙江开化 (S3)、浙江淳安 (S4), 3 份桑天牛幼虫样品分别来自于浙江金华 (G1)、江西上饶 (G2)、浙江开化 (G3), 幼虫活体置于 -4℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 供试试剂 TIANamp Genomic DNA Kit, 天根生物科技 (北京) 有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒 (GE0101-50)、感受态细胞 (*Escherichia coli* DH5 α)、TS-GelRed 核酸染料 (10 000 $\times$ 水溶液), 北京擎科新业生物技术有限公司; pGEM-T Easy 载体, 美国 Promega 公司; Regular Agarose, 西班牙 Biowest 公司; 50 $\times$ TAE Tris-乙酸电泳缓冲液, 福州 Phygene 生物技术有限公司。

1.1.3 供试仪器 DK-S26 电热恒温水浴锅, 上海森信实验仪器有限公司; FRESCO 21 微量冷冻离心机、NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 美国 Thermo Scientific 公司; Life ECO 扩增仪, 杭州博日科技有限公司; DYY-12C 型电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; Bio-Rad 凝胶成像系统, 美国伯乐公司。

1.1.4 供试引物 所采用的 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因片段扩增引物信息详见表 1, 供试引物委托北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及浓度测定 取待提取幼虫, 用无菌水清洗数遍, 滤纸吸干水分, 加液氮彻底磨碎。基因组 DNA 的提取参照天根 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒操作说明书。利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计对样品基因组 DNA 进行核酸纯度及浓度的检测, 于 -20℃ 冰箱储藏备用。

表 1 本研究供试引物信息

Table 1 Information of tested primers

扩增基因片段	引物序列 (5'→3')	退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$	参考文献
<i>CO I</i>	2195: TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	54	[22, 29]
	3014: TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA		
<i>CO II</i>	<i>CO II Sz-F</i> : TGCTTCAAGATAGAGCCTCTCC	54	[21, 28]
	<i>CO II Sz-R</i> : GGTTCCTCCACAGATTTTCAG		
<i>Cytb</i>	<i>CytbF</i> : TATGTACTACCATGAGGACAAATAT	58	[25, 30]
	<i>CytbR</i> : ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT		
28S	D2-3665F: AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG	58	[22, 31]
	D5-4749R: GTTACACACTCCTTAGCGGA		

1.2.2 PCR 扩增、电泳及测序 PCR 扩增反应体系为(总体积 20 μL): 2 $\times$ TSINGKE Master Mix 10 μL , 10 $\text{umol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物对各 1.5 uL , 模板 DNA 3 uL (20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ddH_2O 补足至 20 μL 。扩增程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 退火 45 s(不同引物对的退火温度 T_m 详见表 1), 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后于 72 $^\circ\text{C}$ 补平 7 min, 终止温度为 4 $^\circ\text{C}$ 。PCR 扩增反应在 LifeECO 基因扩增仪(杭州博日)上进行。取 PCR 扩增产物 3 μL , 点样于质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶上, TS-GelRed 核酸染料染色, 1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳 30~40 min(120 V), 扩增图谱摄取采用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪。PCR 扩增产物经切胶回收、纯化、pGEM-Teasy 载体连接、感受态细胞转化(*E. coli* DH5 α)和蓝白斑筛选后, 随机挑选 5 个阳性克隆由北京擎科新业生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据分析 测序结果利用 Contig Express 软件进行拼接, 得到目的基因片段在美国国家生物信息中心(NCBI)数据库中进行 BLAST 比对和相似性检索, 以确定所获片段是否为目的基因并获得同源序列。利用 MEGA 6.0 软件将本研究获得的基因片段与 GenBank 检索获得的同源序列进行多重比对, 两端对齐, 进行序列信息分析, 包括碱基组成、变异位点、简约信息位点等。同时运用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建进化树, 模型为 K2P(Kimura 2 parameter), Bootstrap 置信值估算重复数设定为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 基因序列的克隆与鉴定

由表 1 所示: 引物成功扩增获得 2 种天牛幼虫的 4 种基因片段。经测序、拼接并去除上下游引物及两端不稳定序列, 锈色粒肩天牛幼虫最终的 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因片段大小分别为 817、545、434 和 1 088 bp, 桑天牛幼虫基因片段大小则分别为 783、545、435 和 1 096 bp。将各基因片段在 GenBank 进行 BLAST, 比对结果显示所获基因片段与其他天牛等昆虫的目标基因片段的相似性达 80% 以上, 说明本研究成功获得 2 种天牛幼虫的 4 种不同基因片段。

2.2 基因序列信息分析

将锈色粒肩天牛幼虫的 4 种基因序列与桑天牛幼虫序列以及 GenBank 中比对获得的其他天牛同源序列进行多重比较并分析各基因序列信息(表 2~4)。其中, *CO I* 基因同源序列来自天牛科 7 属 16 种, *CO II* 基因同源序列来自天牛科 12 属 15 种, *Cytb* 基因同源序列来自天牛科 3 属 4 种, 28S 基因同源序列来自天牛科 7 属 7 种。

所有序列多重比较, 两端对齐去除冗余位点后, 最终得到不同长度的各基因片段(456~744 bp), 并对所有样品 4 种基因序列中含有保守位点、变异性位点、简约信息位点和单突变位点的数量及百分比进行了分析统计。表 2 显示: 28S 的保守位点所占比例最高(73.28%), 其后依次为 *Cytb* (66.45%)、*CO I* (63.57%) 和 *CO II* (54.86%); 4 种基因的变异率则恰好相反, *CO II* 序列的变异率最高(45.14%), 其后依次为 *CO I* (36.42%) 和 *Cytb* (33.55%), 28S 变异率最低(25.34%)。

CO I、*CO II*、*Cytb* 和 28S 各基因所比对的同源序列碱基组成特点如表 3 所示。其中, *CO I*、*CO II* 和 *Cytb* 基因的 T 碱基含量最高, 其次是 A 碱基, A+T 含量(69.72%、73.81%、72.53%)均明显高于 G+C 含

表2 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因同源序列的特殊位点分布Table 2 Distribution of specific sites of *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S gene homologous sequences

基因名称	保守位点		变异性位点		简约信息位点	单突变位点数	片段大小/bp
	数量/个	百分比/%	数量/个	百分比/%	数量/个	量/个	
<i>CO I</i>	473	63.57	271	36.42	218	53	744
<i>CO II</i>	288	54.86	237	45.14	190	47	525
<i>Cytb</i>	303	66.45	153	33.55	130	23	456
28S	480	73.28	166	25.34	92	74	655

表3 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因同源序列碱基组成特点Table 3 Base composition characteristic of *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S homologous sequences

基因名称	碱基含量/%				A+T 含量/%	G+C 含量/%
	T	C	A	G		
<i>CO I</i>	38.75	15.37	30.97	14.90	69.72	30.27
<i>CO II</i>	40.90	15.96	32.91	10.23	73.81	26.19
<i>Cytb</i>	39.70	17.76	31.63	10.91	72.53	27.47
28S	21.30	28.78	17.42	32.50	38.72	61.28

量(30.27%、26.19%、27.47%), 而 28S 基因的 G 碱基含量最高, 其次是 C 碱基, A+T 含量(38.72%)则明显低于 G+C 含量(61.28%)。

CO I、*CO II*、*Cytb* 和 28S 各基因所比对的同源序列碱基替换信息见表 4。从表 4 可知: *CO I*、*CO II* 和 *Cytb* 基因序列的颠换均高于转换, 转换与颠换比(*R*)平均值约 0.8, 颠换以 T 和 A 之间为主; 而 28S 基因序列 *R* 平均值为 1.5, 即转换高于颠换, 转换以 T 和 C 之间为主。

表4 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因同源序列的碱基替换模式Table 4 Base substitution mode of *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S gene homologous sequences

基因名称	位点	转换	颠换	<i>R</i>	碱基替换频次									
					TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
<i>CO I</i>	第 1	27	46	0.57	80	23	39	1	5	6	0	89	4	0
	第 2	14	6	2.46	64	10	3	1	34	1	0	62	5	67
	第 3	3	3	1.12	104	2	1	0	54	0	1	48	1	36
	总计	44	55	0.80	248	35	43	2	93	7	1	199	10	103
<i>CO II</i>	第 1	14	10	1.36	46	8	5	2	27	3	0	47	6	32
	第 2	3	3	1.07	72	3	2	0	36	1	0	45	0	16
	第 3	20	34	0.58	64	18	30	0	3	4	0	55	2	0
	总计	37	47	0.79	182	29	37	2	66	8	0	147	8	48
<i>Cytb</i>	第 1	18	27	0.68	50	17	22	0	7	5	0	48	2	1
	第 2	10	7	1.32	40	7	5	1	23	1	1	42	3	29
	第 3	2	1	2.13	63	2	1	0	34	0	0	35	0	16
	总计	30	35	0.86	153	26	28	1	64	6	1	125	5	46
28S	第 1	7	6	1.24	37	4	2	2	48	1	2	32	3	73
	第 2	12	8	1.58	44	10	3	2	53	1	2	36	3	51
	第 3	11	6	1.92	30	8	1	1	59	2	1	29	3	67
	总计	30	20	1.50	111	22	6	5	160	4	5	97	9	191

2.3 基因序列的进化树构建

分别基于 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因片段, 运用邻接法构建锈色粒肩天牛与其他天牛的分子进化树(图 1A~D)。可知, 基于 *CO I* 和 28S 基因序列的分子进化树中, 同属的昆虫均聚集为一类, 其中粒肩天牛属的锈色粒肩天牛或桑天牛同种不同样品亦分别聚成一小分支, 这与传统的分类方法相一致(图

1A, D)。基于 *CO II* 和 *Cytb* 基因序列的分子进化树中，锈色粒肩天牛和桑天牛各自不同样品也以较高的置信值分别聚成一支，但这 2 种同属的昆虫并未如 *CO I* 基因序列的进化树聚为一大类。*CO II* 基因进化树中，锈色粒肩天牛与星斑天牛属 *Psacotha* 的黄星天牛 *Psacotha hilaris* 聚集，桑天牛则与白天牛属 *Olenecamptus* 的六星天牛 *Olenecamptus clarus* 聚在一起。*Cytb* 基因进化树中，锈色粒肩天牛先与厚花天牛属 *Pachyta* 的双斑厚花天牛 *Pachyta bicuneata* 聚集，再与桑天牛聚类(图 1B~C)。

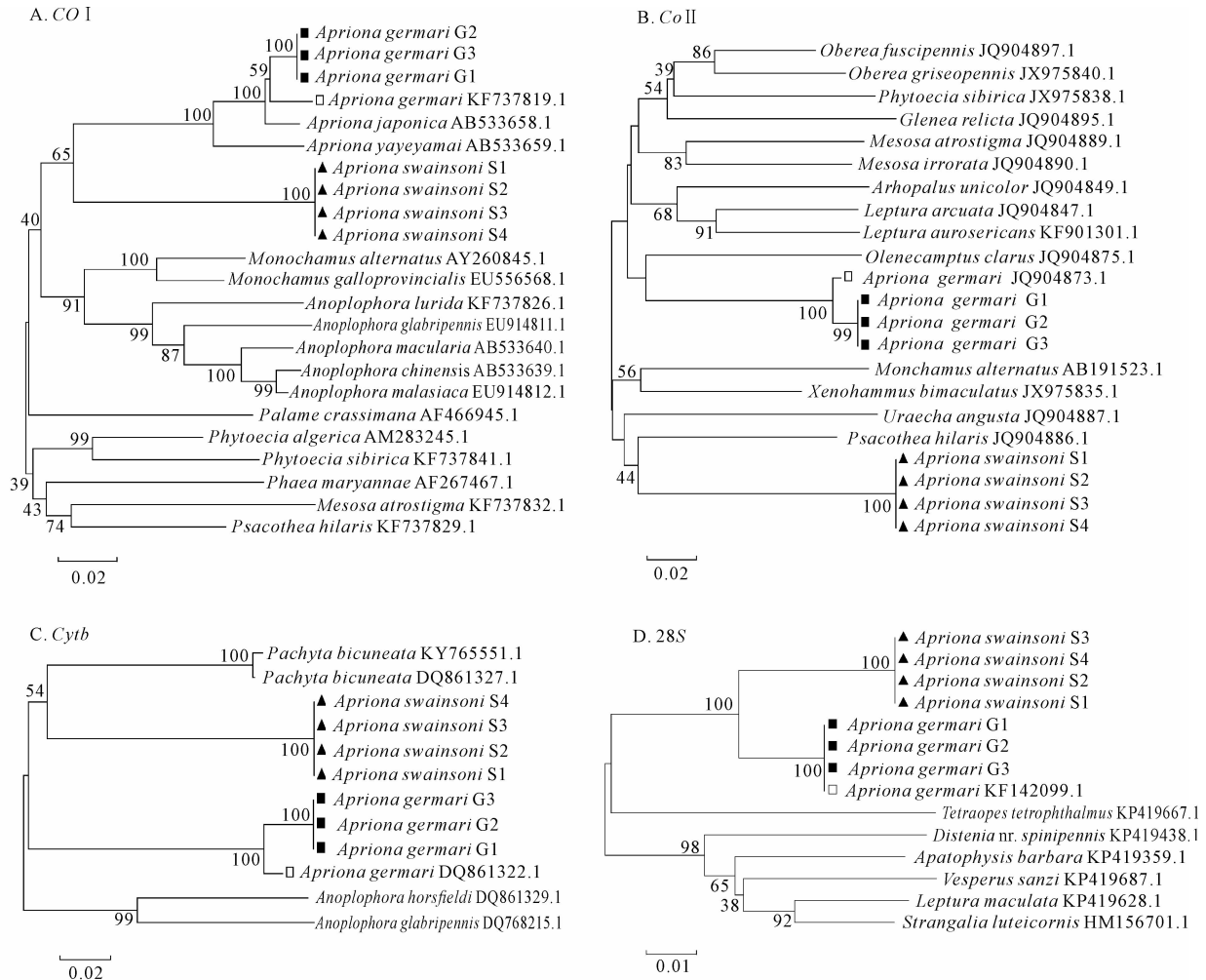


图 1 锈色粒肩天牛及天牛科其他昆虫基于 *CO I*、*CO II*、*Cytb* 和 28S 基因序列的分子进化关系

Figure 1 Molecular phylogenetic relationship of *A. swainsoni* and other insects of Cerambycidae based on *CO I*, *CO II*, *Cytb* and 28S gene sequences

3 结论与讨论

斗米虫等昆虫天然保健产品因其特有的功效，逐渐被大众熟知和接受，鉴于天牛幼虫形态学鉴别存在的不足之处，需要依靠分子生物学手段完善以提高天牛幼虫鉴别的准确性。相对于其他分子标记法，DNA 测序在种及以上高级分类阶元的分析结果更为准确直接，可作为一种有用的“分类”辅助工具^[15]。迄今为止，国内外已将多种线粒体基因和核基因广泛运用于昆虫的系统发育、遗传进化和物种分类等研究中^[32-37]。线粒体基因严格遵守母系遗传方式，进化速度适中，相对保守的同时又有足够的变异，特别适用于解决较低阶元的系统发育关系^[24, 38-39]，28S 基因则是真核生物染色体上编码核糖体大亚基的基因，在生物体内含量较大，在进化过程中较线粒体基因保守，尤其在高级分类阶元系统发育关系研究中应用广泛^[40-41]。

本研究的 3 种线粒体蛋白编码基因(*CO I*、*CO II* 和 *Cytb*)和 1 种核基因(28S)为昆虫分类的常用基因。锈色粒肩天牛的上述 4 种基因片段及其同源序列的序列信息分析，结果表明线粒体基因(*CO I*、*CO II* 和

Cytb)和核基因(28S)的组成结构等存在差异。3种线粒体基因同源序列的变异率比28S基因片段高,这与核基因较线粒体基因更为保守这一观点相符合^[40]。此外,3种线粒体基因同源序列表现出A和T碱基偏倚,颠换高于转换,而28S同源序列则相反(G和C碱基偏倚且转换高于颠换)。此次所选择分析的锈色粒肩天牛28S基因及其同源序列的碱基偏倚性与其他研究报道的天牛科28S基因相同,其碱基组成特点也与28S rDNA相符合^[40]。

不同物种,其分子分类适用的基因也存在差异,根据不同物种选择合适的基因十分关键。CHEN等^[39]以大蚜亚科Lachninae为研究对象,评估了3种线粒体基因(*CO I*、*CO II*和*Cytb*)作为DNA条形码的有效性,发现*CO II*基因较其他两者更合适于不同大蚜的鉴定,*Cytb*因其序列多样性高,是蚜虫种群遗传学研究的有效标记。杨晋英^[38]研究表明:*CO I*、*CO II*和*Cytb*基因适用于五倍子蚜分类,其分子聚类关系与形态学分类相一致。李成等^[42]研究表明:28S非常适合于旋毛虫*Trichinella spiralis*的分类鉴定及其分子进化关系的研究。本研究显示:利用*CO I*、*CO II*、*Cytb*和28S基因的通用性引物均能有效地扩增锈色粒肩天牛和桑天牛幼虫的目的片段。基于这4种基因序列构建的进化树亦都能以较高的置信值将锈色粒肩天牛幼虫单独聚成一支,与其他种的天牛区分开来,表明上述4种基因均可作为快速鉴别锈色粒肩天牛幼虫与桑天牛等其他天牛幼虫的分子参考依据。

总体而言,*CO I*、*CO II*、*Cytb*和28S这4种基因的进化树拓扑结构与传统分类结果基本相一致,但*CO II*和*Cytb*基因进化树其属级别的聚类稍有差别,其原因可能是本研究涉及的*CO II*和*Cytb*序列仅是该基因的部分序列,其所覆盖的信息还不够充足,可通过增加昆虫的目标基因序列数量或长度,以获得更为理想的系统进化树。

4 参考文献

- [1] 王艳平,温俊宝,秦中云.林业危险性有害生物锈色粒肩天牛[J].植物检疫,2006,20(3):168-170.
WANG Yanping, WEN Junbao, QIN Zhongyun. The forestry harmful pest-*Apriona swainsoni* [J]. *Plant Quarant*, 2006, 20(3): 168-170.
- [2] 王晓红,杨忠岐,唐艳龙,等.锈色粒肩天牛及其防治技术研究进展[J].中国森林病虫,2010,29(4):24-27.
WANG Xiaohong, YANG Zhongqi, TANG Yanlong, et al. Advances in research on the damage and control techniques of *Apriona swainsoni* [J]. *For Pest Dis*, 2010, 29(4): 24-27.
- [3] 刘桂华,唐燕平.锈色粒肩天牛与寄主树种关系的初步研究[J].林业科学,2002,38(3):106-113.
LIU Guihua, TANG Yanping. The relationships between *Apriona swainsoni* and its host trees [J]. *Sci Silv Sin*, 2002, 38(3): 106-113.
- [4] 卢希平,刘玉,尹淑艳,等.锈色粒肩天牛生物学观察[J].中国森林病虫,2005,24(4):11-13.
LU Xiping, LIU Yu, YIN Shuyan, et al. Observation on the bionomics of *Apriona swainsoni* [J]. *For Pest Dis*, 2005, 24(4): 11-13.
- [5] 刘海军,骆有庆,温俊宝,等.北京地区红脂大小蠹、美国白蛾和锈色粒肩天牛风险评价[J].北京林业大学学报,2005,27(2):81-87.
LIU Haijun, LUO Youqing, WEN Junbao, et al. Pest risk assessment of *Dendroctonus valens*, *Hyphantria cunea* and *Apriona swainsoni* in Beijing area [J]. *J Beijing For Univ*, 2005, 27(2): 81-87.
- [6] 孙丹萍,徐睿,梁铁旺,等.锈色粒肩天牛生态学特性研究[J].西北林学院学报,2016,22(5):114-116.
SUN Danping, XU Rui, LIANG Tiewang, et al. A study on ecological characteristics of *Apriona swainsoni* population [J]. *J Northwest For Univ*, 2016, 22(5): 114-116.
- [7] 田志超,徐华潮,洪沛,等.斗米虫人工培养的初步研究[J].浙江农业科学,2012,53(8):1159-1160.
TIAN Zhichao, XU Huachao, HONG Pei, et al. Primary research on artificial cultivation of *Apriona swainsoni* [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2012, 53(8): 1159-1160.
- [8] 张胜碧.斗米虫对小鼠毒性反应的实验研究[J].海峡药学,2013,25(2):29-31.
ZHANG Shengbi. Experimental study of the toxic effects of *Apriona swainsoni* on mice [J]. *Strait Pharma J*, 2013, 25(2): 29-31.
- [9] 王文辉,严员英,刘晓华,等.人工饲料对锈色粒肩天牛生长发育的影响研究[J].中国森林病虫,2017,36

(6): 26 – 28.

WANG Wenhui, YAN Yuanying, LIU Xiaohua, *et al.* Effects of artificial diets on growth and development of *Apriona swainsoni* [J]. *For Pest Dis*, 2017, **36**(6): 26 – 28.

[10] 叶苓, 林美熙, 黄泰康, 等. 虫类本草[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 162 – 163.

[11] 胡晓峰. 虫蛇药用巧治百病[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000: 10 – 13.

[12] 张凯, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 南京地区天牛幼虫分类研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, **36**(5): 102 – 108.

ZHANG Kai, JI Baozhong, LIU Shuwen, *et al.* Taxonomic study on the larvae of longicorn beetles in Nanjing [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2012, **36**(5): 102 – 108.

[13] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Royal Soc London Ser B Biol Sci*, 2003, **270**: 313 – 321.

[14] 江亚杰, 汪中明, 张涛, 等. 基于 DNA 条形码技术的储粮害虫碎片鉴定研究[J]. 中国粮油学报, 2017, **32**(8): 131 – 135.

JIANG Yajie, WANG Zhongming, ZHANG Tao, *et al.* Molecular identification of stored grain pest fragments by DNA barcoding [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2017, **32**(8): 131 – 135.

[15] SCHWARZBACH A E, RICKLEFS R E. The use of molecular data in mangrove plant research [J]. *Wetlands Ecol Manage*, 2001, **9**(3): 205 – 211.

[16] SCHINDEL D E, MILLER S E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, **435**(7038): 17.

[17] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, **3**: 294 – 299.

[18] SMITH M A, POYARKOV N A, HEBERT P D N. COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge [J]. *Mol Ecol Resour*, 2008, **8**: 235 – 236.

[19] KIM K G, HONG M Y, KIM M J, *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the yellow-spotted long-horned beetle *Psacothea hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) and phylogenetic analysis among Coleopteran insects [J]. *Mol Cells*, 2009, **27**(4): 429 – 441.

[20] 李枷霖. 皮蠹科 DNA 条码分类技术研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.

LI Jialin. *Classification Technique Research of DNA Barcode in Dermestidae* [D]. Suzhou: Soochow University, 2015.

[21] CORRÊA A S, VINSON C C, BRAGA L S, *et al.* Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae* [J]. *Bull Entomol Res*, 2017, **107**(1): 9 – 20.

[22] ANGELINI D R, JOCKUSCH E L. Relationships among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, **46**(1): 127 – 141.

[23] KIM C G, ZHOU H Z, IMURA Y, *et al.* Pattern of morphological diversification in the Leptocarabus ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduced from mitochondrial *ND5* gene and nuclear 28S rDNA sequences [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, **17**(1): 137 – 145.

[24] SEVCIK J, DAVID K, RULIK B. A new species of *Docosia* Winnertz from Central Europe, with DNA barcoding based on four gene markers (Diptera, Mycetophilidae) [J]. *Zookeys*, 2016, **549**(549): 127 – 143.

[25] 王琦琦, 陈丹丹, 唐光辉, 等. 核桃举肢蛾线粒体 *CO I* 和 *Cytb* 基因片段序列分析[J]. 西北林学院学报, 2016, **31**(1): 145 – 152.

WANG Qiqi, CHEN Dandan, TANG Guanghui, *et al.* Sequence analysis of the fragments of *CO I* and *Cytb* genes from *Atrijuglans hetaohei* [J]. *J Northwest For Univ*, 2016, **31**(1): 145 – 152.

[26] BARKER S C. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with ITS2 ribosomal RNA [J]. *J Parasitol*, 1998, **84**(5): 887 – 892.

[27] JI Yajie, ZHANG Dexing, HE Lijun. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates [J]. *Mol Ecol Resour*, 2003, **3**(4): 581 – 585.

[28] 陈光辉, 李焱, 刘东, 等. 玉米象 *Sitophilus zeamais* DNA 条形码研究[J]. 应用昆虫学报, 2018, **55**(3): 454 – 463.

- CHEN Guanghui, LI Yan, LIU Dong, *et al.* DNA barcoding of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) [J]. *Chin J Appl Entomol*, 2018, **55**(3): 454 – 463.
- [29] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, *et al.* Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 1994, **87**(6): 651 – 701.
- [30] 毛增辉, 郝家胜, 朱国萍, 等. 菜粉蝶线粒体基因组的全序列测定和分析[J]. 昆虫学报, 2010, **53**(11): 1295 – 1304.
- MAO Zenghui, HAO Jiasheng, ZHU Guoping, *et al.* Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae) [J]. *Acta Entomol Sin*, 2010, **53**(11): 1295 – 1304.
- [31] HANCOCK J M, TAUTZ D, DOVER G A. Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster* [J]. *Mol Biol Evol*, 1988, **5**: 393 – 414.
- [32] SCHIMITZ J, MORITZER F A. Sequence analysis of the D1 and D2 regions of 28S rDNA in the hornet (*Vespa crabro*) (Hymenoptera, Vespinae) [J]. *Insect Mol Biol*, 1994, **3**(4): 273 – 277.
- [33] SOTA T, BOCAK L, HAYASHI M. Molecular phylogeny and historical biogeography of the holarctic wetland leaf beetle of the genus *Plateumaris* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, **46**(1): 183 – 192.
- [34] SASAKAWA K, KUBOTA K. Phylogeny of ground beetles subgenus *Nialoe* (s. lat.) Tanaka (Coleoptera: Carabidae; genus *Pterostichus*): a molecular phylogenetic approach: original article [J]. *Entomol Sci*, 2009, **12**(3): 308 – 313.
- [35] YUJIE L, YARU Z, ZHENG Y W, *et al.* DNA barcoding, species-specific PCR for the identification of three stored-product pest species of genus *Palorus* (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *J Stored Prod Res*, 2018, **78**: 32 – 38.
- [36] BUENAVENTUR E, CÉSAR V C, WOLFF M, *et al.* DNA barcoding for identifying synanthropic flesh flies (Diptera, Sarcophagidae) of Colombia [J]. *Acta Trop*, 2018, **182**: 291 – 297.
- [37] ASHFAQ M, SABIR J S M, EL-ANSARY H O, *et al.* Insect diversity in the Saharo-Arabian region: revealing a little-studied fauna by DNA barcoding [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(7): e0199965. doi: 10.1371/journal.pone.019996.
- [38] 杨晋英. 五倍子蚜—新种的形态学及分子鉴定[D]. 太原: 山西大学, 2012.
- YANG Jinying. *Morphological and Molecular Identification of a New Species of Rhus Gall Aphids* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012.
- [39] CHEN Rui, JIANG Liyun, QIAO Gexia. The effectiveness of three regions in mitochondrial genome for aphid DNA barcoding: a case in Lachninae [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e46190. doi: 10.1371/journal.pone.0046190.
- [40] 张健. 吉林省天牛科昆虫分类学研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2011.
- ZHANG Jian. *Taxonomic Study on the Cerambycidae in Jilin Province* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2011.
- [41] 魏子涵. 天牛核糖体基因 18S rDNA 和 28S rDNA 的分子特征研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- WEI Zihan. *Molecular Characteristics Research of 18S Ribosomal DNA and 28S Ribosomal DNA of Longicorn Beetles (Coleoptera: Cerambycidae)* [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University.
- [42] 李成, 魏颖, 袁金钱, 等. 旋毛虫 28S rRNA 基因片段的克隆及其在分类学上的应用[J]. 东北农业大学学报, 2011, **42**(9): 80 – 83.
- LI Cheng, WEI Ying, YUAN Jinqian, *et al.* Cloning and application of 28S rRNA gene fragment of *Trichinella spiralis* on taxonomy [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2011, **42**(9): 80 – 83.