



**HAL**  
open science

# Approches génomiques pour la biodétection d'insectes invasifs forestiers

Loïs Veillat

► **To cite this version:**

Loïs Veillat. Approches génomiques pour la biodétection d'insectes invasifs forestiers. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2024. Français. NNT : 2024ORLE1012 . tel-04622319

**HAL Id: tel-04622319**

**<https://theses.hal.science/tel-04622319>**

Submitted on 24 Jun 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES et CHIMIE du VIVANT

UR0633 Zoologie Forestière (URZF) – INRAE CENTRE-VAL DE LOIRE

**THÈSE** présentée par :

**Loïs VEILLAT**

Soutenue le : **19 mars 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Biologie**

### Approches génomiques pour la biodétection d'insectes invasifs forestiers

#### THÈSE co-dirigée par :

Mme. ROUX Géraldine

Professeure des universités, Université d'Orléans, France

M. LOPEZ-VAAMONDE Carlos

Chargé de recherches, INRAE Centre-Val de Loire, France

#### RAPPORTEUR.TRICE :

Mme. KERDELHUE Carole

(**Présidente de jury**) Directrice de Recherche, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP)

M. BRUSTEL Hervé

Professeur, Ecole d'ingénieur de Purpan, France

#### JURY :

Mme. KERDELHUE Carole

(**Présidente de jury**) Directrice de Recherche, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP)

M. BRUSTEL Hervé

Professeur, Ecole d'ingénieur de Purpan, France

Mme. BANKHEAD Stéphanie

Maîtresse de conférences, Université d'Orléans, France

M. CHEVIGNON Germain

Chercheur, IFREMER La Tremblade, France

Mme. ROUX Géraldine

Professeure des universités, Université d'Orléans, France

M. LOPEZ-VAAMONDE Carlos

Chargé de recherches, INRAE Centre-Val de Loire, France

#### INVITÉ :

M. BOYER Stéphane

Professeur, Université de Tours, France



## Avant-Propos

Cette thèse a été financée par la région Centre-Val de Loire ainsi que par le projet européen HOMED et effectuée au sein de l'Unité de Recherche de Zoologie Forestière (URZF), du centre de recherche Val de Loire, de l'Institut de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation, et l'Environnement (INRAE). Elle s'est déroulée sous la direction de Géraldine ROUX, Professeure de l'Université d'Orléans, avec la co-direction de Carlos LOPEZ-VAAMONDE, chargé de recherche INRAE (URZF) et le co-encadrement de par Stéphane BOYER, Professeur de l'Université de Tours (IRBI UMR Université de Tours – CNRS).







## *Remerciements*

Nous y voilà ! Après trois années dans cette aventure qu'est la thèse, à passer par beaucoup d'émotions aussi diverses que variées. Beaucoup de stress, de nuits blanches et de remises en question, mais aussi (et heureusement) beaucoup de positif ! J'ai eu la chance de côtoyer des collègues exceptionnels dont le soutien m'a permis d'avancer au mieux et je vous en remercie.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma sincère gratitude envers les rapporteurs et les membres de mon jury de thèse pour leur engagement et pour leur précieuse contribution lors de l'évaluation de mon travail de recherche : Carole Kerdelhué et Hervé Brustel en tant que rapporteurs, puis Stéphanie Bankhead et Germain Chevignon en tant qu'examineurs.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Géraldine Roux. Merci pour ta confiance, pour la liberté que tu m'as laissé tout au long de ces trois années tout en restant disponible pour m'aider lorsque nécessaire et tout particulièrement dans la dernière ligne droite ! Merci également à mon co-directeur, Carlos Lopez-Vaamonde, pour ta confiance et pour la liberté que tu m'as laissé. Un grand merci également à Stéphane Boyer qui a été d'une grande aide tout au long de ces trois années. Merci pour ta grande disponibilité malgré la distance, merci pour les multiples relectures de mes productions, pour tes conseils toujours d'une grande pertinence. Je vous remercie également, Marina et toi, pour m'avoir donné de votre temps à plusieurs reprises, parfois sur plusieurs grosses journées d'affilées pour me former à la construction des librairies pour le MinION.

Un immense merci à tous les agents de l'URZF, travailler à vos côtés a toujours été un plaisir pour moi. Un merci tout particulier à toi Marie-Anne, pour m'avoir conseillé et remotivé dans les moments les plus difficiles. Merci également de m'avoir permis de faire la formation scolytes en Floride où j'ai eu le plaisir de rencontrer Jean-Claude Streito avec qui je me suis tout de suite très bien entendu, c'était une première pour moi de partir aussi loin tout seul, et l'expérience était géniale ! Merci à toi et à Philippe pour votre confiance pour la garde de Wasabi, avec qui j'ai fini par tisser

quelques liens (de mon côté du moins) ! Merci à Marie et François d'avoir toujours répondu présent lorsque j'étais perdu, autrement dit dès que je devais me pencher sur de l'administratif, malgré l'énorme quantité de travail que vous deviez gérer en même temps. Je te remercie Alain, pour ton expertise et tes nombreux conseils, merci aussi pour les quelques centaines de petites bêtes fournies qui m'ont permis de réaliser ma thèse. Merci Mathieu pour ta constante sympathie, ainsi que pour m'avoir ramené avec toi à l'escrime, ce qui m'a permis de me changer les idées. Merci Jérôme pour toutes ces discussions, cours d'histoire, contrepèteries et blagues, autour d'un café ! Merci Béatrice de m'avoir formé aux techniques de laboratoire parce que franchement, je partais de loin... Merci également à Christelle et toi de m'avoir accompagné lors du déplacement au Portugal. Je ne sais pas ce que j'aurai fait sans vous lors de ce retour mouvementé, je crois que j'y serai encore... Merci Emmanuelle pour avoir toujours répondu à mes questions (pas toujours pertinentes) ou lors de mes appels à l'aide au laboratoire. Merci pour tes conseils et pour ton soutien lorsque j'en avais besoin. Merci Benoit, pour ta constante bonne humeur et pour le pique-nique dans ton jardin l'été dernier autour d'un feu ! J'en garde un très bon souvenir ! Merci Patrick pour tes encouragements et ton soutien au cours de ces trois années, nos discussions dans le bureau vont me manquer. Merci Régis pour ton aide lorsque j'avais besoin d'être dépanné informatiquement. Merci Claudine pour ton humour, ton soutien et ta constante bonne humeur ! Tu es partie à la retraite vers la moitié de ma thèse, je me sentais bien seul dans les labos après ton départ ! Merci à Louis et Alexis qui ont également quitté le navire durant ma thèse. Merci pour la découverte des pièges à phéromones sur le terrain et pour les multiples bestioles confiées pour mes analyses. Merci également à Sylvie, Daniel, Cindy, Asma et François-Xavier avec qui les échanges étaient plus rares, mais toujours plaisants.

Merci à Julie, Benjamin, Thierry, Anaïs, Emma, Ismaël pour tous les bons souvenirs. J'espère que vous vous plaisez dans vos nouvelles vies.

Un grand merci à Jérémy Gauthier pour son aide et ses nombreux conseils qui m'ont permis de gagner un temps précieux lors des analyses RADseq.

J'exprime ma profonde gratitude à tous les stagiaires que j'ai eu plaisir à encadrer pendant ces trois années : Juliette, Mathieu, Clément, Camille. Cela a toujours été une expérience enrichissante pour moi et je suis ravi que nous ayons gardé contact. J'espère que j'ai pu vous apprendre autant que vous m'avez appris et je vous souhaite le meilleur pour la suite. Notamment Juliette qui a décidé également de se lancer dans cette aventure qu'est la thèse, bon courage à toi ! Une grosse pensée également aux autres stagiaires/CDD que je n'ai pas eu le plaisir d'encadrer mais avec qui j'ai toujours eu de très bons contacts : Maxime, Alexandre, Emma, Sarannah, Clémence, Tess, Valentine, ... Bon courage à vous pour la suite !

Merci Clément, ta venue dans l'unité m'a fait un bien fou ! Garde précieusement ce petit (grand ?) brin de folie qui t'anime et qui a toujours réussi à me faire rire même dans les moments les plus compliqués à gérer. J'en profite pour remercier Lisette avec qui la barrière de la langue limitait grandement nos échanges, mais dont le sourire et la constante bonne humeur étaient les meilleurs des remèdes à bien des maux. Je vous souhaite le meilleur à tous les deux. Merci Elodie, toi qui as partagé l'aventure de la thèse en même temps que moi. C'était un grand soulagement de pouvoir discuter et confier ses craintes à quelqu'un dans la même situation que soi. Je te félicite une nouvelle fois pour ta thèse ! Bonne continuation pour la suite. Merci Aurore, j'aurai passé de très bons moments avec toi aussi ! Merci pour le partage de ta passion pour les oiseaux, merci pour ton oreille attentive lorsque j'en avais besoin et merci pour les nombreux moments passés à rigoler. Thank you Yuan yuan for your profound kindness and for introducing me to your culture, which is quite different from ours, especially when it comes to food ! I discovered foods that I didn't even know existed. I wish you good luck for the rest of your PhD, continued success, and I would also like to congratulate you on your impressive progress in English.

Un grand merci à mes amis Clermontois : Evan, Karim, Pauline, Aline, Thibaud avec qui j'ai passé mes plus belles années. Désolé pour mes longs moments de silence... Cela ne change rien au fait que vous comptez énormément pour moi. Vous le savez.

Pour finir, j'adresse un grand merci à mes parents et mon petit-frère. Merci pour vos encouragements et vos conseils, merci d'avoir toujours été là notamment dans les moments les plus compliqués... Enfin, merci à tous les membres de ma famille, qui m'ont toujours encouragé même si mon domaine d'étude doit vous paraître bien abstrait !

Bonne lecture à celles et ceux qui auront le courage d'aller plus loin !



# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>18</b>
I. Les écosystèmes forestiers : Des écosystèmes aussi précieux que fragiles. 18	
I.1 Les forêts en tant qu'écosystèmes essentiels .....	18
I.2 Des forêts menacées.....	18
I.3 Le réchauffement climatique et les invasions par des coléoptères xylophages : des liens étroits .....	24
II. Les invasions biologiques, un processus complexe aux conséquences dévastatrices.....	24
II.1 Etapes et management d'une invasion biologique .....	25
II.2 Les conséquences des invasions biologiques.....	34
III. Approches de détection et d'identification des xylophages invasifs .....	36
III.1 Méthodes de détection .....	36
III.2 Identification morphologique.....	37
III.3 Le barcoding moléculaire .....	38
III.4 Le métabarcoding.....	40
IV. Objectifs de la thèse et plan du manuscrit.....	42
<b>Chapitre I : Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species</b> .....	<b>44</b>
<b>Chapitre II : DNA metabarcoding, an efficient way to detect non-native cerambycid beetles in trapping collections ?</b> .....	<b>46</b>
<b>Chapitre III : Librairies de référence de codes-barres de cérambycidés capturés en Europe à l'aide de pièges multi-phéromonaux.</b> .....	<b>48</b>
I. Introduction .....	49
II. Matériel et méthode .....	51
II.1 Echantillonnage et traitement des échantillons.....	58
II.2 Récupération et filtrage qualité des données publiques .....	59
II.3 Analyses des données barcoding.....	61
III. Résultats .....	61

III.1 BINs partagés et espèces paraphylétiques .....	62
III.2 Présentation de la dataset post-nettoyage .....	62
III.3 Performance du barcoding moléculaire .....	63
III.4 Analyse des séquences.....	65
IV. Discussion.....	66
<b>Chapitre IV : Population genetic structure of <i>Xylotrechus stebbingi</i> along the north Mediterranean basin.....</b>	<b>73</b>
I. Introduction .....	74
II. Materials and methods.....	77
II.1 Taxon sampling and DNA extraction .....	77
II.2 RAD sequencing.....	78
II.3 SNP calling and filtering .....	78
II.4 Population genetic analysis .....	79
II.5 Phylogenetic analysis .....	79
III. Results .....	79
III.1 Data processing.....	79
III.2 Genetic diversity analysis .....	80
III.3 Population structure.....	80
III.4 Geographical population structure with K=2 and K=4 scenarios .....	82
III.5 Phylogenetic reconstruction .....	85
IV. Discussion.....	87
V. Conclusion .....	88
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>91</b>
I. Contextualisation et interprétation des résultats .....	93
I.1 Capture et conservation des insectes : optimiser la qualité de l'ADN.....	93
I.2 Métabarcoding et séquençage haut débit MinION : une technologie portable et en temps réel.....	95
I.3 Les bases de données : piliers des analyses moléculaires .....	96
I.4 Outils génomiques pour le traçage des invasifs .....	98
II. Perspectives : vers des détections de plus en plus innovantes ? .....	98
II.1 Intelligence artificielle et apprentissage automatique .....	98



II.2 L'ADN environnemental (eDNA) et extractions non-destructrices .....	99
III. Conclusion .....	101
<b>Références .....</b>	<b>102</b>



## Productions scientifiques

### Articles dans des revues internationales

- **Veillat, L.**, Boyer, S., Querejeta Coma, M., Magnoux, E., Roques, A., Lopez-Vaamonde, C., & Roux, G. (2023) [DNA metabarcoding, an efficient way to detect non-native cerambycid beetles in trapping collections ?](#) *Neobiota*. <https://doi.org/10.3897/arphapreprints.e109313> (soumise le 6 décembre 2023)
- Roques, A., Ren, L., Rassati, D., Shi, J., Akulov, E., Audsley, N., Auger-Rozenberg, M.-A., Avtzis, D., Battisti, A., Bellanger, R., Bernard, A., Bernadinelli, I., Branco, M., Cavaletto, G., Cocquempot, C., Contarini, M., Courtial, B., Courtin, C., Denux, O., **Veillat, L.**, ... Millar, J. G. (2023). [Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species.](#) *NeoBiota*, 84, 169–209. <https://doi.org/10.3897/neobiota.84.91096>

### Articles en préparation

- [Reference libraries of barcodes of cerambycids captured in Europe using multi-pheromonal traps](#) (non-definitive title). **Veillat, L.**, Courtial, B., Magnoux, E., Boyer, S., Roques, A., Roux, G., Lopez-Vaamonde, C. (non-definitive list of authors).
- [Population genetic structure and phylogeography of \*Xylotrechus stebbingi\* along the north Mediterranean basin](#) (non-definitive title). **Veillat, L.**, Courtial, B., Gauthier, J., Boyer, S., Roques, A., Lopez-Vaamonde, C., Roux, G. (non-definitive list of authors).

## Communications lors de conférences et symposiums

### Congrès/Colloques nationaux

- Doctorales de la forêt (Du 4 au 5 avril 2023 à Blois (45)) – Présentation orale. [Le métabarcoding pour la détection et l'identification de Cerambycides invasifs](#)
- Groupe des entomologistes Forestiers Francophones (GEFF du 26 au 29 septembre 2022 à Lamotte-Beuvron (45)) – Présentation orale. [Le métabarcoding pour la détection et l'identification de Cerambycides invasifs](#).
- Groupe des entomologistes Forestiers Francophones (GEFF du 28 au 30 septembre 2021 à Arcachon (33)) – Présentation orale. [Le métabarcoding pour la détection et l'identification d'insectes invasifs](#).
- Journées scientifiques annuelles 2020 – Présentation orale. [Approche génomique pour la biosurveillance des insectes forestiers](#).

### Congrès/Colloques internationaux

- HOMED final annual meeting (12 au 14 septembre 2022 à Lisbonne, Portugal) -Présentation orale. [Biosurveillance for invasive xylophagous beetles using metabarcoding with nanopore MinION sequencing](#).
- International Union of Forest Research Organizations (IUFRO du 6 au 9 septembre 2022 à Lisbonne, Portugal) – Poster. [Biosurveillance for invasive xylophagous beetles using metabarcoding with nanopore MinION sequencing](#).
- XXVI International Congress of Entomology (ICE du 17 au 22 juillet 2022 à Helsinki, Finlande) – Présentation orale. [Detection of invasive insectes using metabarcoding technologies](#).
- Environmental and Agronomical Genomics Symposium (27 au 29 Octobre 2021 à Tours, France) – Poster. [Biosurveillance for invasive xylophagous beetles using a DNA metabarcoding approach](#).
- Webinar IFOPE du 12 octobre 2021 – Présentation orale. [Metabarcoding for the detection and identification of invasive Cerambycids](#).

## (Co)encadrement d'étudiants

- Juliette Carpentier - 2021 (2 mois) – Master 1 Biodiversité Ecologie Evolution parcours Patrimoine Naturel et Biodiversité, Université de Rennes 1. [Dispositif de piégeages génériques et identification par barcode moléculaire pour la détection précoce des Cérambycides exotiques.](#)
- Mathieu Plateau – 2022 (1 mois) – Licence 3 Science de la vie parcours BOPE. [Capacités de vol des Agrilus et génétique des Cérambycides.](#)
- Clément Beaumont – 2022 (1 mois) - Licence 3 Science de la vie parcours BOPE. [Capacités de vol des Agrilus et génétique des Cérambycides.](#)
- Camille Meunier – 2023 (2 mois) – Master 1 Biologie intégrative et changements globaux, Université d'Orléans. [Métabarcoding de Cérambycides invasifs : le problème de la conservation de le l'ADN.](#)

## Missions d'enseignements

- Travaux pratiques – 24 heures – [Licence 3 Biologie évolutive](#), Université d'Orléans.
- Travaux dirigés – 16 heures – [Licence 3 Biologie évolutive](#), Université d'Orléans.

Mes contributions dans les différents chapitres présentés dans mon manuscrit de thèse (Vert = Contribution majeure / Jaune = Contribution secondaire / Gris foncé = Non contribué).

<u>Chapitre de la thèse</u>	<u>Titre publication associée</u>	<u>Conception</u>	<u>Travail de terrain et laboratoire</u>	<u>Traitement des données</u>	<u>Analyses bioinformatiques</u>	<u>Interprétations</u>	<u>Ecriture</u>
<u>Chapitre 1</u>	Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species						
<u>Chapitre 2</u>	DNA metabarcoding, an efficient way to detect non-native cerambycid beetles in trapping collections ?						
<u>Chapitre 3</u>	Librairies de référence de codes-barres de cérambycidés capturés en Europe à l'aide de pièges multi-phéromonaux.						
<u>Chapitre 4</u>	Population genetic structure and phylogeography of <i>Xylotrechus stebbingi</i> along the North Mediterranean basin.						

---

# Introduction générale

---

## I. Les écosystèmes forestiers : Des écosystèmes aussi précieux que fragiles.

### I.1 Les forêts en tant qu'écosystèmes essentiels

L'état et la conservation des forêts est une préoccupation majeure étant donné leur importance pour la conservation de la biodiversité mais également parce que les forêts fournissent un large éventail de services écosystémiques primordiaux. Parmi ces services, nous pouvons citer la régulation du climat. En effet, les forêts sont des réservoirs importants de carbone puisqu'elles sont responsables de l'absorption de 30% des émissions anthropiques de gaz à effet de serre, et limitent donc les impacts du changement climatique (Pan et al. 2011; Mackey et al. 2015). Les forêts permettent également l'approvisionnement et la purification de l'eau, la pollinisation, la filtration de l'air, la fourniture de bois de chauffage ou de charbon de bois pour 2,4 milliards de personnes (Thompson et al. 2011; Brockerhoff et al. 2013 ; Decocq et al. 2016 ; Liang et al. 2016 ; Mori et al. 2017; Anon 2020). Elles sont également le plus important réservoir mondial de biodiversité terrestre avec 10% de sa superficie mondiale consacrée à la conservation de la biodiversité (Anon 2020). Enfin, les forêts ont également une importance sociale, culturelle, voire spirituelle ainsi que des bénéfices sur la santé mentale et physique des populations humaines (Marselle et al., 2021; Foo, 2016).

Lorsque les forêts subissent un stress important, les processus de rétablissement et de régénération sont lents, entraînant une diminution importante et quasi-permanente de leur capacité à assurer les services mentionnés précédemment.

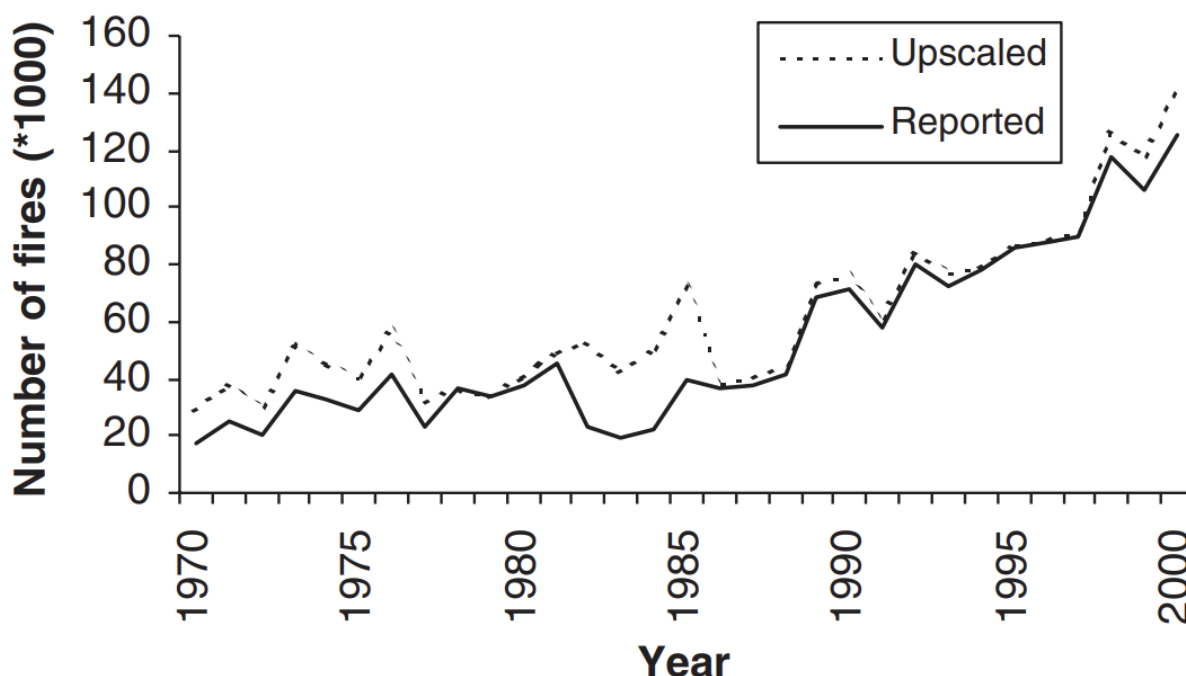
### I.2 Des forêts menacées

Les écosystèmes forestiers peuvent être exposés à diverses perturbations pouvant nuire à leur santé et à leur intégrité. Ces perturbations sont ici définies comme

tout facteur biotique ou abiotique qui diminue la vigueur et la productivité des forêts (Anon 2020).

### I.2.1 Facteurs abiotiques

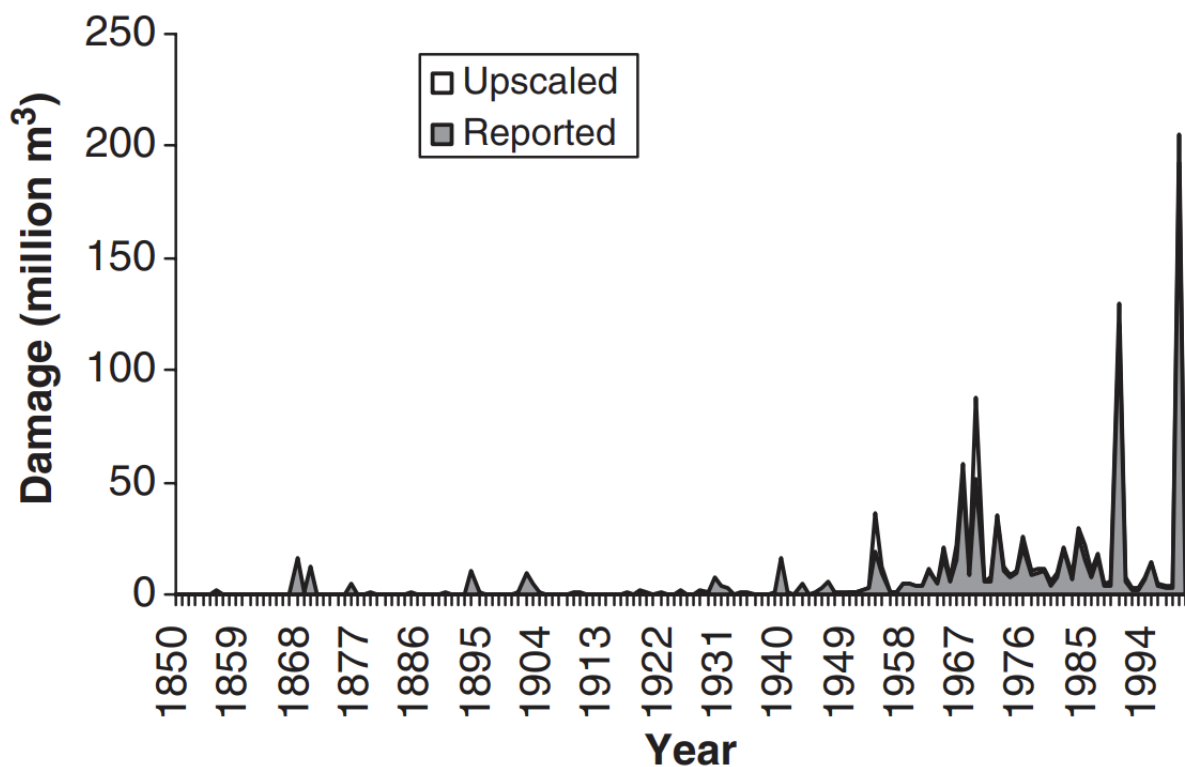
Les incendies dévastateurs sont le plus souvent associés à des facteurs météorologiques particuliers tels qu'une absence de précipitations, des vents violents, une faible humidité et des températures élevées (Anon 2020). On observe au cours des dernières années d'importants incendies associés à des vagues de chaleur ayant causé d'importants dommages : au Canada en 2016, au Chili en 2017, en Australie en 2019 et 2020, en France en 2022, en Grèce en 2023, etc... Le nombre d'incendies de forêts montre une nette augmentation, passant d'une moyenne d'environ 40.000 incendies par an dans les années 1970 à plus de 95.000 dans les années 1990 (**Figure 1**). Ces incendies ont des impacts considérables au niveau mondial pouvant entraîner des pertes humaines, d'habitats, de biodiversité, de production et de productivité ainsi que la dégradation des paysages. On estime que 98 millions d'hectares de forêts ont été impactés par des incendies en 2015 (Anon 2020).



**Figure 1** - Nombre annuel d'incendies de forêt signalés dans les pays européens (ligne pointillée) et étendu à l'ensemble de l'Europe (ligne pleine) pour 1970-2000 (tiré de Schelhaas et al. 2003).



Les événements météorologiques extrêmes comme les sécheresses, la neige, les tempêtes, etc. sont également des facteurs influant sur la santé des forêts. On observe notamment une augmentation du taux de mortalité des arbres associées à la sécheresse et au réchauffement climatique dans le monde entier, et ce, quel que soit le biome forestier (Senf et al., 2020). En ce qui concerne les épisodes neigeux, ce sont majoritairement les régions de haute latitude et / ou de haute altitude qui sont concernées. On estime qu'en Europe les dommages causés par la neige varient entre 1 et 4 millions de m<sup>3</sup> de bois par an (Schelhaas et al. 2003). Les orages / tempêtes restent la cause majoritaire des dégâts forestiers (53% des volumes de bois endommagés) liés aux événements météorologiques (Schelhaas et al. 2003). Le réchauffement climatique joue encore une fois un rôle dans l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des tempêtes (**Figure 2**) (Schelhaas et al. 2003).



**Figure 2** - Volumes de bois endommagés par les tempêtes, tels que rapportés dans les pays européens pour la période 1850-2000 et mis à l'échelle pour l'ensemble de l'Europe pour la période 1950-2000 (tiré de Schelhaas et al. 2003)

### I.2.2 Maladies et pathogènes

De nombreuses maladies menacent les forêts. Ces maladies sont provoquées par des bactéries, des champignons, des phytoplasmes ou des virus. Leur impact

s'accroît au fil des années en raison de la propagation des agents pathogènes, de la pollution et du changement climatique (Stenlid and Oliva 2016). De tels agents pathogènes ont pu dans le passé provoquer l'extinction d'espèces d'arbres de haute valeur écologique, comme le châtaignier d'Amérique, décimé par le champignon pathogène *Cryphonectria parasitica* (Rigling and Prospero 2018).

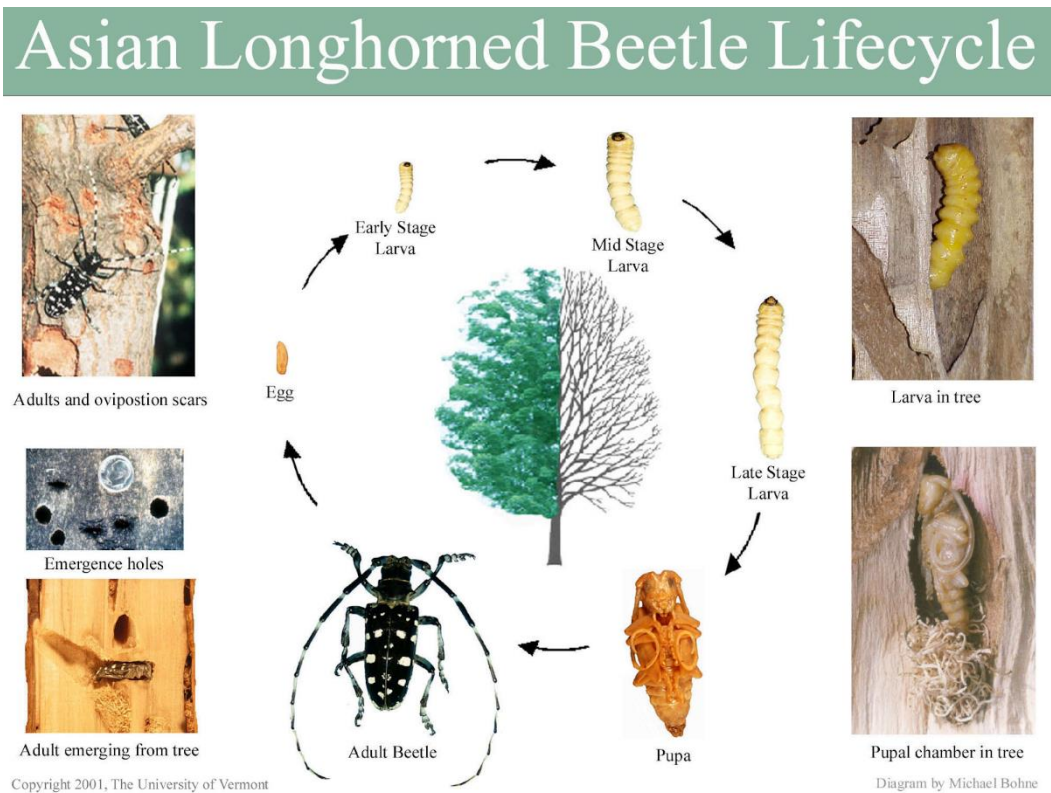
### I.2.3 Les insectes xylophages

L'augmentation des échanges intercontinentaux sont à l'origine d'une accélération des invasions, parmi lesquels les insectes xylophages, se développant dans le bois, figurent en très bonne place. Certains de ces insectes xylophages peuvent affecter grandement les environnements envahis et générer des coûts de gestion annuels extrêmement élevés (Kenis et al. 2009).

Au sein des insectes xylophages aux impacts dévastateurs, les scolytes font partie de ceux pouvant causer des dommages considérables aux forêts. Parmi les plus connus, nous pouvons citer *Dendroctonus ponderosae* et *Ips typographus* qui sont particulièrement destructeurs (Jeger et al., 2017 ; Musso et al., 2022). Ces ravageurs s'attaquent principalement aux arbres affaiblis ou stressés en creusant des galeries sous l'écorce, perturbant ainsi la circulation de la sève et pouvant conduire à la mort de l'arbre. Les infestations massives peuvent entraîner la mort de vastes étendues de forêts, affectant l'écosystème et entraînant des répercussions économiques majeures (Biedermann et al., 2019).

Dans cette thèse, nous nous focalisons sur les cérambycides. Cette famille est l'une des plus riches en espèces chez les coléoptères (environ 37.000 espèces connues à travers le monde réparties dans plus de 5.000 genres) avec une diversité écologique importante (Yotkham et al., 2021). A l'état larvaire, les cérambycides sont phytophages : beaucoup sont strictement xylophages et se développent dans les plantes ligneuses (**Figure 3**). Les adultes de nombreuses espèces se nourrissent plutôt de nectar et de pollen, tandis que d'autres, plus rares, se nourrissent de l'écorce des cimes des arbres (Kariyanna et al., 2017). Ils jouent un rôle écologique crucial, en particulier dans les écosystèmes forestiers où ils constituent l'un des principaux groupes de décomposeurs de la matière organique morte (Tavakilian et al., 1997). De

plus, les cérambycides adultes jouent un rôle dans la pollinisation de nombreuses espèces herbacées, d'arbustes, d'arbres et constituent une ressource alimentaire importante pour de nombreuses espèces de vertébrés (Ślipiński & Escalona 2016 ; Wang 2017 ; Haddad et al. 2018).



**Figure 3** - Cycle de vie général des cérambycides (d'après Michel Bohne, modifié de <http://www.ndinvasives.org/>) : Les œufs sont pondus dans des crevasses du bois ou sous l'écorce des arbres. Après l'éclosion, les larves, qui sont xylophages, creusent des galeries dans le bois, se nourrissant de la matière ligneuse pendant leur croissance. Cette phase larvaire peut durer de plusieurs mois à plusieurs années selon les espèces et les conditions environnementales. Après cette plus ou moins longue période, les larves se nymphosent à l'intérieur du bois. Les adultes émergent ensuite du bois, souvent en laissant un trou rond ou ovale.

La famille des cérambycides regroupe également des espèces catégorisées comme des ravageurs importants dans le monde entier (Brockhoff et al. 2006). Les larves peuvent avoir une longue durée de vie et, lorsqu'elles sont dissimulées à l'intérieur du bois peuvent être facilement transportées via le commerce international (via les matériaux d'emballage en bois, les palettes ou encore via le transport d'arbres

ornementaux) (Haack., 2017). Par conséquent, les cérambycidés font partie des insectes xylophages les plus régulièrement interceptés aux points d'entrée des pays importateurs de bois, avec de nombreux cas d'introductions accidentelles (Brockhoff et al., 2006). Le cérambycide *Anoplophora glabripennis* en est un parfait exemple en raison de ses multiples introductions à travers le monde en dehors de son aire native (Javal et al., 2019) (**Encadré 1**).

#### **Encadré 1 – Présentation d'*Anoplophora glabripennis***

*A. glabripennis* (**Figure 4**) est un ravageur originaire de la Chine continentale et de la péninsule coréenne (Wang et al. 2023). Cette espèce polyphage (avec une préférence pour diverses espèces de feuillus comme les érables, les peupliers et les ormes) s'attaque plutôt aux arbres en hauteur ce qui rend sa détection difficile (Haack et al. 2010).



**Figure 4 - Photo d'*Anoplophora glabripennis* prise par Pierre Zagatti**

De 1996 à 2021, on comptabilise 60 établissements d'*Anoplophora glabripennis* en dehors de son aire de répartition d'origine dont 17 en Amérique du Nord et 38 en Europe. En décembre 2020, environ la moitié de tous les établissements détectés dans le monde ont été éradiqués avec succès à l'aide de moyens parfois très coûteux (Wang et al. 2023). Aux Etats-Unis par exemple, entre 1996 et 2013, le coût des campagnes d'éradication menées contre *A. glabripennis* a été estimé à plus de 537 millions de dollars (Haack, 2017). Au Canada, en 2003, environ 27,400 arbres ont été abattus après la découverte d'un individu dans une zone d'entrepôt commercial.

### **I.3 Le réchauffement climatique et les invasions par des coléoptères xylophages : des liens étroits**

L'augmentation des températures induites par le réchauffement climatique a permis à des espèces exotiques (tout particulièrement des espèces originaires des régions au climat chaud et humide comme les pays tropicaux) de se développer dans des régions où elles n'étaient auparavant pas capables de prospérer à cause de températures trop froides (Walther et al. 2009; Kirkendall et Faccoli 2010). Le changement climatique peut également entraîner des conséquences sur les impacts que les espèces exotiques causent dans le nouvel environnement envahi, affectant par exemple la résistance des écosystèmes indigènes aux agressions extérieures (Walther et al. 2009). Ainsi, les invasions des organismes xylophages peuvent augmenter la probabilité, l'étendue, et la gravité des incendies de forêts (Hicke et al., 2012). De la même manière, les hausses des températures induites par le réchauffement climatique augmentent souvent le stress des arbres, ce qui peut les pousser au-delà des seuils physiologiques critiques pour leur survie et augmente ainsi leur sensibilité aux insectes forestiers, tels que les scolytes (Raffa et al., 2008). Ces affaiblissements peuvent en plus amener les plantes stressées ou mourantes à émettre un ensemble de composés volatils attirant fortement certaines espèces de coléoptères xylophages, augmentant ainsi leur exposition aux ravageurs (Kelsey and Joseph 2001).

## **II. Les invasions biologiques, un processus complexe aux conséquences dévastatrices**

Depuis des siècles, les activités humaines permettent le transport, volontaire ou non, de nombreuses espèces. Cette tendance s'est accrue en fréquence et en quantité (Seebens et al., 2017). Cela a eu pour conséquence une augmentation des invasions biologiques et aujourd'hui tous les continents et toutes les mers du monde abritent des espèces exotiques, tous les biomes et habitats terrestres sont également concernés (Turbelin et al., 2017; Kuebbing et al., 2022). On observe des taux d'invasion étroitement liés à la mondialisation croissante et la fréquence, l'ampleur et les impacts des invasions biologiques s'intensifient à l'échelle mondiale (Pyšek et al. 2020).

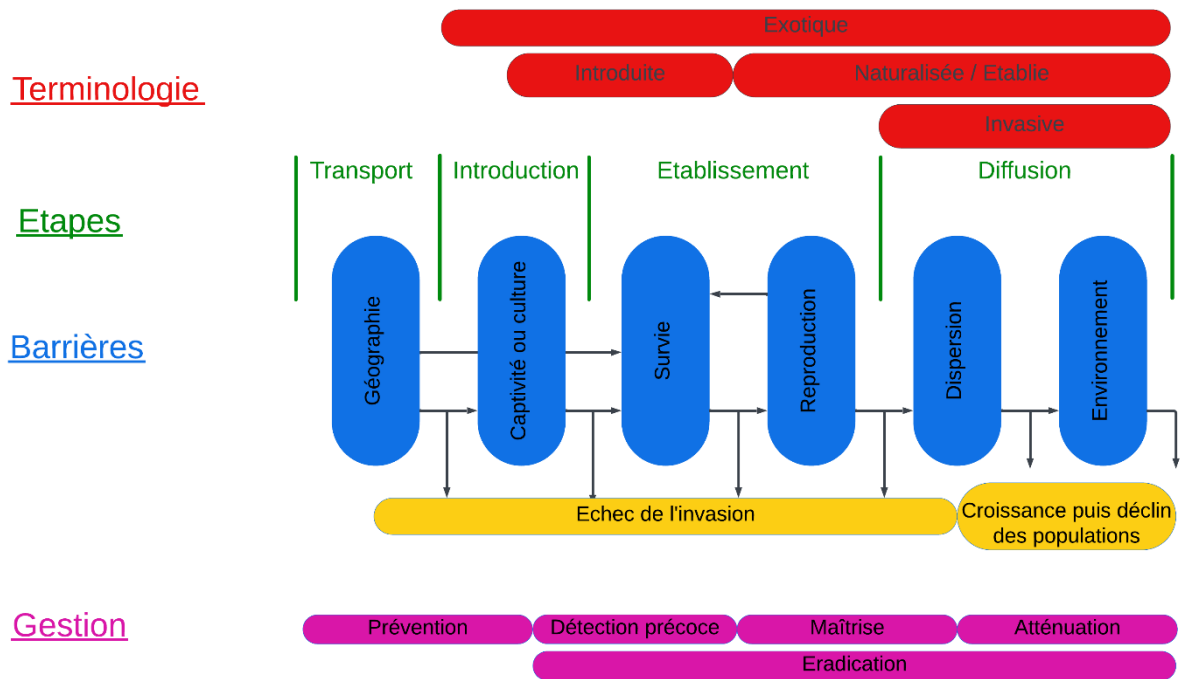
La gestion de ce nombre croissant d'Espèces Exotiques Envahissantes (EEE) est un défi majeur du XXI<sup>ème</sup> siècle (Robertson et al., 2020). D'autant plus que l'augmentation du nombre d'espèces exotiques ne montre aucun signe de saturation et la plupart des taxons présentent même une augmentation du taux d'incursions au fil du temps (Seebens et al., 2017). Les invasions biologiques étant un processus se déroulant en plusieurs étapes, les approches utilisées pour la gestion de ces EEE sont classées en général en 3 catégories : la prévention, l'éradication rapide et la gestion à long terme (Robertson et al., 2020). Si une espèce est détectée très tôt, au moment même de son arrivée, il sera plus simple de l'éliminer avant qu'elle ne s'établisse largement. Si toutefois l'espèce est déjà établie, alors une détection précoce pourra limiter son impact en réduisant sa propagation et son abondance. La gestion peut également inclure l'adaptation aux impacts des EEE sans intervention directe sur les espèces ou alors en agissant sur la restauration de l'environnement impacté après l'élimination des espèces exotiques (Robertson et al., 2020).

Pour atteindre une gestion efficace des EEE, il est essentiel d'avoir une bonne compréhension des invasions biologiques, notamment des voies de diffusion impliquées («pathways» en anglais), des différentes étapes d'une invasion ainsi que des impacts générés lors d'invasions « réussies ».

## II.1 Etapes et management d'une invasion biologique

Le processus par lequel une espèce exotique devient un envahisseur se déroule en quatre étapes : (1) Le transport, (2) l'introduction, (3) l'établissement et (4) la propagation (**Figure 5**). Dans cette thèse nous nous focalisons sur la détection précoce des espèces invasives et donc sur les deux premières étapes de l'invasion, en se focalisant sur le cas des insectes xylophages, sujet de cette thèse.



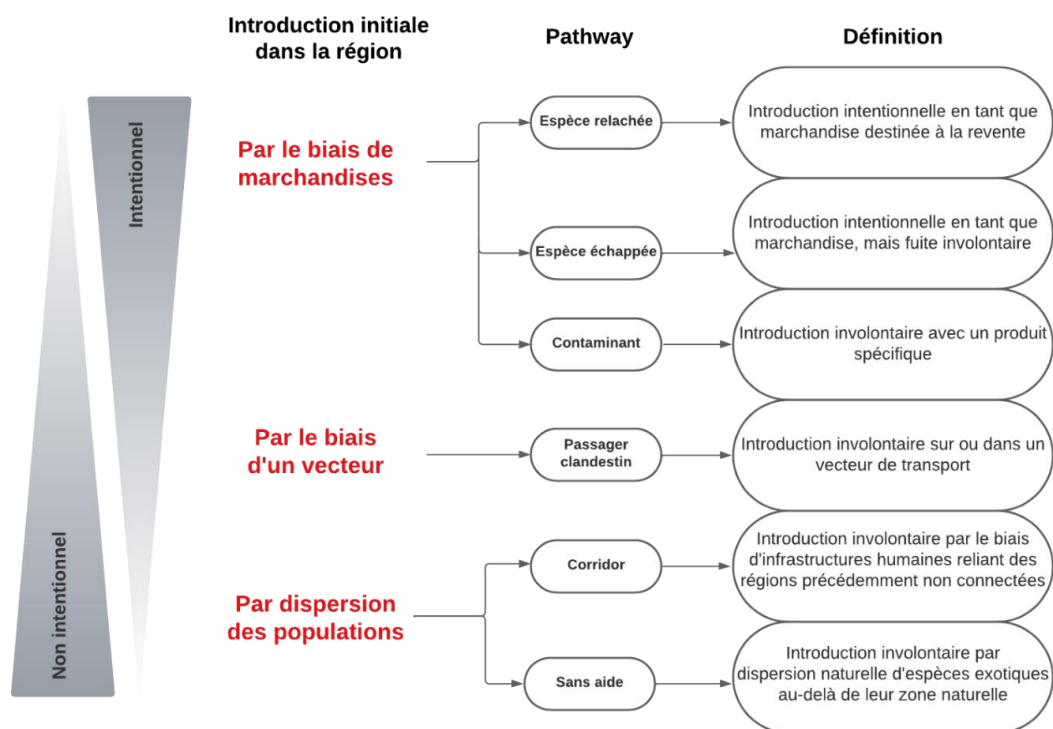


**Figure 5** - Schéma du processus d'invasion biologique, prenant en compte les barrières rencontrées par les espèces à chaque étape, les terminologies adaptées ainsi que les différentes manœuvres de gestion à appliquer selon l'étape de l'invasion (modifiée de Blackburn et al., 2011).

### II.1.1 Le transport et l'introduction

Les premières étapes d'une invasion sont donc le transport d'une espèce depuis son aire native vers une nouvelle région et son introduction dans une nouvelle aire géographique.

Hulme et al. (2008) ont identifié trois mécanismes par lesquels les espèces exotiques envahissent généralement de nouveaux territoires. Le premier mécanisme est l'importation délibérée de marchandises, le second est par le biais des transports et enfin le troisième mécanisme étant la dispersion naturelle des individus à partir d'une autre région. Ces trois mécanismes se traduisent ensuite par six pathways (processus qui aboutissent à l'introduction d'espèces exotiques d'un endroit à l'autre) reflétant un gradient d'implication humaine (**Figure 6**).

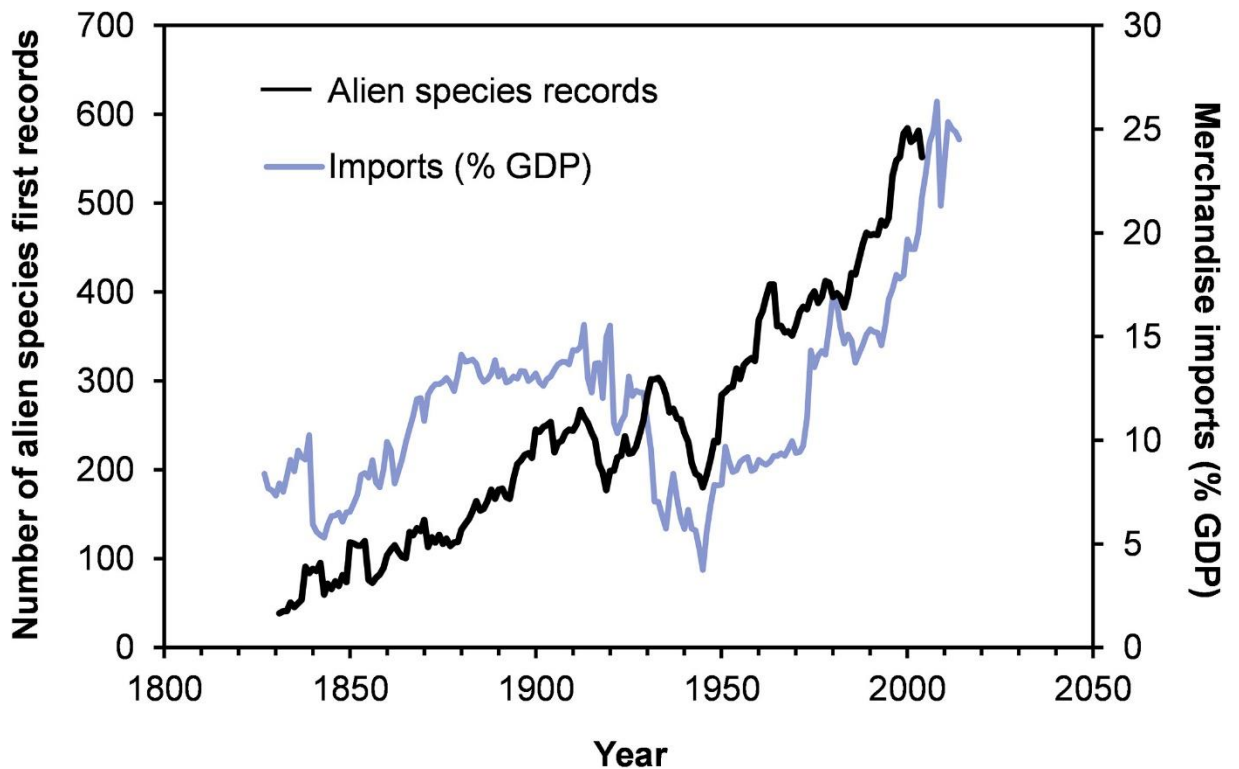


**Figure 6** - Catégorisation des voies d'introduction et des pathways associés d'espèces exotiques dans une nouvelle aire géographique (inspirée de Hulme et al., 2008).

### Introductions par le biais de marchandises

Les échanges commerciaux favorisent l'introduction d'espèces non-natives (Seebens et al. 2015 ; Hulme 2021). Le nombre de nouvelles occurrences d'espèces exotiques enregistrées chaque année dans le monde a dépassé la croissance du commerce international, augmentant de près de 20 fois depuis le début du XIXe siècle (Hulme 2021) (**Figure 7**).





**Figure 7** - Commerce mondial et invasions au fil du temps (Extraite de Hulme 2021).

Le commerce international a été identifié comme l'une des principales raisons de cette tendance à la hausse puisque l'accélération du commerce mondial coïncide avec l'augmentation du nombre d'espèces exotiques (Seebens et al., 2018). Cette introduction peut se faire de manière volontaire, lorsque les espèces en questions sont elles-mêmes la marchandise en raison de leur valeur commerciale et qu'elles sont volontairement libérées (comme ça peut être le cas du gibier, des agents de lutte biologique, des plantes d'ornementation, etc.) ou bien de façon involontaire lorsque les espèces s'échappent de la captivité (échappées de zoos, d'aquaculture, de jardins, etc.) ou lorsqu'elles sont «contaminantes» d'autres marchandises et donc introduites en même temps que ces marchandises (graines de végétaux exotiques, bactéries, champignons, insectes, etc.) (Hulme et al., 2008). Par exemple, au cours des dernières décennies, le commerce des animaux de compagnie non-indigènes, a considérablement augmenté (Lockwood et al., 2019) en particulier pour certains taxons tels que les oiseaux (Springborn et al., 2015) ou les reptiles (Kopecký et al., 2013). Cependant, l'augmentation de la possession d'animaux non-indigènes a entraîné une augmentation du nombre d'animaux exotiques relâchés ainsi que l'établissement de populations d'espèces exotiques envahissantes (Lockwood et al.,

2019). D'après la base de données mondiale sur les espèces envahissantes et l'inventaire des espèces exotiques envahissantes en Europe, 53 % des espèces de vertébrés envahissants ont été introduites par le commerce des animaux de compagnie (Saul et al., 2017).

Concernant les coléoptères xylophages, il est clairement établi que les augmentations des échanges commerciaux internationaux ont généré une hausse du nombre de nouvelles introductions au cours des dernières décennies (Kirkendall and Faccoli 2010) à tel point que presque chaque année de nouvelles espèces sont interceptées ou enregistrées comme établies dans de nouvelles zones géographiques (Roques and Auger-Rozenberg 2006 ; Kirkendall and Faccoli 2010 ; Rassati et al. 2016). Les matériaux d'emballage en bois (palettes, caisses, etc.) sont reconnus comme la principale voie d'introduction des coléoptères xylophages car ces matériaux sont omniprésents dans le commerce international (quels que soient les produits transportés) et offrent de nombreuses cachettes permettant aux insectes d'échapper aux contrôles dans les points d'entrée (Haack et Rabaglia 2013, Haack 2001 ; McCullough et al. 2006). Les introductions accidentelles via l'importation des plantes ornementales herbacées ou ligneuses comme les bonsaïs sont également fréquentes (McCullough et al. 2006 ; Liebhold et al. 2012).

Les ports restent le premier point d'entrée des coléoptères exotiques xylophages dans les zones côtières (Brockhoff et al. 2006). Le fait que les marchandises soient de plus en plus fréquemment expédiées dans de grands conteneurs ne facilite pas les processus d'inspection (Stanaway et al. 2001). Bien que les matériaux d'emballage en bois soient traités afin d'éliminer les organismes nuisibles pouvant s'y cacher (Haack et Petrice 2009), on retrouve encore régulièrement des coléoptères xylophages vivant au sein de ces matériaux (Haack et al. 2014). Les larves non détectées peuvent se développer pendant le transport et les adultes peuvent ainsi émerger plusieurs semaines ou plusieurs mois après l'arrivée des matériaux d'emballages. De plus, les matériaux d'emballage en bois utilisés dans le transport de marchandise ne sont pas toujours réutilisés / recyclés et sont donc fréquemment pris en charge par des entreprises chargées de détruire ces matériaux (Buehlmann et al. 2009) mais qui les stockent sur de longues périodes avant

destruction. Cette période de stockage laisse ainsi aux coléoptères le temps de terminer leur cycle de développement, d'émerger et de démarrer le processus d'invasion sans être détectés (Rassati et al. 2016).

### Introductions par le tourisme et les déplacements quotidiens

Les espèces exotiques peuvent également être introduites par les moyens de transport humain via différents vecteurs comme les bateaux, les trains, les avions et les voitures. Dissimulées dans les véhicules à l'insu des conducteurs, les espèces exotiques introduites par de tels vecteurs sont qualifiées de « passagers clandestins » (Hulme et al., 2008). Par exemple, des organismes indésirables peuvent être présents dans les eaux de ballast ainsi que dans les sédiments associés, ou encore fixés sur les coques des navires (Gollasch, 2002 ; Coutts et al., 2003). Autre exemple, la surveillance des moustiques s'est concentrée pendant de nombreuses années sur les aéroports internationaux en raison de femelles anophèles voyageant et propageant le paludisme par avion (Isaacson, 1989). Une autre étude suggère également que sur les 6,5 millions de trajets quotidiens en voiture dans la région métropolitaine de Barcelone, on retrouve entre 13,000 et 71,500 déplacements qui facilitent le déplacement des moustiques tigres (Eritja et al., 2017).

### Introductions par dispersion des populations

Les humains peuvent également faciliter la propagation naturelle d'espèces exotiques en créant des corridors c'est-à-dire des voies de déplacement ou de dispersion facilitées par des infrastructures créées par l'activité humaine (Hulme et al., 2008). Il s'agit d'un lien artificiel qui permet aux espèces de se déplacer d'une région à une autre, souvent au-delà des frontières géographiques auxquelles elles étaient initialement limitées. On retrouve par exemple des canaux, reliant des bassins hydrographiques et les mers ; des tunnels, reliant les vallées montagneuses ; ou encore des ponts, reliant des îles aux continents (Hulme et al., 2008). Enfin, les espèces exotiques peuvent également arriver dans une nouvelle région par propagation naturelle, sans passer par des corridors.

### II.1.2 L'établissement et la propagation

Lorsque la reproduction et la survie répétées des individus donnent lieu à une population capable de se maintenir dans la nature, on parle alors de l'établissement de l'espèce (Blackburn et al., 2011). De cette survie va dépendre de nombreux facteurs biotiques et abiotiques pouvant favoriser ou entraver l'établissement des espèces envahissantes. En raison de leurs effectifs réduits, les espèces colonisantes doivent par exemple surmonter le manque de variabilité génétique ainsi que les effets d'Allee (dépendance positive de la survie et de la croissance d'une population par rapport à sa densité) (Sakai et al., 2001). Enfin, l'étape de la propagation des espèces exotiques est décrite comme une phase d'expansion où la superficie occupée par l'espèce augmente. Là encore, de nombreux facteurs entrent en ligne de compte dans la réussite de la propagation comme notamment le succès reproductif de l'espèce en question. Les plantes et les insectes qui possèdent un taux de reproduction élevé possèdent donc un avantage par rapport à d'autres espèces qui se reproduisent moins rapidement. De plus, certaines espèces possèdent des mécanismes naturels de dispersion particulièrement efficace comme le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, qui se déplace sur de longues distances grâce à son insecte vecteur, *Monochamus galloprovincialis* (**Figure 8**) (**Encadré 2**) (Naves et al., 2001).

**Encadré 2 : Présentation de *Monochamus galloprovincialis***



**Figure 8** - Photo de *Monochamus galloprovincialis* prise par Fred Chevillot.

*Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) est un cérambycidé largement répandu en Europe. Ses principaux arbres hôtes sont des pins de différentes essences où les femelles vont pondre dans le houppier, sous l'écorce des pins fragilisés, mourants ou fraîchement morts. Bien que *Monochamus galloprovincialis* ne soit pas considéré comme un ravageur forestier majeur, il est le vecteur du nématode du pin en Europe (*Bursaphelenchus xylophilus*) qui provoque le flétrissement du pin, conduisant au dépérissement des arbres contaminés dans un délai d'un an dans des conditions favorables. Originnaire d'Amérique du Nord, le nématode ne cause que peu de dégâts car les espèces locales de pins ont co-évolué avec lui et présentent des mécanismes de résistance (Shinya et al., 2013). En revanche, dans les pays d'introduction où les espèces locales de pins ne sont pas résistantes, le nématode du pin est responsable de mortalités massives. Soliman et al., 2012 ont par exemple estimé que le coût total de la perte de bois engendrée par le nématode en Europe pourrait atteindre 22 milliards d'euros sur une période de 22 ans (2008-2030). Il a été observé en 1978 au Japon que la maladie pouvait se déplacer de plusieurs kilomètres par an (Futai, 2013), une telle dispersion est impossible pour le nématode seul ne pouvant pas passer seul d'un arbre mort à un arbre sain. Les études réalisées ont montré que les principaux vecteurs se sont toujours avérés être des espèces du genre *Monochamus* et plus particulièrement *Monochamus galloprovincialis* en Europe (Naves et al., 2001).

Le processus d'invasion est donc divisé en une série d'étapes, et à chaque étape existe des obstacles qui doivent être surmontés par les populations introduites pour que l'invasion soit un succès (Blackburn et al., 2011). Williamson et Fitter (1996) estiment par ailleurs que seulement 10% des espèces introduites (ce chiffre est variable selon les groupes taxonomiques étudiés) deviendront envahissantes et 10% des espèces envahissantes auront un impact significatif. Bien que théorique, cette règle des dixièmes instaurée par Williamson et Fitter (1996) montre l'impact non négligeable des différentes barrières rencontrées par les espèces exotiques en voie de devenir envahissantes. Au vu du nombre croissant des arrivées et des établissements d'espèces exotiques, même si une seule petite partie devient des ravageurs problématiques, il ne fait aucun doute qu'il s'agit d'un problème majeur.

### II.1.3 Gestion des invasions biologiques

Bien que la majorité des insectes introduits accidentellement atteignent rarement des niveaux de population élevés, il peut subsister cependant quelques espèces pouvant devenir abondantes et provoquer des impacts considérables.

Pour gérer les espèces invasives, plusieurs approches sont généralement utilisées (Blackburn et al., 2011) :

- La prévention : l'objectif ici est de limiter l'introduction d'espèces invasives en renforçant les contrôles, en mettant en place des réglementations sur le commerce des espèces exotiques, en sensibilisant le public et en développant des protocoles de gestion des risques.
- Détection précoce : approche essentielle, permettant de détecter rapidement les nouvelles introductions d'espèces invasives pour pouvoir intervenir rapidement et efficacement. C'est cette approche qui nous intéresse dans cette thèse et je la développerai plus en détails dans le chapitre suivant.
- Atténuation (« Mitigation » en anglais) : mesures prises pour atténuer les effets négatifs d'une menace biologique qui s'est déjà propagée ou est présente dans un écosystème. Contrairement au "containment", la "mitigation" vise à réduire

les impacts et les conséquences de la menace plutôt que d'empêcher sa propagation.

- Maîtrise (« Containment ») : Mesures prises pour limiter la propagation ou la dissémination des invasifs. Il s'agit de mettre en place des barrières ou d'autres mesures similaires pour empêcher la propagation de la menace au-delà d'une zone spécifique. Le but principal est de maintenir la menace sous contrôle et de prévenir sa dispersion vers d'autres régions.
- Eradication et contrôle : Lorsqu'une espèce invasive est détectée, des mesures sont prises pour l'éradiquer ou la contrôler afin de minimiser son impact sur l'environnement. Cela peut inclure l'utilisation de méthodes mécaniques, chimiques ou biologiques pour éliminer ou réduire la population d'espèces invasives.

## II.2 Les conséquences des invasions biologiques

Les invasions biologiques engendrent une série de conséquences qui se répartissent généralement en trois catégories principales : environnementales, économiques et sur la qualité de vie humaine (Roy et al. 2023).

Sur le plan environnemental, ces invasions peuvent causer des perturbations significatives dans les écosystèmes natifs. Les espèces envahissantes peuvent concurrencer les espèces indigènes pour les ressources, perturber les chaînes alimentaires et modifier les structures des habitats. Cela peut entraîner une diminution de la biodiversité et perturber l'équilibre écologique (Ricciardi et al. 2013 ; Bellard et al. 2016 ; Doherty et al. 2016 ; Crystal-Ornelas et Lockwood 2020). On estime par ailleurs que les invasions biologiques jouent un rôle important dans 60% des extinctions mondiales et que au moins 218 espèces exotiques envahissantes ont provoqué 1215 extinctions locales d'espèces indigènes (Roy et al. 2023). Les espèces invasives ont également des répercussions sur la qualité de vie (dans 85% des cas selon Roy et al., 2023). Certaines espèces envahissantes peuvent être porteuses de maladies transmissibles, augmentant ainsi les risques d'épidémies et de pandémies (Shepard et al. 2011 ; Shackleton et al. 2019). Elles peuvent également provoquer des

allergies comme de nombreuses plantes exotiques envahissantes telles que *Ambrosia artemisiifolia* (Ambroisie commune) (Roy et al. 2023).

Du point de vue économique, les invasions biologiques peuvent également avoir des impacts dévastateurs. Elles peuvent affecter l'agriculture, les industries forestières et plein d'autres domaines entraînant une diminution des rendements et des pertes financières considérables (Tobin., 2018 ; Hyde et al., 1999 ; Luo et al., 2023). En 2019, les coûts annuels mondiaux des invasions biologiques s'élevaient à plus de 423 milliards de dollars, avec des variations selon les régions, mais il s'agit probablement d'une forte sous-estimation (Roy et al. 2023). 92% de ce coût est attribué directement aux dommages que les espèces exotiques envahissantes ont causés, les 8% restant sont liés aux dépenses de gestion des invasions biologiques (Roy et al. 2023). On estime que le coût économique liés aux invasions biologiques est multiplié par 4 tous les 10 ans (Roy et al. 2023).

Selon (Fantle-Lepczyk et al., 2022), les coûts des invasions signalées aux Etats-Unis de 1960 à 2022 se sont élevés à 1 220 milliards de dollars si l'on considère uniquement les estimations de coûts observées et hautement fiables. Plus des deux tiers des coûts déclarés sont liés aux dommages et aux pertes générés par les invasions. Aux Etats-Unis, la filière de l'agriculture est la plus touchée avec un coût associé aux invasions biologiques d'au moins 510 milliards de dollars, suivi par la filière environnementale (102 milliards de dollars) et de la foresterie (42 milliards de dollars). Les domaines de la santé et de la pêche sont moins touchés avec "seulement" 19,5 milliards et 40 millions de dollars respectivement. Concernant les invasifs les plus coûteux aux Etats-Unis, on retrouve les mammifères en première position avec 234 milliards de dollars suivi des plantes et des insectes avec des coûts estimés à 190 et 126 milliards de dollars estimés. Diagne et al., 2021 ont également montré que les coûts liés aux dégâts augmentent au point de dépasser les coûts liés au contrôle des invasions (prévention, gestion, éradication).



### III. Approches de détection et d'identification des xylophages invasifs

L'objectif principal de la gestion des espèces invasives est de restaurer les propriétés et les fonctions des écosystèmes affectés à leur état pré-invasif, y compris la biodiversité indigène et les services écosystémiques (Bellard et al., 2016 ; Kopf et al., 2017). Pour ce faire, un ensemble de principes sont mis en place visant à réduire l'établissement, la propagation, l'impact et l'abondance des espèces envahissantes (Castro et al., 2021 ; Hulme, 2006). Comme vu précédemment, des moyens financiers considérables sont déployés dans le monde entier afin de gérer les espèces invasives. Au cours de l'introduction et de l'établissement initial d'une espèce envahissante, la détection de celle-ci reste compliquée de par la présence de l'espèce en faible abondance, ce qui nécessite des efforts considérables pour une détection efficace (Hoffman et al., 2011 ; Harris et al., 2018 ; Walsh et al., 2018). Cette détection, compliquée en début d'invasion, fait que les espèces envahissantes sont souvent détectées plusieurs années après leur établissement et avec une propagation déjà bien avancée (Myers et al., 2000 ; Hulme, 2006 ; Lodge et al., 2006). Pourtant, plus la détection sera précoce et les systèmes de surveillance nombreux, plus les résultats de contrôle et d'éradication seront efficaces et à moindre coûts (Liebhold et al., 2016). Epanchin-Niell et al. (2014) ont démontré que la mise en œuvre d'un programme de piégeage de surveillance des xylophages et des scolytes envahissants en Nouvelle-Zélande serait clairement bénéfique avec environ 300 millions de dollars US économisés sur 30 ans.

#### III.1 Méthodes de détection

De nombreuses approches existent afin de détecter la présence d'insectes invasifs xylophages. Des études ont montré que les chiens peuvent être utilisés pour détecter la présence d'arbres attaqués par de nombreuses espèces comme le charançon rouge du palmier (*Rhynchophorus ferrugineus*) (Suma et al. 2014), le scolyte *Ips typographus* (Johansson et al. 2019), l'agrile du frêne (*Agrilus planipennis*) (Hoyer-Tomiczek and Hoch 2020) ou encore le capricorne asiatique (*Anoplophora glabripennis*) (Arnesen and Rosell 2021). D'autres approches existent comme la détection acoustique (Mankin et al. 2008) ou par vibrométrie laser (Zorović and Čokl

2015) qui détecte les larves qui se nourrissent et se déplacent à l'intérieur de leur hôte à l'aide de capteurs et de logiciels calibrés sur la fréquence sonore des larves qui se nourrissent. La détection visuelle est la plus fréquemment utilisée, la prospection au sol est une approche rapide, mais peu fiable pour détecter la présence d'insectes xylophages invasifs tandis que les prospections en hauteur, au niveau de la cime des arbres sont plus lentes et coûteuses, mais avec des taux de détection plus élevés (Hu et al. 2009).

Des plantations sentinelles sont également utilisées afin de détecter des envahisseurs potentiels, même ceux qui ne sont pas connus ailleurs en tant que ravageurs, avant leur introduction dans un nouveau continent. Le principe consiste à faire pousser des plantes dans des continents où elles ne sont pas indigènes et étudier leur colonisation ultérieure par des insectes autochtones permettant ainsi de détecter de futurs envahisseurs potentiels (Roques et al., 2015). Une autre approche de détection précoce utilise des pièges à phéromones déposés sur des sites à hauts risques d'introduction (ports notamment) permettant la détection de potentiels nouveaux arrivants dès leur arrivée (Hoch et al. 2020), cette approche de détection est traitée plus en détails dans le chapitre 2 de cette thèse.

### III.2 Identification morphologique

L'identification précise d'un individu capturé est un prérequis essentiel permettant d'obtenir des informations précieuses sur l'écologie et la biologie de l'espèce. Ces informations sont primordiales pour ensuite pouvoir prendre des décisions de gestion adaptées (Bortolus, 2008 ; Campbell *et al.*, 2018 ; Lyal et Miller, 2020). Une erreur d'identification taxonomique pourrait ensuite entraîner une cascade d'erreurs dans les décisions de contrôle des invasions (Bush *et al.*, 2021). Il est donc nécessaire d'avoir à disposition des outils de détection et d'identification efficaces, fiables et précis (Hoffman *et al.*, 2016). Traditionnellement, les caractères morphologiques sont utilisés pour l'identification des insectes (Jinbo *et al.*, 2011). Cependant cette approche d'identification possède de nombreuses limites. Certaines espèces cryptiques (organismes difficiles à distinguer en raison de leur ressemblance morphologique, pouvant conduire à des confusions taxonomiques) requièrent un haut niveau d'expertise pour une utilisation efficace des clés taxonomiques (Ball et

Armstrong 2006). C'est une approche également difficile et chronophage (Barrett et Hebert 2005) où les stades immatures sont non-identifiables car la plupart des clés taxonomiques sont utilisées pour l'identification des individus au stade adulte (Barrett et Hebert 2005). Certains spécimens peuvent également avoir subi des dommages lors de l'échantillonnage empêchant l'identification basée sur la morphologie (Sweeney et al. 2011, Gibson et al. 2015). Certains cas de plasticité phénotypique (capacité d'un organisme à modifier son phénotype en réponse à des changements dans son environnement) rendent également les identifications difficiles voire impossibles à réaliser sur une base morphologique (Murugan et al. 2016). Toutes ces limites font que de nombreux spécimens interceptés aux frontières sont identifiés à des rangs supérieurs (famille / sous-famille). Cela est illustré par le fait que seulement 40 % des spécimens d'un ensemble de données d'interception du département américain de l'Agriculture (USDA) ont reçu des identifications au niveau de l'espèce (Madden *et al.*, 2019). Bien que les identifications à des niveaux taxonomiques supérieurs puissent être pertinentes dans certaines études, il est généralement nécessaire d'avoir des informations telle que le mode de vie, les hôtes larvaires, les parasitoïdes et la capacité de dispersion qui peuvent être spécifiques aux espèces (Worner & Gevrey, 2006 ; Brasier, 2008).

### III.3 Le barcoding moléculaire

Associées à la méthode morphologique vue précédemment, les méthodes d'identification moléculaire sont aujourd'hui communément utilisées par les taxonomistes pour résoudre les cas complexes d'assignation taxonomique des individus (Navajas and Fenton., 2000). Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'une courte région d'ADNmt (ADN mitochondrial) standardisée de l'extrémité 5' de la première sous-unité de la cytochrome C oxydase mitochondriale (Hebert et al. 2003). Cette séquence de 658 paires de bases, appelée code-barre de l'ADN ("barcode" en anglais) est utilisée comme une étiquette spécifique à chaque taxon animal (Jinbo et al. 2011). Le barcode est amplifié, séquencé puis aligné avec les séquences correspondantes dans les bases de données existantes, telles que Boldsystems (<https://www.boldsystems.org/>) et GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ce fragment de gène a l'avantage d'être d'origine maternelle (Birky, 2001) et exempt de recombinaisons, l'ADN mitochondrial paternel étant éliminé

avant/pendant ou après la fécondation (White et al., 2008) entraînant ainsi des variations minimales au sein des espèces. Il est présent dans toutes les formes de vie eucaryotes, possède une divergence de séquence suffisante pour distinguer les espèces étroitement liées et d'être facilement amplifiable en raison de sa longueur de séquence courte et des amorces universelles robustes (Hebert et al. 2003 ; Folmer et al. 1994 ; Zhang and Hewitt 1997; Simmons and Weller 2001). L'ADNmt est de plus relativement abondant ce qui facilite l'extraction même à partir d'une petite partie du corps de l'animal ou à partir de spécimens fortement dégradés (Stoeckle and Hebert 2008 ; Meusnier et al. 2008).

Le barcoding peut non seulement être utilisé pour séquencer un spécimen dans le but de déterminer à quelle espèce il appartient en le comparant aux bases de données, mais il peut également consister en la construction de ladite bibliothèque de référence. Cela nécessite la conservation du spécimen et la collecte de données (date de capture, coordonnées GPS du lieu de capture, nom du collecteur, etc...) selon des normes clairement définies spécifiques aux bases de données que l'on souhaite incrémenter (Hanner 2005). Le spécimen original est photographié et conservé en tant que témoin morphologique (appelé voucher). La photo du voucher ainsi que toutes les métadonnées associées seront stockées avec la séquence d'ADN correspondante dans la base de données (Floyd et al., 2010). Ainsi, toute nouvelle séquence COI provenant d'un spécimen inconnu peut être recherchée dans la base de données et si une correspondance est trouvée, une identification à l'espèce peut être effectuée.

Dans un contexte de biosurveillance d'insectes, un avantage non négligeable du barcoding est la possibilité d'identifier les espèces quels que soient leurs stades de développement (œuf, larve, ect...) permettant une identification lorsqu'une identification morphologique classique serait complexe voire impossible (Syromyatnikov et al., 2017). Il est également particulièrement important, notamment dans le cas d'espèces invasives, de pouvoir déterminer l'origine géographique d'un spécimen intercepté permettant ainsi de reconstituer l'itinéraire que le spécimen a suivi. Le barcoding est capable de répondre à ce besoin dans la mesure où différentes populations portent des signatures distinctes de COI, qui sont entièrement représentées dans la base de données de référence, c'est ce qui a par exemple permis

à Simonsen et al. (2008) de retracer l'itinéraire d'invasion des pyrales des cactus (*Cactoblastis cactorum*) aux États-Unis en utilisant des données de COI. Le barcoding a également été utilisé pour détecter des groupes / biotypes au sein des espèces (espèces cryptiques) (Rugman-Jones et al., 2010) ou encore pour l'identification de complexes d'espèces (Tyagi et al., 2017).

Cependant, il est important de noter qu'il peut exister un nombre important d'erreurs taxonomiques dans les enregistrements de séquences d'ADN publiées (Nilsson et al. 2006) ainsi que des métadonnées importantes manquantes (Floyd et al., 2010). Ces erreurs et imprécisions peuvent ensuite entraîner des "cascades d'erreurs" (Bortolus 2008) car elles peuvent être ensuite citées et répétées. Dans ce contexte, cela démontre l'importance des normes adoptées dans le cadre du protocole du dépôt de séquences d'ADN (comme avoir une photographie du voucher pour chaque séquence, le nom de la personne ayant identifié l'individu, etc...), ainsi que la valeur accrue des données générées en conséquence. De plus, dans certaines bases de données collaboratives, les erreurs peuvent être re-vérifiées et corrigées à l'aide des utilisateurs qui peuvent contacter les responsables des projets contenant ces potentielles erreurs (c'est le cas notamment de la base de données Bold Systems).

### III.4 Le métabarcoding

Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'utilisation des technologies de séquençage haut-débit (HTS) pour permettre une identification basée sur le même principe que le barcoding moléculaire de façon parallèle afin de surmonter certaines limites vues précédemment. Cette approche, appelée « métabarcoding » (Taberlet et al., 2012), permet de générer un grand nombre de barcodes individuels en une seule analyse permettant l'identification simultanée de multiples individus présents dans un milieu (Porter & Hajibabaei, 2018; Tedersoo et al., 2019) tel que, par exemple, le contenu d'un piège contenant de multiples espèces d'insectes. Cette approche, qui est à la fois rapide et économique, a été utilisée dans des études pour caractériser les communautés d'arthropodes (Cristescu, 2014 ; Elbrecht et al., 2017 ; Taberlet et al., 2012) et est de plus en plus pertinente dans le domaine de l'écologie (Beng et al., 2016 ; Liu et al., 2020 ; Porter et al., 2019).

Cependant, malgré ses avantages évidents, le métabarcoding reste une méthode relativement récente et de nombreux défis doivent encore être relevés. Les choix effectués à chaque étape du protocole de métabarcoding peuvent directement influencer la liste des espèces obtenues, tels que le choix des amorces (Elbrecht et al., 2019 ; Elbrecht & Leese, 2017 ; Hajibabaei et al., 2019 ; Marquina et al., 2019), la méthode d'extraction (Deiner et al., 2015 ; Dopheide et al., 2019 ; Kirse et al., 2021 ; Majaneva et al., 2018), la profondeur de séquençage (Alberdi et al., 2018), mais aussi l'analyse bioinformatique des données de séquençage (Brandon-Mong et al., 2015 ; Brandt et al., 2021 ; Kopylova et al., 2016). Les analyses métabarcoding peuvent être sujettes à des faux-négatifs (lorsque des espèces ne sont pas détectées bien que présentes), en raison d'un échantillonnage insuffisant ou à cause de limitations biologiques / techniques qui entraînent des erreurs de détection (Batovska et al., 2021).

Plusieurs obstacles ont été mis en évidence limitant l'obtention précise de résultats lors d'analyses métabarcoding. Bien qu'il existe souvent une corrélation positive entre biomasse des espèces et le nombre de reads (Lamb *et al.*, 2019), cela peut être faussé par des biais de PCR, des variations du nombre de copies, la richesse en espèce et les différences de biomasse des espèces peuvent entraîner une proportion d'ADN séquencé inégale (Elbrecht & Leese, 2015 ; Krehenwinkel et al., 2017; Piñol et al., 2019). Les amorces utilisées peuvent également apporter des biais envers certains groupes taxonomiques. Des problèmes bien documentés de biais de PCR peuvent également entraîner une perte d'information taxonomique lors de l'amplification. Ce biais est principalement attribué à des correspondances inadéquates entre les amorces et les séquences ciblées. Le manque de régions hautement conservées dans le COI pour positionner des amorces universelles a conduit à la proposition d'autres loci plus conservés, notamment les 12S, 18S, 16S, b cytochrome et NADH, comme cibles alternatives pour le métabarcoding (Batovska et al., 2021). De plus, la disponibilité et la qualité des séquences de référence nécessaires pour identifier les espèces peuvent varier considérablement selon les marqueurs et les groupes taxonomiques étudiés (Piper et al., 2019 ; Ashfaq & Hebert, 2016), parfois elles doivent être générées avant de commencer l'analyse afin d'être en capacité de détecter les espèces présentes.

L'identification erronée des taxons dans les analyses de métabarcoding peut également être causée par des spécimens mal identifiés dans les bases de données de référence (Piper et al., 2019 ; Bengtsson-Palme et al., 2016 ; Shen et al., 2013). Bien que la curation des bases de données de référence puisse surmonter ce problème, cela peut être difficile lorsque les séquences de référence sont rares ou que les synonymes taxonomiques sont courants (Kozlov et al., 2016). Une autre problématique amenée par le métabarcoding pour une application en biosécurité est l'incapacité à valider les identifications effectuées par le métabarcoding car après l'étape de l'extraction de l'ADN (qui est traditionnellement de nature destructive), on ne dispose généralement plus de spécimens intacts (Batovska et al., 2021). Les approches multi-amplicons et multi-locus peuvent améliorer la détection des espèces, les estimations de l'abondance des espèces et permettre une analyse métabarcoding plus fiable (Arulandhu et al., 2017 ; De Barba et al., 2014 ; Hauck et al., 2019 ; Zhang et al., 2018 ; Andujar et al. 2015 ; Tang et al., 2015). La PCR multiplex offre rapidité et commodité par rapport aux réactions PCR en tandem, ce qui la rend attrayante pour les applications de surveillance à haut débit (Batovska et al., 2021).

#### **IV. Objectifs de la thèse et plan du manuscrit**

Cette thèse a pour principal objectif de fournir des indicateurs de risque d'entrée et d'établissement d'espèces xylophages hors de leur aire native, et vise en particulier à développer des outils moléculaires de biosurveillance de cérambycides représentant un risque majeur pour la production de bois et la protection des forêts en Europe. Plus précisément, cette thèse permettra (i) de lever les verrous méthodologiques liés à la reconnaissance du statut spécifique des cibles potentielles, (ii) d'identifier les facteurs de risque, et (iii) de tester la perméabilité des zones à risques aux différentes voies d'entrées en Europe.

Le premier chapitre décrit la campagne mondiale de piégeages multi-phéromonaux visant la capture des cérambycides. Cette étude a permis un référencement des espèces exotiques à cibler dans cette thèse.

Dans le second chapitre, nous avons évalué l'efficacité du métabarcoding dans un contexte de biosurveillance en utilisant le séquenceur MinION d'Oxford Nanopore. Ce séquenceur présente l'avantage d'être portatif et peu coûteux, le rendant ainsi plus accessible que les technologies concurrentes. L'impact de plusieurs facteurs tels que la méthode utilisée pour capturer les insectes ont également été étudiés afin d'optimiser les résultats obtenus en adaptant les stratégies de piégeage.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié l'impact d'une des principales limites rencontrées lors de l'utilisation d'outils génomiques pour l'identification d'individus : le manque de références dans les bases de données. Ainsi, nous avons créé une librairie de référence de codes-barres moléculaires pour les cérambycides capturés en Europe à l'aide de pièges multi composés afin de fournir à la communauté scientifique une base de données permettant d'effectuer des analyses fiables d'identification basées sur l'ADN.

Dans le dernier chapitre de cette thèse, nous avons étudié à l'aide d'une approche génomique RADseq la structure génétique des populations invasives d'une espèce exotique introduite dans le nord du bassin méditerranéen (*Xylotrechus stebbingi*) afin de mieux comprendre sa dynamique d'invasion.



---

# Chapitre I : Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species

---

## Résumé en français du chapitre I :

Dans ce chapitre, l'efficacité de pièges multi-phéromonaux mis en place dans le cadre d'un programme mondial dans un contexte de biosurveillance de Cerambycidae xylophages a été testé. Pour ce faire, 1,308 pièges ont été disposés sur 302 sites différents. Cette étude a pour objectif de tester un mélange "générique" standardisé composé de huit phéromones à travers une campagne de piégeage mondial avec l'objectif de répondre à deux hypothèses : 1- Si une espèce est attirée en nombre significatif par le mélange dans une région, alors cela augmente la probabilité qu'elle puisse être détectée lorsqu'elle arrive aux points d'entrée dans de nouvelles aires géographiques. 2- Si le mélange exerce une attraction efficace sur plusieurs espèces alors il est probable que des espèces jusque-là inconnues puissent être également capturées étant donné le degré élevé de ressemblance des structures de phéromones au sein de taxons proches. Cette étude a permis la capture de 78,321 individus appartenant à la famille des cérambycidés, répartis-en 376 espèces et démontre clairement le potentiel du piège multi-phéromonaux pour constituer un outil efficace pour la biosurveillance des espèces de cérambycidés non-natifs. L'espèce *Xylotrechus stebbingi* (Cerambycinae - Clytini) originaire de l'Himalaya (Inde et Pakistan) est un bon exemple de la capacité des pièges multi-phéromonaux pour la capture de cérambycidés non-natifs avec un total de 6 089 individus capturés dans des pays envahis au sud de l'Europe (sud de la France, Italie, Espagne, Grèce, Suisse). Ces résultats fournissent également des pistes vers d'éventuelles structures de phéromones chez de nouvelles espèces. Enfin, le piégeage d'invasifs récents à l'intérieur et à proximité des points d'entrée s'est révélé être très efficace et démontre l'efficacité du mélange pour une détection précoce à des faibles niveaux de population. En témoigne la capture de *Xylotrechus chinensis* (Clytini) dans son aire de répartition d'origine autour de Pékin, ainsi que dans toutes les zones européennes où il a envahi et s'est établi relativement récemment : en Espagne/Catalogne (2013), Grèce/Crète et dans le sud de la France (2018). L'ensemble de ces résultats permettent de répondre aux hypothèses posées. Premièrement, les espèces piégées en grand nombre dans les aires de répartition natives et envahies confirment que le piégeage d'une espèce en nombre important sur un continent augmente la probabilité qu'elle puisse être également détectée à son arrivée dans une nouvelle zone géographique. Ensuite, le mélange multi-phéromones s'est bien révélé être un attractif efficace pour plusieurs espèces de plusieurs sous-familles de cérambycidés y compris des espèces où les phéromones associées n'ont pas encore été identifiées.

## Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species

Alain Roques<sup>1,2</sup>, Lili Ren<sup>2,3</sup>, Davide Rassati<sup>4</sup>, Juan Shi<sup>2,3</sup>, Evgueni Akulov<sup>5</sup>, Neil Audsley<sup>6</sup>, Marie-Anne Auger-Rozenberg<sup>1,2</sup>, Dimitrios Avtzis<sup>7</sup>, Andrea Battisti<sup>4</sup>, Richard Bellanger<sup>8</sup>, Alexis Bernard<sup>1</sup>, Iris Bernadinelli<sup>9</sup>, Manuela Branco<sup>10</sup>, Giacomo Cavaletto<sup>4</sup>, Christian Cocquempot<sup>11</sup>, Mario Contarini<sup>12</sup>, Béatrice Courtial<sup>1</sup>, Claudine Courtin<sup>1</sup>, Olivier Denux<sup>1</sup>, Miloň Dvořák<sup>13</sup>, Jian-ting Fan<sup>14</sup>, Nina Feddern<sup>15</sup>, Joseph Francese<sup>16</sup>, Emily K. L. Franzen<sup>17,18</sup>, André Garcia<sup>10</sup>, Georgi Georgiev<sup>19</sup>, Margarita Georgieva<sup>19</sup>, Federica Giarruzzo<sup>12</sup>, Martin Gossner<sup>15</sup>, Louis Gross<sup>1</sup>, Daniele Guarneri<sup>20</sup>, Gernot Hoch<sup>21</sup>, Doris Hölling<sup>15</sup>, Mats Jonsell<sup>22</sup>, Natalia Kirichenko<sup>23,24</sup>, Antoon Loomans<sup>25</sup>, You-qing Luo<sup>2,3</sup>, Deborah McCullough<sup>26</sup>, Craig Maddox<sup>27</sup>, Emmanuelle Magnoux<sup>1</sup>, Matteo Marchioro<sup>4</sup>, Petr Martinek<sup>13</sup>, Hugo Mas<sup>28</sup>, Bruno Mériguet<sup>29</sup>, Yong-zhi Pan<sup>30</sup>, Régis Phélut<sup>1</sup>, Patrick Pineau<sup>1</sup>, Ann M. Ray<sup>17</sup>, Olivier Roques<sup>1</sup>, Marie-Cécile Ruiz<sup>31</sup>, Victor Sarto i Monteys<sup>32</sup>, Stefano Speranza<sup>12</sup>, Jiang-hua Sun<sup>2,33</sup>, Jon D. Sweeney<sup>34</sup>, Julien Touroult<sup>35</sup>, Lionel Valladares<sup>36</sup>, Loïs Veillat<sup>1</sup>, Yuan Yuan<sup>2,3</sup>, Myron P. Zalucki<sup>37</sup>, Yunfan Zou<sup>38</sup>, Alenka Žunič-Kosi<sup>39</sup>, Lawrence M. Hanks<sup>40</sup>, Jocelyn G. Millar<sup>38</sup>

**1** INRAE URZF, 45075, Orléans, France **2** IFOPE, Sino-French Joint Laboratory for Invasive Forest Pests in Eurasia, INRAE URZF and Beijing Forestry University, Orléans, France **3** Beijing Key Laboratory for Forest Pest Control, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing, China **4** Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE), University of Padua, Padova, Italy **5** Russian Plant Quarantine Center, Krasnoyarsk Branch, Krasnoyarsk 660075, Russia **6** Fera Science Ltd., Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK, United Kingdom **7** Forest Research Institute, Hellenic Agricultural Organization Demeter, Thessaloniki 57006, Greece **8** INRAE UEVT, 06160 Antibes Juan les Pins, France **9** Plant Health and Research Service – ERSA, Via Sabbatini 5, 33050 Pozzuolo Del Friuli (UD), Italy **10** Forest Research Center (CEF), School of Agriculture (ISA), University of Lisbon, Lisbon, Portugal **11** 55 rue du Questel, 29640 Plougonven, France **12** Department of Agriculture and Forest Sciences, University of Tuscia, Viterbo, Via S. Camillo de Lellis, 01100, Italy **13** Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Czech Republic **14** School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, China **15** Forest Health and Biotic Interactions, Swiss Federal Research Institute WSL, Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf, Switzerland **16** USDA APHIS PPQ S&T, Forest Pest Methods Laboratory, Buzzards Bay, MA 02542, USA **17** Department of Biology, Xavier University, Cincinnati, OH 45207, USA **18** USDA APHIS PPQ S&T, Bethel, OH 45106, USA **19** Forest Research Institute, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria **20** Ente Parco Nazionale del

*Circeo, 04016 Sabaudia, Italy* **21** BFW – Austrian Research Centre for Forests, Seckendorff-Gudent-Weg 8, 1131 Vienna, Austria **22** Department of Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7044, Uppsala 750 07, Sweden **23** Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS», Krasnoyarsk 660036, Russia **24** Siberian Federal University, Krasnoyarsk 660041, Russia **25** Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Division Agriculture and Nature (NPPO) National Reference Centre, Geertjesweg 15, Wageningen, Netherlands **26** Department of Entomology and Dept. of Forestry, Michigan State University, East Lansing MI, 48824, USA **27** NSW Department of Primary Industries, Wollongbar & Centre for Tropical Horticulture, Astonville NSW 2477, Australia **28** Laboratori de Sanitat Forestal – CIEF VAERSA- Generalitat Valenciana, 46930 Quart de Poblet (València), Spain **29** Office pour les Insectes et leur Environnement (OPIE), 78041 Guyancourt, France **30** Southwest Forestry College, Kunming, China **31** Office pour l'Environnement de la Corse (OEC), Corte, France **32** Institut de Ciència i Tecnologia Ambientals (ICTA), Entomology, Plants and Health, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain **33** College of Life Science, Institute of Life Science and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, China **34** Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Atlantic Forestry Center, Fredericton, NB, E3C2G6, Canada **35** PatriNat (OFB, CNRS, MNHN), CP41, 36 rue Geoffroy Saint-Hilaire, Paris, France **36** INP Purpan, Toulouse University, Toulouse, France **37** School of Biological Sciences, The University of Queensland, Brisbane, 4072, Australia **38** Departments of Entomology and Chemistry, University of California, Riverside, CA 92521, USA **39** Department of Organisms and Ecosystems Research, National Institute of Biology, 1000 Ljubljana, Slovenia **40** Department of Entomology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA

Corresponding author: Alain Roques (alain.roques@inrae.fr)

---

Academic editor: Marc Kenis | Received 31 July 2022 | Accepted 18 November 2022 | Published 18 May 2023

---

**Citation:** Roques A, Ren L, Rassati D, Shi J, Akulov E, Audsley N, Auger-Rozenberg M-A, Avtzis D, Battisti A, Bellanger R, Bernard A, Bernadinelli I, Branco M, Cavaletto G, Cocquemot C, Contarini M, Courtial B, Courtin C, Denux O, Dvořák M, Fan J-t, Feddern N, Francese J, Franzen EKL, Garcia A, Georgiev G, Georgieva M, Giarruzzo F, Gossner M, Gross L, Guarneri D, Hoch G, Hölling D, Jonsell M, Kirichenko N, Loomans A, Luo Y-q, McCullough D, Maddox C, Magnoux E, Marchioro M, Martinek P, Mas H, Mériguet B, Pan Y-z, Phélut R, Pineau P, Ray AM, Roques O, Ruiz M-C, Sarto i Montevs V, Speranza S, Sun J-h, Sweeney JD, Touroult J, Valladares L, Veillard L, Yuan Y, Zalucki MP, Zou Y, Žunič-Kosi A, Hanks LM, Millar JG (2023) Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species. In: Jactel H, Orazio C, Robinet C, Douma JC, Santini A, Battisti A, Branco M, Seehausen L, Kenis M (Eds) Conceptual and technical innovations to better manage invasions of alien pests and pathogens in forests. *NeoBiota* 84: 169–209. <https://doi.org/10.3897/neobiota.84.91096>

---

## Abstract

A large proportion of the insects which have invaded new regions and countries are emerging species, being found for the first time outside their native range. Being able to detect such species upon arrival at ports of entry before they establish in non-native countries is an urgent challenge. The deployment of traps baited with broad-spectrum semiochemical lures at ports-of-entry and other high-risk sites could be one such early detection tool. Rapid progress in the identification of semiochemicals for cerambycid beetles during the last 15 years has revealed that aggregation-sex pheromones and sex pheromones are often conserved at global levels for genera, tribes or subfamilies of the Cerambycidae. This possibly allows the development of generic attractants which attract multiple species simultaneously, especially when such

pheromones are combined into blends. Here, we present the results of a worldwide field trial programme conducted during 2018–2021, using traps baited with a standardised 8-pheromone blend, usually complemented with plant volatiles. A total of 1308 traps were deployed at 302 sites covering simultaneously or sequentially 13 European countries, 10 Chinese provinces and some regions of the USA, Canada, Australia, Russia (Siberia) and the Caribbean (Martinique). We intended to test the following hypotheses: 1) if a species is regularly trapped in significant numbers by the blend on a continent, it increases the probability that it can be detected when it arrives in other countries/continents and 2) if the blend exerts an effective, generic attraction to multiple species, it is likely that previously unknown and unexpected species can be captured due to the high degree of conservation of pheromone structures within related taxa. A total of 78,321 longhorned beetles were trapped, representing 376 species from eight subfamilies, with 84 species captured in numbers greater than 50 individuals. Captures comprised 60 tribes, with 10 tribes including more than nine species trapped on different continents. Some invasive species were captured in both the native and invaded continents. This demonstrates the potential of multipheromone lures as effective tools for the detection of ‘unexpected’ cerambycid invaders, accidentally translocated outside their native ranges. Adding new pheromones with analogous well-conserved motifs is discussed, as well as the limitations of using such blends, especially for some cerambycid taxa which may be more attracted by the trap colour or other characteristics rather than to the chemical blend.

### **Keywords**

Cerambycidae, early detection, Holarctic, invasion, multi-pheromone blend, pheromone trapping

## **Introduction**

During the last several decades, the unprecedented development of worldwide trade has resulted in increasing translocation and establishment of non-native insects outside their native ranges, with little evidence of saturation (Seebens et al. 2017, 2021). Insect herbivores, accidentally introduced as plant contaminants, appear to be mainly responsible for this sharp increase, at least in Europe (Roques 2010; Pergl et al. 2017). Amongst these non-native herbivores, species associated with woody plants largely dominate, accounting for 76.5% of all herbivore species newly recorded in Europe from 2000 to 2014, while species of importance to agricultural plants and products are a minority (Roques et al. 2016). The increased extent of trade in ornamental plants has been suggested as a major driver of this increase (Liebhold et al. 2012; Eschen et al. 2014; Essl et al. 2015; Roques et al. 2020). Additionally, wood packaging material (e.g. pallets, crating, dunnage) transported with international cargo shipments represents another significant pathway for introduction of non-native phloem- and wood-boring insects (Aukema et al. 2010; Haack et al. 2014; Lovett et al. 2016). An average of 6.1 non-native insect species attacking woody plants became newly established in Europe per year from 2000–2019, compared to 2.4 cases per year from 1950–1970 (Roques et al. 2020). Similar trends were observed in North America (Aukema et al. 2010), New Zealand (Brockerhoff and Liebhold 2017) and at a slower rate in China (Roques et al. 2020).

Another key attribute of this recently-arrived, non-native entomofauna is the increasing presence of “emerging” species, which have not been reported previously as invaders and are not considered to be pests in their native ranges. Arrival of these species probably results from evolving changes in trade routes and imported goods, which leads to accessibility to new pools of species (Seebens et al. 2018). For example, the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* Fairmaire, was not considered a significant pest until it invaded North America, where it has caused massive damage (Dang et al. 2022). The same is true for a number of other xylophagous cerambycid beetle species which have recently invaded Europe, such as the Asian mulberry longhorned beetle, *Xylotrechus chinensis* (Chevrolat) (Sarto i Monteys and Torras i Tutusaus 2018), the round-headed apple-tree borer, *Saperda candida* Fabricius (Nolte and Krieger 2008) and the Asian redneck longhorned beetle *Aromia bungii* (Faldermann) (Russo et al. 2020). At first, such species were typically not subject to regulatory measures or strict phytosanitary inspections at borders because their invasive potential had not been recognised. For example, only seven of the 117 non-native insect species that infest woody plants that established in Europe during the period 1995–2012 had been intercepted in such inspections (Eschen et al. 2015). In Australia, 61 of the 135 non-native species established in forests during the period 2003–2016 had never been intercepted, despite relatively intensive border controls (Nahrung and Carnegie 2021). Therefore, the development of new strategies to detect such unanticipated and unregulated species as early as possible is essential to implement rapid and effective eradication or containment measures (Nahrung et al. 2023).

Deployment of traps baited with broad-spectrum semiochemical lures at ports-of-entry (Brockerhoff et al. 2006; Rassati et al. 2014, 2015a; Hoch et al. 2020) or other high-risk sites (e.g. urban wood-waste landfills and industrial sites, Rassati et al. 2015b; Rabaglia et al. 2019) could be one such early detection tool. Given the difficulty of predicting which species may arrive and in what numbers (i.e. propagule pressure), such lures should be efficient even at low population densities and should ideally attract multiple species from different taxa (family, subfamily, tribe). Combining pheromones of several species into blends could be expected to result in such a generic attraction when antagonistic effects amongst blend components are relatively minor, for example, reduced attraction of relatively few species, such that the net effect of blending multiple components is an increase in the number of target taxa detected. The addition of plant volatiles, acting as kairomones, may further enhance the attraction. For instance, a pine specialist, *Monochamus galloprovincialis* (Olivier), was significantly more attracted when its pheromone, monochamol, was combined with volatiles from its pine hosts (Alvarez et al. 2016). Similarly, ethanol had a synergist effect on the capture of species related to broadleaved trees in Eurasia (*Phymatodes testaceus* [L.]; Sweeney et al. 2014; Fan et al. 2019) and in southern USA (Miller et al. 2017). However, the addition of plant volatiles did not affect, either positively or negatively, the captures of several other cerambycid species (Fan et al. 2019). Overall, relationships between host volatiles and cerambycids are probably more dependent on the exploited host and less on insect taxonomy. Potential for using blended lures for detection would be further

enhanced if each component of the blend was attractive to multiple related species, i.e. a pheromone or kairomone shared by species within a genus or tribe as occurs in the longhorned beetle family Cerambycidae.

This large family of Coleoptera includes between 34,000 and 38,000 described species (Rossa and Goczał 2021; Tavakilian and Chevillotte 2022). Although recent molecular studies using a multigene approach revealed that the phylogeny at the upper taxonomic levels is not completely resolved and still under debate (Lee and Lee 2020; Nie et al. 2020), Tavakilian and Chevillotte (2022) recognised 13 subfamilies. The subfamily Lamiinae is by far the most diverse with more than 21,000 species, 3,002 genera and 86 tribes, followed by Cerambycinae (> 12,000 species, 1,848 genera, and 119 tribes), Lepturinae (> 1,830 species, 232 genera, 11 tribes), Prioninae (> 1,250 species, 311 genera, 26 tribes) and Spondylidinae (> 150 species, 32 genera, seven tribes); other subfamilies are smaller and much less diverse. Cerambycid larvae of many species develop as endophytic borers concealed beneath the bark of woody plants or, much less frequently, within herbaceous plants. This cryptic lifestyle, coupled with the usual long duration of the hidden larval stages, facilitates the transport of these insects around the world in logs and wooden packing materials (Eyre and Haack 2017), but also via trade in living plants if the plants have a sufficiently large diameter. For example, larvae of the citrus longhorned beetle, *Anoplophora chinensis* (Forster), were detected in Japanese maples, *Acer palmatum* Thunb., shipped to Europe (Eschen et al. 2015). Thus, a steadily increasing number of cerambycid species have become globally important as invasive forest and orchard pests (Venette and Hutchison 2021).

Recent advances in the chemical ecology of cerambycids and, particularly, the identification of volatile pheromones that act as long-range attractants, have provided new tools and opportunities for monitoring invasive woodborers. In total, pheromones or likely pheromones have been identified for more than 400 cerambycid species worldwide (Millar and Hanks 2017). Furthermore, field experiments have shown that these pheromones can be deployed in blends, with a potential generic attraction for both native and non-native species (Hanks et al. 2012; Hanks and Millar 2016; Hanks et al. 2018; Fan et al. 2019; Flaherty et al. 2019; Rassati et al. 2019). Currently, the aggregated data suggest that species in the subfamilies Cerambycinae, Lamiinae and Spondylidinae use male-produced aggregation-sex pheromones to attract both sexes, whereas species in the subfamilies Prioninae and Lepturinae use female-produced pheromones that attract only males (Hanks and Millar 2016). This research has revealed striking patterns in pheromone chemistry. Pheromone components are frequently highly conserved amongst species within genera, tribes and even at the subfamily level (Hanks and Millar 2013, 2016). For example, in the subfamily Lamiinae, hydroxyethers are used as aggregation-sex pheromones by many species native to different continents. Thus, 2-(undecyloxy)ethanol, or monochamol, is a pheromone component shared by European, North American and Asian species in the genus *Monochamus*, all of which vector the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus* [Steiner & Buhner]) (Pajares et al. 2010; Hanks and Millar 2016; Boone et al. 2018; Lee et al. 2018). In addition, field trials in southern China showed that four lamiine species in genera other



than *Monochamus* were attracted to monochamol (Wickham et al. 2014). A number of other compounds are widely shared amongst species within a given subfamily in different world regions. For example, terpenoids such as fuscumol (*[E]*-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-ol) and its acetate, are aggregation sex-pheromone components for many species in the subfamily Spondylidinae and Lamiinae (Mitchell et al. 2011; Hanks and Millar 2016). In contrast, many species in the subfamily Cerambycinae from different continents utilise short-chain (6–10 carbon) hydroxyketones, such as 3-hydroxyalkan-2-ones and 2-hydroxyalkan-3-ones and the corresponding *syn*- and *anti*-2,3-alkanediols as aggregation-sex pheromones (Hanks and Millar 2016). Prionic acid (*[3R,5S]*-3,5-dimethyldodecanoic acid) similarly appears to be shared as a sex pheromone by several genera of the subfamily Prioninae on different continents (Barbour et al. 2011; Wickham et al. 2016a). This sharing of pheromone components by species in different world regions suggests that traps baited with these compounds have a good chance of detecting non-native, phylogenetically-related invaders that are introduced to another continent. Moreover, combining several of these pheromone components in a single blend has the potential to detect a broader range of species.

During the last 10 years, the generic effectiveness of such multi-component blends has been tested on different continents, but using different pheromone combinations, either alone or in combination with kairomones, such as ethanol and  $\alpha$ -pinene (e.g. Miller et al. 2017; Fan et al. 2019). In Illinois, USA, Hanks et al. (2012) first tested a six-component blend, which included racemic 3-hydroxyhexan-2-one, *syn*- and *anti*-2,3-hexanediols, fuscumol, fuscumol acetate, monochamol and racemic 2-methylbutan-1-ol. Ten cerambycid species were caught in significant numbers in these trials, including four species in the subfamily Cerambycinae and six in the subfamily Lamiinae. Hanks et al. (2018) then tested this 6-component blend at a larger scale in several regions of the USA, adding both prionic acid and plant volatiles to the traps. The pheromone blend attracted about twice as many species as any of the individual components and the species attracted by the blend included three subfamilies, whereas individual components attracted species within only one subfamily. The inclusion of prionic acid also resulted in the additional captures of *Prionus* spp. which were not trapped by the previous six-pheromone blend. In a natural reserve in Yunnan (China), Wickham et al. (2021) trapped 71 species with another generic lure comprised of six components, three of which were the same as those used in the USA (*anti*-2,3-hexanediol, racemic 3-hydroxyhexan-2-one and monochamol). In France, using an 8-pheromone blend consisting of the same compounds as Hanks et al. (2018) to which was added geranylacetone targeting Spondylinae (Halloran et al. 2018), Fan et al. (2019) trapped 118 species, of which 114 were native species that represented 48% of the French cerambycid fauna. Trapping more than 50% of the species in 25 of the 41 cerambycid tribes present in the country indicates a considerable generic attraction of this 8-pheromone blend, significantly higher than an earlier trial which tested a blend of four pheromones. By contrast, unbaited control traps deployed in the same French sites caught very few species. Other trials of potentially generic blends, including fewer or different

compounds, were carried out in Russia (Sweeney et al. 2014), Australia (Hayes et al. 2016), Brazil (Silva et al. 2017), Poland, Italy and Canada (Flaherty et al. 2019; Rassati et al. 2019, 2021). Results from Australia differed from those reported in other continents because the tested blend attracted no more species than 3-hydroxyhexan-2-one alone (Hayes et al. 2016).

When using multi-pheromone blends, antagonistic effects might occur with either pheromone components or host plant volatiles (e.g. Hanks et al. 2018; Rassati et al. 2021). The North American species *Neoclytus acuminatus acuminatus* (F.), for example, was strongly attracted by *syn*-2,3-hexanediol, but the addition of racemic 3-hydroxyhexan-2-one to the latter pheromone interrupted attraction (Rassati et al. 2021). Addition of host plant volatiles, such as ethanol, significantly enhanced attraction of some cerambycid species (Sweeney et al. 2014; Miller et al. 2017; Hanks et al. 2018), but, with the exception of *P. testaceus*, had little effect on catch of cerambycid species in other studies (Fan et al. 2019). However, as long as inhibition did not completely prevent attraction, one trap with a multi-pheromone lure may still be somewhat more cost-effective than deploying multiple traps baited with individual lures. This can be assessed by a cost-benefit analysis, i.e. estimating the labour and materials costs of deploying and servicing a network of traps baited with single components, versus the costs of deploying and servicing a single trap baited with a blend of the same components.

Results of these different experiments on various continents stimulated us to propose a worldwide trapping programme using a standardised 'generic' 8-pheromone blend in all countries/trapping sites. The blend included the following compounds known to be widely shared amongst cerambycids of related taxa: fuscumol, fuscumol acetate, monochamol, geranylacetone, *anti*-2,3-hexanediol, 3-hydroxyhexan-2-one (C6-ketol), 2-methylbutan-1-ol and prionic acid. The programme relied on the following hypotheses: 1) if a species is attracted in significant numbers by the blend in a region, it increases the probability that it can be detected when it arrives at ports-of-entry in other regions and 2) if the blend exerts an effective, generic attraction to multiple species, it is likely that previously unknown and unexpected species can be captured due to the high degree of conservation of pheromone structures within related taxa, as described above. Our overarching objective was to build a global database of cerambycid species trapped by the 8-pheromone blend. To this end, field trials were conducted during 2018–2021 using operational protocols that were standardised as much as possible at all sites worldwide to cover simultaneously or sequentially 13 European countries, 10 Chinese provinces and some regions of the USA, Canada, Australia, Russia (Siberia) and the Caribbean. Over the course of the study, we also tested the possibility of adding new compounds to enlarge the pool of species trapped. Therefore, in 2020, two additional pheromones, the sex-aggregation pheromones trichoferone (a hydroxyketone pheromone of the velvet longhorned beetle, *Trichoferus campestris* (Faldermann) (Ray et al. 2019) and (*E*)-2-*cis*-6,7-epoxynonenal, the pheromone of the invasive species *A. bungii* (Xu et al. 2017), were added to the original 8-pheromone blend and tested in France and China. In addition, ethanol and  $\alpha$ -pinene were included in most trials as synergists for some cerambycids.



## Materials and methods

### Study sites

The successive or parallel development of three European research projects (HOMED, MULTITRAP, SAMFIX) and two French projects (CANOPEE, PORTRAP) during 2018–2021 allowed us to carry out field trials at 302 sites distributed as follows: 244 in Europe (164 in France, 22 in Italy, 13 in Spain and Switzerland, 6 in Portugal, 5 in Austria and England, 4 in Greece and Slovenia, 3 in the Netherlands, 2 in Bulgaria and the Czech Republic and 1 in Sweden), 38 in Asia (35 in China and three in Siberia, Russia), 11 in North America (10 in the USA and one in Canada), five in the Caribbean (Martinique) and four in Australia (see Table 1 and Suppl. material 1 for details per country, coordinates and the relevant research project). A total of 1308 traps were deployed in stands of broad-leaved and/or coniferous trees in natural or managed environments, but also within and nearby potential ports-of-entry (maritime and fluvial ports, airports, national markets). Experiments in these latter sites usually included two traps placed on trees planted within the port and two traps placed in woody areas located within a 1 km-radius from the port, except in 2019 when a larger experiment was carried out (see below).

In 2018, trials were limited to four European countries (Austria, England, France, the Netherlands), including 41 sites with 143 traps. The 2019 trials were much more extensive and involved 12 European countries (the four from 2018, supplemented by Bulgaria, the Czech Republic, Greece, Italy, Portugal, Spain, Sweden and Switzerland), five provinces of China (Beijing, Hebei, Liaoning, Yunnan and Zhejiang), two States of the USA (Michigan and Ohio) and one site in Canada (Nova Scotia), resulting in a total of 79 sites and 626 traps. These 2019 trials included a large trapping programme targeting semi-urban forests located close to ports-of-entry in Europe, USA and Canada where 16 (Czech Republic, Portugal, Sweden) or 32 traps (France, Italy, Nova Scotia, Ohio, Switzerland) were deployed at each target site. The 2020 trials were substantially impacted by the COVID-19 pandemic, but were carried out for at least a part of the spring–summer season in six European countries (France, Greece, Italy, Portugal, Spain and Switzerland), eight provinces of China (those of 2019, except Beijing, to which were added Hunan, Inner Mongolia, Jiangxi and Shandong) and extended to Australia (New South Wales) and the Caribbean (Martinique), resulting in a total of 78 sites and 256 traps. The 2021 trials were deployed in the same countries as in 2020, supplemented by an additional European country (Slovenia), Russia (Siberia) and an additional province of China (Gansu), resulting in a total of 104 sites and 283 traps.

### Trapping protocol and 8-pheromone blend

Trials at all sites used either multifunnel or cross-vane panel traps supplied by different companies depending on the country (Econex, Spain; ChemTica Internacional, S.A., Heredia, Costa Rica; Alpha Scents Inc., West Linn, Oregon, USA). Cross-vane traps used in Italy (Colli Euganei area) in 2019 were hand-made (see Cavaletto et al. 2021 for

details). Black traps were generally deployed, but other colours were also used in France, Italy, Nova Scotia, Ohio and Switzerland (see Table 1). To improve trapping efficiency, all traps were coated with Fluon (AGC Chemicals Europe Ltd., Thornton Cleveleys, UK) diluted in 1:6 in water (Graham et al. 2010). In forests, traps were usually hung from tree branches or between two trees in the lower canopy, at ~ 3–5 m high. Exceptions are some of the countries involved in the 2019 trapping programme targeting semi-urban forests (i.e. Czech Republic, France, Canada, Italy, Portugal, Sweden, Switzerland and the USA) where traps were placed both in the understory and in the upper canopy (> 20 m), the trial carried out in Italy (Colli Euganei area) in 2019 where traps were placed at 5–7 m above the ground and the trappings carried out in some forests of north-central France during 2019–2021 where traps were placed in the upper canopy (> 20 m). Each trap was separated from the next by 50 m at least and traps were preferentially placed at the forest edge. In ports-of-entry, the traps were attached to branches of available trees, at least 2 m above ground with a minimum distance between traps of 100 m. A similar design was used for the traps placed within the 1 km-radius from the ports-of-entry. Duration of trap deployments were variable amongst sites and years, but in the Northern Hemisphere, experiments were mostly conducted from mid-April at the earliest to mid-October at the latest, except in 2020 when the COVID-19 pandemic delayed the onset of trapping until mid-June or mid-July. In Australia, traps were deployed from December to March, depending on the year. Detailed trap heights and trapping duration by site are provided in the Suppl. material 1.

All lures were prepared by INRAE before being shipped to all study participants. These lures consisted of a blend designed by Fan et al. (2019), which contains eight cerambycid pheromones (fusicumol, fusicumol acetate, monochamol, 3-hydroxyhexan-2-one, *anti*-2,3-hexanediol and 2-methylbutan-1-ol, all at 50 mg/ml; geranylacetone-25 mg/ml; and prionic acid- 0.5 mg/ml; Table 2) dissolved in isopropanol as a carrier to a total volume of 1 ml per lure. The blend composition was expected to attract a large number of cerambycid subfamilies and tribes according to Hanks et al. (2012), (Table 2). Dispensers consisted of a cotton dental pad (to serve as a reservoir and stabilise release rate) placed into a polyethylene sachet (Minigrip, 4 cm × 6 cm × 60 µ; Dutscher, Brumath, France) and dosed with 1 ml of the lure solution. The release rate was estimated by Fan et al. (2019) as  $0.0263 \pm 0.002$  g/d under 20 °C conditions. A dispenser was hung in the centre of each trap.

All primary compounds were obtained from ChemTica Internacional, except prionic acid, which was purchased from Alpha Scents Inc. Commercial high release rate ethanol (100 ml dose, 96% purity, release rate 2 g/day at 20 °C; Econex, Spain) and  $\alpha$ -pinene lures (25 ml dose, 98% purity, release rate 0.3 g/day at 20 °C; Econex, Spain) were added to traps in most trials (1076 of the 1308 traps; Table 1). These compounds are known to synergise attraction of some cerambycid species to their pheromones (e.g. Allison et al. 2012; Ryall et al. 2015; Collignon et al. 2016; Miller et al. 2017), but are mildly repellent for others (Collignon et al. 2016). Trap catches were tabulated every 3–4 wk, at which time the pheromone lures were replaced. The ethanol UHR and  $\alpha$ -pinene lures, when added, were replaced every 6 wk.



Region	Year	Country/ Province	Project	No Sites	No Traps	Blend			Trap type				Trap color				Collection type		
						#8	#8+ET	#8+AP+ET	#10+AP+ET	MF	CV	B	G	BG	P	Y	Other	W	D
Asia	2019	China/Hebei	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2019	China/InnerMongolia	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2019	China/Liaoning	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2019	China/Yunnan	H	1	4	0	0	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Asia	2019	China/Zhejiang	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2020	China/Hebei	H	4	12	0	0	12	0	12	0	12	0	0	0	0	0	0	12
Asia	2020	China/Hunan	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2020	China/Inner Mongolia	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2020	China/Jiangxi	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2020	China/Liaoning	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2020	China/Shandong	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2020	China/Yunnan	H	1	4	0	0	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Asia	2020	China/Zhejiang	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Beijing	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Gansu	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Hebei	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2021	China/Hunan	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Inner Mongolia	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2021	China/Jiangxi	H	2	6	0	0	6	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	6
Asia	2021	China/Liaoning	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Shandong	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	China/Yunnan	H	3	5	0	0	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0	0	5
Asia	2021	China/Zhejiang	H	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	2021	Russia/Siberia	H	3	3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
Asia	Total			38	106	3	0	92	11	106	0	106	0	0	0	0	0	0	106
North America	2019	USA/ Michigan	H	9	18	18	0	0	0	18	0	18	0	0	0	0	0	0	18
North America	2019	USA/ Ohio	H	1	32	0	0	32	0	32	0	32	0	16	16	0	0	0	32
North America	2019	Canada/ Nova Scotia	H	1	32	0	0	32	0	32	0	32	0	16	16	0	0	0	32
North America	Total			11	82	18	0	64	0	82	0	82	0	50	32	0	0	0	82
The Caribbean	2020	France/ Martinique	H	2	3	3	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
The Caribbean	2021	France/ Martinique	H	3	4	4	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
The Caribbean	Total			5	7	7	0	0	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0	7
Australia	2020	Australia	H	2	4	0	0	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Australia	2021	Australia	H	2	4	0	0	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Australia	Total			4	8	0	0	8	0	8	0	8	0	0	0	0	0	0	8
Grand total				302	1308	80	128	884	216	1088	220	802	284	37	63	44	64	587	721

**Table 2.** Composition of the 8-pheromone and 10-pheromone blends and targeted sex and cerambycid tribes.

Blend	Compound	Amount/lure (mg/ml)	Target Sex	Target			References
				subfamily	tribe/ genus	genus	
8-pheromones	Racemic 3-hydroxyhexan-2-one (C6-ketol)	50	M/F	X	X	Callidiini	Millar et al. (2018)
						Clytini	Hanks and Millar (2013), Wickham et al. (2014), Bobadoye et al. (2019)
						Hesperophanini	unpub data JGM
						Hylotropini	Reddy et al. (2005)
8-pheromones	Racemic 2-methylbutan-1-ol	50	M/F	X	X	Callidiini	Hanks et al. (2018)
8-pheromones	2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *-2,3-hexanediol	50	M/F	X	X	Clytini	Hanks and Millar (2013), Wickham et al. (2014)
8-pheromones	Racemic fuscumol + fuscumol acetate	50+ 50	M/F	X	X	O briini	Millar et al. (2018)
						Acanthocinini	Millar et al. (2018)
						Acanthoderini	Hanks and Millar (2013)
8-pheromones	Monochamol	50	M/F	X	X	A semini	Millar et al. (2018)
						Monochamini	Hanks et al. (2018)
8-pheromones	Geranylacetone	25	M/F	X	X	Lamiini	Wickham et al. (2014)
						Acanthocinini	Meier et al. (2016, 2019)
8-pheromones	Prionic acid (4 stereoisomers)	05	M	X	X	A semini	Halloran et al. (2018)
						Prioniini	Barbour et al. (2011)
10-pheromones	Racemic trichoferone	25	M/F	X	X	<i>Trichoferus</i>	Ray et al. (2019)
10-pheromones	( <i>E</i> )-2- <i>cis</i> -6,7-epoxynonal	50	M/F	X	X	<i>Aromia</i>	Xu et al. (2017)

In most cases, the trapped insects were killed using a section of mesh impregnated with  $\alpha$ -cypermethrin insecticide (Storanet, BASF Pflanzenschutz Deutschland, Germany) placed into the trap basins, whose bottoms had been replaced with a wire mesh to allow drainage and to keep specimens dry. However, in the targeted 2019 experiment in forests near ports-of-entry and in the Colli Euganei area (Italy), “wet” trap basins were used, containing water-diluted propylene glycol (50%) to act as a surfactant and preservative. In the trials conducted in Ohio and Michigan, trap collection cups were filled with ~ 200–400 ml of undiluted propylene glycol.

Trapped cerambycids were identified to species by local specialists or sent to INRAE for identification. However, specimens trapped in Australia could not be sent due to restrictions by the customs agency and so most could only be identified to the genus level. Nomenclature used in this article follows the reference checklist of the world database Titan (Tavakilian and Chevillotte 2022).

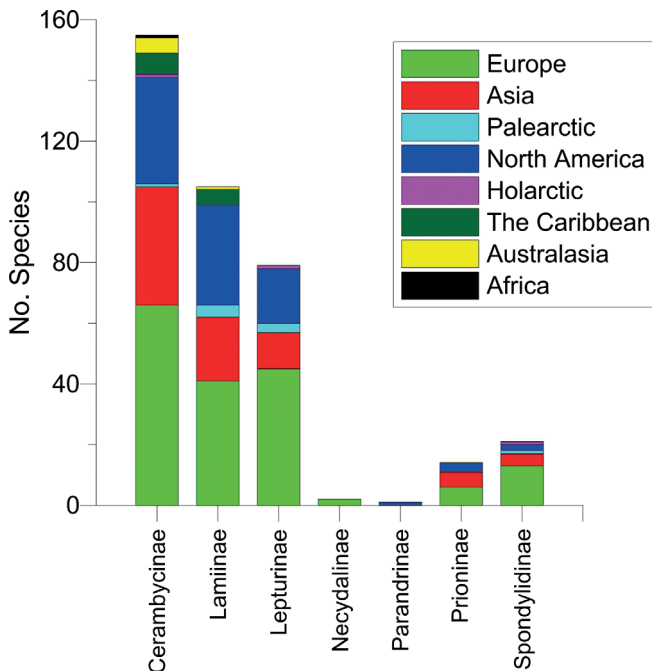
### Preliminary tests of a 10-pheromone blend

In 2020 and 2021, two additional pheromones, trichoferone (the pheromone of *T. campestris*) and (*E*)-2-*cis*-6,7-epoxynonal (the pheromone of *A. bungii*), were added to the 8-pheromone lures used in France and China, to test for a possible increase in

monitoring effectiveness with a 10-pheromone blend (Table 2). Both compounds were synthesised by YFZ and JGM at the University of California, Riverside, using previously-reported syntheses (Ray et al. 2019; Xu et al. 2017, respectively). Lure preparation and insect collection procedures were similar to those described above. Captures were compared with those of the 8-pheromone blend at six sites in France during 2020 by deploying five pairs of traps baited with each blend at each site. The traps were spaced ~ 100 m apart and rotated at each insect collection, which enabled the number of collection dates at each site to be used as replicates. The Student *t*-test for paired samples was then applied to compare the number of species trapped by each lure.

## Results

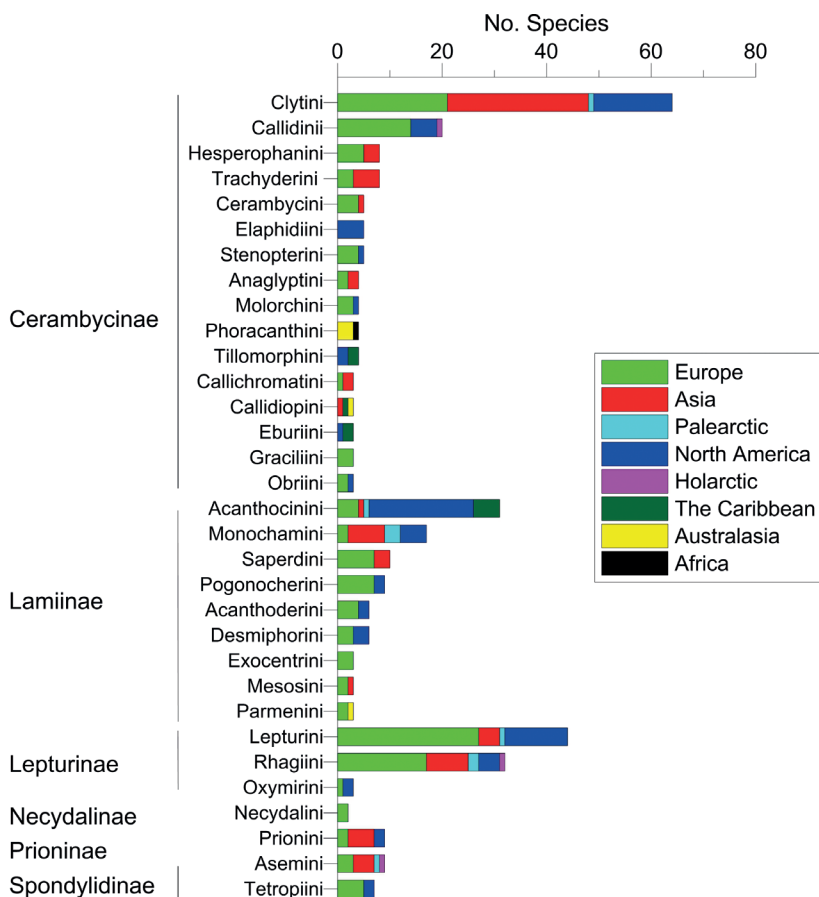
A total of 78,321 longhorned beetles were trapped, representing 376 species, including 373 Cerambycidae, two Vesperidae and one Disteniidae species (Table 3). The cerambycids belonged to eight subfamilies, including 156 species of Cerambycinae, 102 species of Lamiinae, 78 species of Lepturinae, 21 species of Spondylidinae, 12 species of Prioninae, two species of Necydalinae and one species of Parandrinae (Fig. 1). Captures comprised 60 tribes, with 10 tribes including more than nine species trapped on different continents; in decreasing order the tribe Clytini (64 spp.), followed by Lepturini (44 spp.), Rhagiini (32 spp.), Acanthocinini (31 spp.), Callidiini (20 spp.), Monochamini (18 spp.), Saperdini (10 spp.) and Asemnini, Pogonocherini and Prionini (nine spp.



**Figure 1.** Number of species trapped per subfamily and their region of origin.

each; Fig. 2). Generally, fewer species were trapped in the Caribbean and Australia, where only a limited number of traps had been deployed. Some of the captured species belonged to tribes other than those targeted, such as Callidiopini (*Curtomerus flavus* [F.] in Martinique and *Bethelium* sp. in Australia), Eburini (*Eburia* spp. in Martinique) and Tillomorphi (*Gourbeyrella madininae* Chalumeau & Touroult in Martinique).

Most tribes included species from the same genera trapped on different continents (Fig. 2). For example, 19 species of the Clytini genus *Xylotrechus* were captured, including 10 in Asia, five in Europe and four in North America. In the same tribe, 12 species of *Chlorophorus* were captured, of which eight were caught in Europe and four in Asia. A total of 12 *Monochamus* species (Lamiinae, Monochamini) were trapped, including five species in Asia, four in North America and three in Europe. The Callidiini genus *Phymatodes* was represented by 11 species, including seven in Europe and four in North America. A number of these species had not been trapped before by any semiochemically-baited trap (e.g. *X. chinensis*, *Chlorophorus glabromaculatus* [Goeze] and *Phymatodes pusillus* [F.] ).



**Figure 2.** Number of species trapped per tribe in decreasing order and their native region. Only the tribes where > 3 spp were captured are shown.

**Table 3.** Names of trapped species, origin and specimen numbers captured per continent. Species in bold were trapped in non-native continents.

Subfamily	Tribe	Species	Origin	Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	Total
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Anaglyptus gibbosus</i> (Fabricius, 1787)	Europe	105	0	0	0	0	105
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Anaglyptus mysticus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	116	0	0	0	0	116
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Cyrtophorus verrucosus</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	197	0	0	197
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Microclytus compressicollis</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1841)	North America	0	0	2	0	0	2
Cerambycinae	Bothriospilini	<i>Chlorida festiva</i> (Linnaeus, 1758)	Caribbean	0	0	0	0	2	2
Cerambycinae	Callichromatini	<i>Aromia bungii</i> Faldermann, 1835	Asia	0	25	0	0	0	25
Cerambycinae	Callichromatini	<i>Aromia moschata</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	30	0	0	0	0	30
Cerambycinae	Callichromatini	<i>Aromia moschata orientalis</i> Plavilstshikov, 1933	Asia	0	3	0	0	0	3
Cerambycinae	Callidiini	<i>Callidium aeneum</i> (Degeer, 1775)	Holarctic	120	79	0	0	0	199
Cerambycinae	Callidiini	<i>Callidium violaceum</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	3	0	0	0	0	3
Cerambycinae	Callidiini	<i>Lioderina linearis</i> (Hampe, 1870)	Europe	3	0	0	0	0	3
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes aereus</i> (Newman, 1838)	North America	0	0	14	0	0	14
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes alni</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	2295	0	0	0	0	2295
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes amoenus</i> (Say, 1824)	North America	0	0	3100	0	0	3100
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes dimidiatus</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	55	0	0	55
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes fasciatus</i> (Villers, 1789)	Europe	6	0	0	0	0	6
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes glabratus</i> (Charpentier, 1825)	Europe	3	0	0	0	0	3
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes lividus</i> (Rossi, 1794)	Europe	7	0	0	0	0	7
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes pusillus</i> (Fabricius, 1787)	Europe	37	0	0	0	0	37
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes rufipes</i> (Fabricius, 1776)	Europe	3	0	0	0	0	3
Cerambycinae	Callidiini	<b><i>Phymatodes testaceus</i> (Linnaeus, 1758)</b>	Europe	15085	0	41	0	0	15126
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes varius</i> (Fabricius, 1776)	North America	0	0	29	0	0	29
Cerambycinae	Callidiini	<i>Physocnemum brevilineum</i> (Say, 1824)	North America	0	0	4	0	0	4
Cerambycinae	Callidiini	<i>Pyrrhidium sanguineum</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	4388	0	0	0	0	4388
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus clavipes</i> (Fabricius, 1775)	Europe	69	0	0	0	0	69
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus femoratus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	35	0	0	0	0	35
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus macropus</i> (Germar, 1823)	Europe	21	0	0	0	0	21
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus varini</i> (Bedel, 1870)	Europe	1	0	0	0	0	1
Cerambycinae	Callidiopini	<i>Bethelium</i> sp.	Australasia	0	0	0	5	0	5
Cerambycinae	Callidiopini	<i>Curtomerus flavus</i> (Fabricius, 1775)	Caribbean	0	0	0	0	7	7
Cerambycinae	Callidiopini	<i>Stenodryus claviger</i> Bates, 1873	Asia	0	1	0	0	0	1
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx cerdo</i> Linnaeus, 1758	Europe	20	0	0	0	0	20
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx miles</i> Bonelli, 1812	Europe	3	0	0	0	0	3
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx scopoli</i> Fueßlins, 1775	Europe	141	0	0	0	0	141
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx welenii</i> (Küster, 1845)	Europe	22	0	0	0	0	22
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Nadezhdella cantori</i> (Hope, 1842)	Asia	0	1	0	0	0	1
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus figuratus</i> (Scopoli, 1763)	Europe	42	0	0	0	0	42
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus glabromaculatus</i> (Goeze, 1777)	Europe	1391	0	0	0	0	1391
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus glaucus</i> (Fabricius, 1781)	Europe	36	0	0	0	0	36
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus herbstii</i> (Brahm, 1790)	Europe	6	0	0	0	0	6
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus miuui</i> Gressitt, 1936	Asia	0	9	0	0	0	9
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus motschulskyi</i> (Ganglbauer, 1887)	Asia	0	7	0	0	0	7
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus ruficornis</i> (Olivier, 1790)	Europe	41	0	0	0	0	41
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus sartor</i> (Müller, 1766)	Europe	482	0	0	0	0	482
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus signaticollis</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1836)	Asia	0	1	0	0	0	1
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus tredecimmaculatus</i> (Chevrolat, 1863)	Asia	0	2	0	0	0	2
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus trifasciatus</i> (Fabricius, 1781)	Europe	33	0	0	0	0	33



Subfamily	Tribe	Species	Origin	Origin						Total
				Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia		
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus varius</i> (Müller, 1766)	Europe	36	0	0	0	0	36	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytoleptus albofasciatus</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1841)	North America	0	0	6	0	0	6	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus arietis</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	52	0	0	0	0	52	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus lama</i> Mulsant, 1850	Europe	123	0	0	0	0	123	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus rhamni</i> Germar, 1817	Europe	85	0	0	0	0	85	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus ruricola</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	25	0	0	25	
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus tropicus</i> (Panzer, 1795)	Europe	73	0	0	0	0	73	
Cerambycinae	Clytini	<i>Cytochlytus capra</i> (Germar, 1823)	Asia	0	24	0	0	0	24	
Cerambycinae	Clytini	<i>Cytochlytus caproides</i> (Bates, 1873)	Asia	0	5	0	0	0	5	
Cerambycinae	Clytini	<i>Demonax diversefasciatus</i> Pic, 1920	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Demonax nanseniensis</i> Pic 1903	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Demonax</i> sp. 1	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Demonax</i> sp. 2	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Glycobius speciosus</i> (Say, 1824)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Isotomus speciosus</i> (Schneider, 1787)	Europe	1	0	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Megacyllene caryae</i> (Gahan, 1908)	North America	0	0	22	0	0	22	
Cerambycinae	Clytini	<b><i>Neochlytus acuminatus acuminatus</i> (Fabricius, 1775)</b>	North America	37	0	28	0	0	65	
Cerambycinae	Clytini	<i>Neochlytus caprea</i> (Say, 1824)	North America	0	0	3	0	0	3	
Cerambycinae	Clytini	<i>Neochlytus leucozonus</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1841)	North America	0	0	15	0	0	15	
Cerambycinae	Clytini	<i>Neochlytus mucronatus mucronatus</i> (Fabricius, 1775)	North America	0	0	323	0	0	323	
Cerambycinae	Clytini	<i>Neochlytus muricatus</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Neochlytus scutellaris</i> (Olivier, 1790)	North America	0	0	2	0	0	2	
Cerambycinae	Clytini	<i>Perissus paulonotatus</i> (Pic, 1902)	Asia	0	21	0	0	0	21	
Cerambycinae	Clytini	<i>Plagionotus arcuatus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	95	0	0	0	0	95	
Cerambycinae	Clytini	<i>Plagionotus christophi</i> (Kraatz, 1879)	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Plagionotus detritus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	299	0	0	0	0	299	
Cerambycinae	Clytini	<i>Pseudosphegistes cinerea</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1841)	Europe	27	0	0	0	0	27	
Cerambycinae	Clytini	<i>Raphuma anongi</i> Gressitt & Rondon, 1970	Asia	0	96	0	0	0	96	
Cerambycinae	Clytini	<i>Raphuma gracilipes</i> (Faldermann, 1835)	Asia	0	24	0	0	0	24	
Cerambycinae	Clytini	<i>Raphuma laosica</i> Gressitt & Rondon, 1970	Asia	0	22	0	0	0	22	
Cerambycinae	Clytini	<i>Raphuma</i> sp.	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Rhabdochlytus acutivittis</i> (Kraatz, 1879)	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Sarosthes fulminans</i> (Fabricius, 1775)	North America	0	0	39	0	0	39	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus antilope</i> (Schönherr, 1817)	Europe	1303	0	0	0	0	1303	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus antilope</i> var <i>sekerai</i> Podány, 1970	Europe	16	0	0	0	0	16	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus arvicola</i> (Olivier, 1800)	Europe	379	0	0	0	0	379	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus atronotatus</i> Pic, 1917	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus buqueti</i> (Laporte de Castelnau & Gory, 1841)	Asia	0	38	0	0	0	38	
Cerambycinae	Clytini	<b><i>Xylotrechus chinensis</i> (Chevrolat, 1852)</b>	Asia	41	3	0	0	0	44	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus clarinus</i> Bates, 1884	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus colonus</i> (Fabricius, 1775)	North America	0	0	484	0	0	484	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus gratus</i> Viktora, 2020	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus integer</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus latefasciatus ochroceps</i> Gressitt, 1951	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus magnicollis</i> (Fairmaire, 1888)	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus pantherinus</i> (Savenius, 1825)	Europe	1	0	0	0	0	1	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus pekingensis</i> Pic, 1939	Asia	0	1	0	0	0	1	

Subfamily	Tribe	Species	Origin							Total
				Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia		
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus rufilius</i> Bates, 1884	Asia	0	27	0	0	0	27	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus rusticus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe/Asia	161	1	0	0	0	162	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus sagittatus</i> (Germar, 1821)	North America	0	0	34	0	0	34	
Cerambycinae	Clytini	<b><i>Xylotrechus stebbingi</i> Gahan, 1906</b>	Asia	6089	0	0	0	0	6054	
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus undulatus</i> (Say, 1824)	North America	0	0	26	0	0	26	
Cerambycinae	Deilini	<i>Deilus fugax</i> (Olivier, 1790)	Europe	87	0	0	0	0	87	
Cerambycinae	Dryobiini	<i>Dryobius sexnotatus</i> Linsley, 1957	North America	0	0	2	0	0	2	
Cerambycinae	Eburiini	<i>Eburia dejeani</i> Gahan, 1895	Caribbean	0	0	0	0	2	2	
Cerambycinae	Eburiini	<i>Eburia octomaculata</i> Chevrolat, 1862	Caribbean	0	0	0	0	1	1	
Cerambycinae	Eburiini	<i>Eburia quadrigeminata</i> (Say, 1827)	North America	0	0	3	0	0	3	
Cerambycinae	Elaphidiini	<i>Anelaphus pumilus</i> (Newman, 1840)	North America	0	0	531	0	0	531	
Cerambycinae	Elaphidiini	<i>Anelaphus villosus</i> (Fabricius, 1793)	North America	0	0	8	0	0	8	
Cerambycinae	Elaphidiini	<i>Elaphidion mucronatum</i> (Say, 1824)	North America	0	0	110	0	0	110	
Cerambycinae	Elaphidiini	<i>Parelaphidion aspersum</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	3	0	0	3	
Cerambycinae	Elaphidiini	<i>Parelaphidion incertum</i> (Newman, 1840)	North America	0	0	4	0	0	4	
Cerambycinae	Graciliini	<i>Asinopalpis gracilis</i> (Krynicky, 1832)	Europe	8	0	0	0	0	8	
Cerambycinae	Graciliini	<i>Gracilia minuta</i> (Fabricius, 1781)	Europe	12	0	0	0	0	12	
Cerambycinae	Graciliini	<i>Penichroa fasciata</i> (Stephens, 1831)	Europe	41	0	0	0	0	41	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Gnatholea eburifera</i> Thomson, 1861	Asia	0	10	0	0	0	10	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Hesperophanes sericeus</i> (Fabricius, 1787)	Europe	8	0	0	0	0	8	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Stromatium auratum</i> (Böber, 1793)	Europe	7	0	0	0	0	7	
Cerambycinae	Hesperophanini	<b><i>Trichoferus campestris</i> (Faldermann, 1835)</b>	Asia	45	12	0	0	0	57	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus fasciculatus</i> (Faldermann, 1837)	Europe	135	0	0	0	0	135	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus guerryi</i> (Pic, 1915)	Asia	0	1	0	0	0	1	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus holosericeus</i> (Rossi, 1790)	Europe	187	0	0	0	0	187	
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus pallidus</i> (Olivier, 1790)	Europe	145	0	0	0	0	145	
Cerambycinae	Hylotropini	<i>Hylotropus bajulus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	79	0	0	0	0	79	
Cerambycinae	Molorchini	<i>Dolocerus reichii</i> Mulsant, 1862	Europe	1	0	0	0	0	1	
Cerambycinae	Molorchini	<i>Molorchus bimaculatus</i> Say, 1824	North America	0	0	122	0	0	122	
Cerambycinae	Molorchini	<i>Molorchus minor</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	15	0	0	0	0	15	
Cerambycinae	Molorchini	<i>Molorchus umbellatarum</i> (Schreber, 1759)	Europe	55	0	0	0	0	55	
Cerambycinae	Neobidionini	<i>Neocompsa cylindricollis</i> (Fabricius, 1798)	Caribbean	0	0	0	1	1	1	
Cerambycinae	Obrini	<i>Obrium brunneum</i> (Fabricius, 1793)	Europe	3	0	0	0	0	3	
Cerambycinae	Obrini	<i>Obrium cantharinum</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	44	0	0	0	0	44	
Cerambycinae	Obrini	<i>Obrium maculatum</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Phoracanthini	<b><i>Cordylomera spinicornis</i> (Fabricius, 1775)</b>	Africa	4	0	0	0	0	4	
Cerambycinae	Phoracanthini	<b><i>Phoracantha recurva</i> Newman, 1840</b>	Australasia	8	0	0	0	0	8	
Cerambycinae	Phoracanthini	<b><i>Phoracantha semipunctata</i> (Fabricius, 1775)</b>	Australasia	11	0	0	0	0	11	
Cerambycinae	Phoracanthini	<i>Thoris</i> sp.	Australasia	0	0	0	2	0	2	
Cerambycinae	Psebiini	<i>Nathrius brevipennis</i> (Mulsant, 1839)	Europe	649	0	0	0	0	649	
Cerambycinae	Pytheini	<i>Certallum ebulinum</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	1	0	0	0	0	1	
Cerambycinae	Rhopalophorini	<i>Rhopalophora longipes</i> (Say, 1824)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Stenomalini	<i>Stenomalus fenestratus</i> White, 1855	Asia	0	3	0	0	0	3	
Cerambycinae	Stenoderini	<i>Syllitus</i> sp.	Australasia	0	0	0	2	0	2	
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Callimoxys sanguinicollis</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	1	0	0	1	
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Callimus abdominalis</i> (Olivier, 1800)	Europe	11	0	0	0	0	11	
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Callimus angulatus</i> (Schrank, 1789)	Europe	1	0	0	0	0	1	
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Stenopterus ater</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	20	0	0	0	0	20	
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Stenopterus rufus</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	83	0	0	0	0	83	
Cerambycinae	Tillomorphiini	<i>Bonfilsia pejoti</i> Chalumeau & Tourout, 2004	Caribbean	0	0	0	0	1	1	

Subfamily	Tribe	Species	Origin	Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	Total
Cerambycinae	Tillomorphini	<i>Euderces picipes</i> (Fabricius, 1787)	North America	0	0	9	0	0	9
Cerambycinae	Tillomorphini	<i>Euderces pini</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	93	0	0	93
Cerambycinae	Tillomorphini	<i>Gourbeyrella madininae</i> Chalumeau & Tourout, 2004	Caribbean	0	0	0	0	3	3
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Anoplistes halodendri</i> (Pallas, 1773)	Asia	0	2	0	0	0	2
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Diclosternus corallinus</i> Gahan, 1900	Asia	0	3	0	0	0	3
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus budensis</i> (Götz, 1783)	Europe	18	0	0	0	0	18
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus globulicollis</i> Dejean, 1839	Europe	2	0	0	0	0	2
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus kaehleri</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	261	0	0	0	0	261
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus lituratus</i> Ganglbauer, 1887	Asia	0	1	0	0	0	1
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus temminckii</i> (Guérin-Ménéville, 1844)	Asia	0	10	0	0	0	10
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Amarysius atajensis</i> (Laxmann, 1770)	Asia	0	20	0	0	0	20
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Acanthocinus aedilis</i> (Linnaeus, 1758)	Europe/Asia	6	24	0	0	0	30
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Acanthocinus griseus</i> (Fabricius, 1793)	Europe/Asia	114	106	0	0	0	220
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Acanthocinus pusillus</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	21	0	0	21
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Ammiscus similis</i> (Gahan, 1895)	Caribbean	0	0	0	0	5	5
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Astyleiopus variegatus</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	11	0	0	11
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Astylidium parvum</i> (LeConte, 1873)	North America	0	0	17	0	0	17
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Astylopsis macula</i> (Say, 1827)	North America	0	0	47	0	0	47
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Astylopsis sexguttata</i> (Say, 1827)	North America	0	0	19	0	0	19
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Astylopsis</i> sp.	North America	0	0	2	0	0	2
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Graphisurus despectus</i> (LeConte, 1850)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Graphisurus fasciatus</i> (Degeer, 1775)	North America	0	0	86	0	0	86
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Graphisurus triangulifer</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Hyperplatys maculatus</i> Haldeman, 1847	North America	0	0	4	0	0	4
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Lagocheirus araneiformis insulorum</i> Dillon, 1957	Caribbean	0	0	0	0	4	4
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus fallaciosus</i> Holzschuh, 1993	Asia	0	5	0	0	0	5
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus femoratus</i> Fairmaire, 1859	Europe	3461	0	0	0	0	3461
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus linnei</i> Wallin, Nylander & Kvamme, 2009	Europe	548	0	0	0	0	548
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus nebulosus</i> (Linneus, 1758)	Europe	1473	0	0	0	0	1473
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leptostylus transversus</i> (Gyllenhal, 1817)	North America	0	0	101	0	0	101
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Lepturges angulatus</i> (LeConte, 1852)	North America	0	0	20	0	0	20
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Lepturges confluens</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	26	0	0	26
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Lepturges</i> sp.	North America	0	0	2	0	0	2
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Sternidius alpha</i> (Say, 1827)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Sternidius punctatus</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	1	0	0	1
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Sternidius rusticus</i> (LeConte, 1852)	North America	0	0	19	0	0	19
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Styloleptus posticalis</i> (Gahan, 1895)	Caribbean	0	0	0	0	1	1
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Trypanidius spilmani</i> Villiers, 1980	Caribbean	0	0	0	0	1	1
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Urgleptes cobbeni</i> Gilmour, 1963	Caribbean	0	0	0	0	1	1
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Urgleptes querci</i> (Fitch, 1859)	North America	0	0	2	0	0	2
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Urgleptes signatus</i> (LeConte, 1852)	North America	0	0	1	0	0	1
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus clavipes</i> (Schrank von Paula, 1781)	Europe	1412	0	0	0	0	1412
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus francottei</i> Sama, 1994	Europe	181	0	0	0	0	181
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus krueperi</i> (Kraatz, 1859)	Europe	7	0	0	0	0	7
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus modestus</i> (Blais, 1817)	North America	0	0	58	0	0	58
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus quadrigibbus</i> (Say, 1831)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Oplosia cinerea</i> (Mulsant, 1839)	Europe	63	0	0	0	0	63
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Oplosia nubila</i> (LeConte, 1862)	North America	0	0	4	0	0	4

Subfamily	Tribe	Species	Origin	Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	Total
Lamiinae	Agapanthiini	<i>Agapanthia cardui</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lamiinae	Agapanthiini	<i>Agapanthia villosiviridescens</i> (Degeer, 1775)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lamiinae	Apomecynini	<i>Apomecyna saltator</i> (Fabricius, 1787)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Ceroplesini	<i>Moechotypa diphysis</i> (Pascoe, 1871)	Asia	0	2	0	0	0	2
Lamiinae	Ceroplesini	<i>Thysia wallichii tonkinensis</i> (Kreische, 1924)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Anaethetis testacea</i> (Fabricius, 1781)	Europe	17	0	0	0	0	17
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Deroplia genei</i> (Aragona, 1830)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Deroplia troberti</i> (Mulsant, 1843)	Europe	3	0	0	0	0	3
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Eupogonius pauper</i> LeConte, 1852	North America	0	0	1	0	0	1
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Eupogonius tomentosus</i> (Haldeman, 1847)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Psenocerus supernotatus</i> (Say, 1824)	North America	0	0	9	0	0	9
Lamiinae	Dorcaschematini	<i>Dorcaschema cinereum</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	1	0	0	1
Lamiinae	Dorcaschematini	<i>Olenecamptus bilobus</i> (Fabricius, 1801)	Asia	0	3	0	0	0	3
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus adpersus</i> Mulsant, 1846	Europe	5	0	0	0	0	5
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus lusitanus</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	29	0	0	0	0	29
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus punctipennis</i> Mulsant & Guillebeau, 1856	Europe	28	0	0	0	0	28
Lamiinae	Lamiini	<i>Lamiomimus gotschei</i> Kolbe, 1886	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Lamiini	<i>Pharsalia subgemmata</i> (Thomson, 1857)	Asia	0	375	0	0	0	375
Lamiinae	Mesosini	<i>Mesosa curculionoides</i> (Linnaeus 1761)	Europe	37	0	0	0	0	37
Lamiinae	Mesosini	<i>Mesosa myops</i> (Dalman, 1817)	Asia	0	29	0	0	0	29
Lamiinae	Mesosini	<i>Mesosa nebulosa</i> (Fabricius, 1781)	Europe	132	0	0	0	0	132
Lamiinae	Monochamini	<i>Anoplophora beryllina</i> (Hope, 1840)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Monochamini	<i>Anoplophora chinensis</i> (Forster, 1771)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Monochamini	<i>Anoplophora glabripennis</i> (Motschulsky, 1854)	Asia	0	9	0	0	0	9
Lamiinae	Monochamini	<i>Microgoes oculatus</i> (LeConte, 1862)	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus alternatus</i> Hope, 1842	Asia	0	1246	0	0	0	1246
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus bimaculatus</i> Gahan, 1888	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus carolinensis</i> (Olivier, 1797)	North America	0	0	77	0	0	77
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus galloprovincialis</i> (Olivier, 1800)	Europe/Asia	6209	87	0	0	0	6296
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus maculosus</i> Haldeman, 1847	North America	0	0	3	0	0	3
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus notatus</i> (Drury, 1773)	North America	0	0	256	0	0	256
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus saltauarius</i> Gebler, 1830	Asia/Europe	13	985	0	0	0	998
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sartor</i> (Fabricius, 1787)	Europe	20	0	0	0	0	20
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sartor urusovii</i> (Fischer von Waldheim, 1806)	Asia/Europe	1	41	0	0	0	42
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus scutellatus</i> (Say, 1824)	North America	0	0	216	0	0	216
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sutor</i> (Linnaeus, 1758)	Europe/Asia	30	22	0	0	0	52
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sutor longulus</i> Pic, 1898	Asia	0	22	0	0	0	22
Lamiinae	Monochamini	<i>Urachia angusta</i> (Pascoe, 1857)	Asia	0	15	0	0	0	15
Lamiinae	Obereini	<i>Oberea linearis</i> (Linnaeus, 1761)	Europe	8	0	0	0	0	8
Lamiinae	Parmenini	<i>Mesolita</i> sp.	Australasia	0	0	0	3	0	3
Lamiinae	Parmenini	<i>Parmena balteus</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	7	0	0	0	0	7
Lamiinae	Parmenini	<i>Parmena unifasciata</i> (Rossi, 1790)	Europe	3	0	0	0	0	3
Lamiinae	Phytoeciini	<i>Phytoecia pustulata</i> (Schrank von Paula, 1776)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lamiinae	Phytoeciini	<i>Phytoecia nigricornis</i> (Fabricius, 1782)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus caroli</i> Mulsant, 1862	Europe	5	0	0	0	0	5
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus decoratus</i> Fairmaire, 1855	Europe	139	0	0	0	0	139
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus fasciculatus</i> (Degeer, 1775)	Europe	16	1	0	0	0	17
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus hispidulus</i> (Piller & Mitterpacher, 1783)	Europe	6	0	0	0	0	6

Subfamily	Tribe	Species	Origin	Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	Total
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus hispidus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	55	0	0	0	0	55
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus mixtus</i> Haldeman, 1847	North America	0	0	8	0	0	8
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus ovatus</i> (Goeze, 1777)	Europe	19	0	0	0	0	19
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus penicillatus</i> LeConte, 1850	North America	0	0	11	0	0	11
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus perroudi</i> Mulsant, 1839	Europe	127	0	0	0	0	127
Lamiinae	Pteropliini	<i>Niphona picticornis</i> Mulsant, 1839	Europe	127	0	0	0	0	127
Lamiinae	Pteropliini	<i>Sthenias gracilicornis</i> Gressitt, 1937	Europe	0	3	0	0	0	3
Lamiinae	Saperdini	<i>Menesia bipunctata</i> (Zoubkoff, 1829)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lamiinae	Saperdini	<i>Paraglenea fortunei</i> (Saunders, 1853)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda alberti</i> Plavilstshikov, 1915	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda hosokawai</i> Hasegawa, 2017	Asia	0	1	0	0	0	1
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda octopunctata</i> (Scopoli, 1772)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda perforata</i> (Pallas, 1773)	Europe	21	0	0	0	0	21
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda populnea</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	4	0	0	0	0	4
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda scalaris</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	24	0	0	0	0	24
Lamiinae	Saperdini	<i>Stenostola dubia</i> (Laicharting, 1784)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lamiinae	Saperdini	<i>Stenostola ferrea</i> (Schrank von Paula, 1776)	Europe	28	0	0	0	0	28
Lepturinae	Lepturini	<i>Alosterna tabacicolor</i> (Degeer, 1775)	Europe	9	0	0	0	0	9
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia dubia</i> (Scopoli, 1763)	Europe	6	0	0	0	0	6
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia reyi</i> (Heyden, 1889)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia sanguinolenta</i> (Linnaeus 1761)	Europe	13	0	0	0	0	13
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia scotodes continentalis</i> (Plavilstshikov, 1936)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Anoplodera rufipes</i> (Schaller, 1783)	Europe	5	0	0	0	0	5
Lepturinae	Lepturini	<i>Anoplodera sexguttata</i> (Fabricius, 1775)	Europe	9	0	0	0	0	9
Lepturinae	Lepturini	<i>Brachyleptura brevis</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Brachyleptura circumdata</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Brachyleptura rubrica</i> (Say, 1824)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura thoracica</i> Creutzer, 1799	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura aethiops</i> Poda von Neuhaus, 1761	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura aurulenta</i> Fabricius, 1793	Europe	7	0	0	0	0	7
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura quadrifasciata</i> Linnaeus, 1758	Europe	9	0	0	0	0	9
Lepturinae	Lepturini	<i>Nealosterna capitata</i> (Newman, 1841)	North America	0	0	2	0	0	2
Lepturinae	Lepturini	<i>Pachytodes erraticus</i> (Dalman, 1817)	Europe	232	0	0	0	0	232
Lepturinae	Lepturini	<i>Panacorymbia fulva</i> (Degeer, 1775)	Europe	8	0	0	0	0	8
Lepturinae	Lepturini	<i>Panacorymbia hybrida</i> (Rey, 1885)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Pedostrangalia revestita</i> (Linnaeus, 1767)	Europe	12	0	0	0	0	12
Lepturinae	Lepturini	<i>Pseudovadonia livida</i> (Fabricius, 1776)	Europe	5	0	0	0	0	5
Lepturinae	Lepturini	<i>Rutpela maculata</i> (Poda von Neuhaus, 1761)	Europe	74	0	0	0	0	74
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella nigra</i> (Linnaeus 1758)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella bifasciata</i> (Müller, 1776)	Europe	16	0	0	0	0	16
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella septempunctata</i> (Fabricius, 1793)	Europe	5	0	0	0	0	5
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella melanura</i> (Linnaeus 1758)	Europe	33	0	0	0	0	33
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura canadensis</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	8	0	0	8
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura cordigera</i> (Fueßlins, 1775)	Europe	203	0	0	0	0	203
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura erythroptera</i> (Hagenbach, 1822)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura fontenayi</i> (Mulsant, 1839)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura maculicornis</i> (Degeer, 1775)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura rubra</i> (Linnaeus, 1758)	Europe/asia	11	1	0	0	0	12
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura scutellata</i> (Fabricius, 1781)	Europe	29	0	0	0	0	29
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura succedanea</i> (Lewis, 1879)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura trisignata</i> (Fairmaire, 1852)	Europe	7	0	0	0	0	7
Lepturinae	Lepturini	<i>Strangalepta abbreviata</i> (Germar, 1823)	North America	0	0	1	0	0	1

Subfamily	Tribe	Species	Origin	Total					
				Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	Total
Lepturinae	Lepturini	<i>Strangalia attenuata</i> (Linnaeus 1758)	Europe	1	0	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Strangalia luteicornis</i> (Fabricius, 1775)	North America	0	0	4	0	0	4
Lepturinae	Lepturini	<i>Strophiona nitens</i> (Forster, 1771)	North America	0	0	3	0	0	3
Lepturinae	Lepturini	<i>Trachysida mutabilis</i> (Newman, 1841)	North America	0	0	4	0	0	4
Lepturinae	Lepturini	<i>Trigonarthris proxima</i> (Say, 1824)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Trigonarthris subpubescens</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	3	0	0	3
Lepturinae	Lepturini	<i>Typocerus lunulatus</i> (Swederus, 1787)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Typocerus velutinus</i> (Olivier, 1800)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Vadonia unipunctata</i> (Fabricius, 1787)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Oxymirini	<i>Anthophylax cyaneus</i> (Haldeman, 1848)	North America	0	0	2	0	0	2
Lepturinae	Oxymirini	<i>Anthophylax viridis</i> LeConte, 1850	North America	0	0	6	0	0	6
Lepturinae	Oxymirini	<i>Oxymirus cursor</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	4	0	0	0	0	4
Lepturinae	Rhagiini	<i>Anisorus quercus</i> (Götz, 1783)	Europe	3	0	0	0	0	3
Lepturinae	Rhagiini	<i>Brachya interrogationis</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Rhagiini	<i>Carilia virginea</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	2	0	0	0	0	2
Lepturinae	Rhagiini	<i>Carilia virginea thalassina</i> (Schrank von Paula, 1781)	Asia	0	14	0	0	0	14
Lepturinae	Rhagiini	<i>Centrodera decolorata</i> (Harris, 1838)	North America	0	0	3	0	0	3
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera femorata</i> (Fabricius, 1787)	Europe	11	0	0	0	0	11
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera flavimana</i> (Waltl, 1838)	Europe	8	0	0	0	0	8
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera humeralis</i> (Schaller, 1783)	Europe	99	0	0	0	0	99
Lepturinae	Rhagiini	<i>Dinoptera collaris</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	3	0	0	0	0	3
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops marginatus</i> (Fabricius, 1781)	Europe/asia	3	11	0	0	0	14
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops pratensis</i> (Laicharting, 1784)	Europe	10	0	0	0	0	10
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops proteus</i> (Kirby, 1837)	North America	0	0	14	0	0	14
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops septentrionis</i> (C G Thomson, 1866)	Europe/asia	24	28	0	0	0	52
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops smaragdulus</i> (Fabricius, 1793)	Europe	6	0	0	0	0	6
Lepturinae	Rhagiini	<i>Evodinellus borealis</i> (Gyllenhal, 1827)	Asia	0	2	0	0	0	2
Lepturinae	Rhagiini	<i>Gaurotes cyanipennis</i> (Say, 1824)	North America	0	0	2	0	0	2
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera abdominalis</i> (Stephens, 1831)	Europe	31	0	0	0	0	31
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera ruficornis</i> (Fabricius, 1781)	Europe	266	0	0	0	0	266
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera ustulata</i> (Schaller, 1783)	Europe	56	0	0	0	0	56
Lepturinae	Rhagiini	<i>Pachyta mediofasciata</i> Pic 1936	Asia	0	3	0	0	0	3
Lepturinae	Rhagiini	<i>Pachyta quadrimaculata</i> (Linnaeus, 1758)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Rhagiini	<i>Paragawrotes usuriensis</i> (Blessig, 1873)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Rhagiini	<i>Pidonia lurida</i> (Fabricius, 1792)	Europe	3	0	0	0	0	3
Lepturinae	Rhagiini	<i>Pseudosieversia japonica</i> (Ohbayashi, 1937)	Asia	0	1	0	0	0	1
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium bifasciatum</i> Fabricius, 1775	Europe	20	0	0	0	0	20
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium inquisitor</i> (Linnaeus, 1758)	Holarctic	524	5	110	0	0	639
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium japonicum</i> Bates, 1884	Asia	0	21	0	0	0	21
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium mordax</i> (Degeer, 1775)	Europe	41	0	0	0	0	41
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium rugipenne</i> Reitter, 1898	Asia	0	4	0	0	0	4
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium sycphanta</i> (Schrank von Paula, 1781)	Europe	32	0	0	0	0	32
Lepturinae	Rhagiini	<i>Stenocorus cinnamopterus</i> (Randall, 1838)	North America	0	0	1	0	0	1
Lepturinae	Rhagiini	<i>Stenocorus meridianus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	71	0	0	0	0	71
Necydalinae	Necydalini	<i>Necydalis major</i> Linnaeus 1758	Europe	3	0	0	0	0	3
Necydalinae	Necydalini	<i>Necydalis ulmi</i> (Chevrolat, 1838)	Europe	1	0	0	0	0	1
Parandrinae	Parandrini	<i>Neandra brunnea</i> (Fabricius, 1798)	North America	0	0	1	0	0	1
Prioninae	Aegosomatini	<i>Aegosoma scabricorne</i> (Scopoli, 1763)	Europe	33	0	0	0	0	33
Prioninae	Macrotomini	<i>Prionobius myardi</i> Mulsant, 1842	Europe	3	0	0	0	0	3
Prioninae	Meroscelisini	<i>Tragosoma harrisii</i> LeConte, 1851	North America	0	0	236	0	0	236
Prioninae	Prionini	<i>Dorysthenes sternalis</i> (Fairmaire, 1902)	Asia	0	25	0	0	0	25



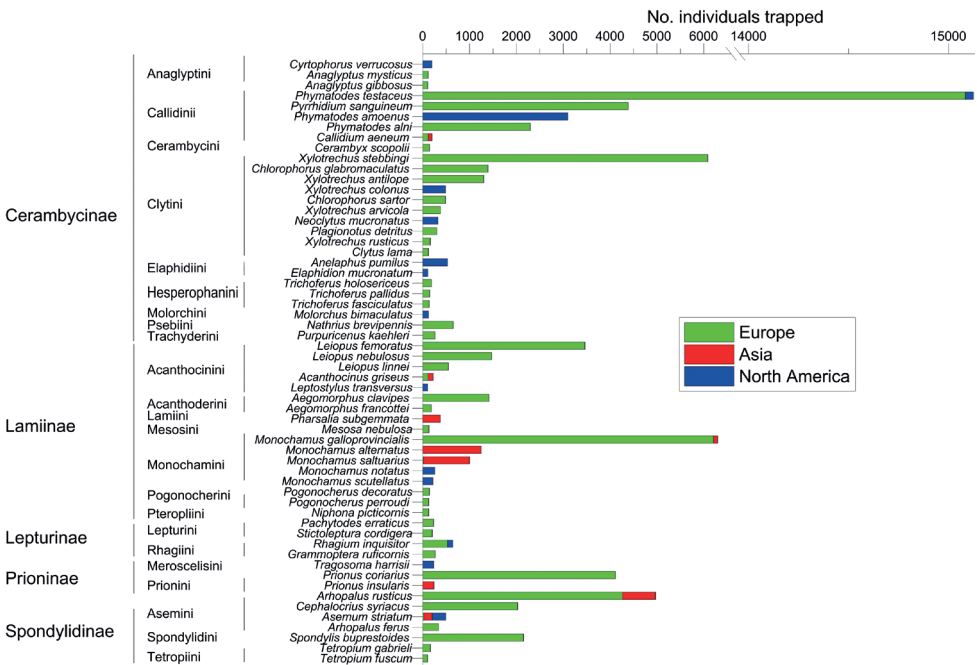
Subfamily	Tribe	Species	Origin						Total
				Europe	Asia	North America	The Caribbean	Australia	
Prioninae	Prionini	<i>Dorysthenes paradoxus</i> (Faldermann, 1833)	Asia	0	22	0	0	0	22
Prioninae	Prionini	<i>Dorysthenes</i> sp.	Asia	0	2	0	0	0	2
Prioninae	Prionini	<i>Mesopriomus besikanus</i> (Fairmaire, 1855)	Europe	46	0	0	0	0	46
Prioninae	Prionini	<i>Orthosoma brunneum</i> (Forster, 1771)	North America	0	0	1	0	0	1
Prioninae	Prionini	<i>Prionus coriarius</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	4112	0	0	0	0	4112
Prioninae	Prionini	<i>Prionus insularis</i> Motschulsky, 1857	Asia	0	241	0	0	0	241
Prioninae	Prionini	<i>Prionus laticollis</i> (Drury, 1773)	North America	0	0	3	0	0	3
Prioninae	Prionini	<i>Prionus</i> sp.	Asia	0	1	0	0	0	1
Spondylidinae	Anisarthrini	<i>Alocerus moesiacus</i> (Friedrichs, 1837)	Europe	4	0	0	0	0	4
Spondylidinae	Anisarthrini	<i>Anisarthron barbipes</i> (Schrank von Paula, 1781)	Europe	19	0	0	0	0	19
Spondylidinae	Asemmini	<i>Arhopalus fesus</i> (Mulsant, 1839)	Europe	338	0	0	0	0	338
Spondylidinae	Asemmini	<b><i>Arhopalus rusticus</i> (Linnaeus, 1758)</b>	Europe/Asia	4264	702	5	0	0	4971
Spondylidinae	Asemmini	<i>Asemum amurense</i> Kraatz, 1879	Asia	0	5	0	0	0	5
Spondylidinae	Asemmini	<i>Asemum striatum</i> (Linnaeus, 1758)	Holarctic	21	181	289	0	0	491
Spondylidinae	Asemmini	<i>Asemum tenuicorne</i> Kraatz, 1879	Europe	1	0	0	0	0	1
Spondylidinae	Asemmini	<i>Cephalallus oberthueri</i> Sharp, 1905	Asia	0	14	0	0	0	14
Spondylidinae	Asemmini	<i>Cephalallus</i> sp.	Asia	0	3	0	0	0	3
Spondylidinae	Asemmini	<i>Cephalallus unicolor</i> (Gahan, 1906)	Asia	0	15	0	0	0	15
Spondylidinae	Asemmini	<i>Cephalocrius syriacus</i> (Reitter, 1895)	Europe	2024	0	0	0	0	2024
Spondylidinae	Nothorhini	<i>Nothorhina punctata</i> (Fabricius, 1798)	Europe	2	0	0	0	0	2
Spondylidinae	Saphanini	<i>Oxyleurus nodieri</i> Mulsant, 1839	Europe	25	0	0	0	0	25
Spondylidinae	Spondylidini	<i>Spondylis buprestoides</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	2149	8	0	0	0	2157
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetropium castaneum</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	53	8	0	0	0	61
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetropium cinnamopterum</i> Kirby, 1837	North America	0	0	2	0	0	2
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetropium fuscum</i> (Fabricius, 1787)	Europe	100	0	0	0	0	100
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetropium gabrieli</i> Weise, 1905	Europe	166	0	0	0	0	166
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetropium schwarzi</i> Casey, 1891	North America	0	0	2	0	0	2
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetrops praestus</i> (Linnaeus, 1758)	Europe	7	0	0	0	0	7
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetrops starkii</i> Chevrolat, 1859	Europe	23	0	0	0	0	23
Disteniidae	Disteniini	<i>Elytrimitatrix undata</i> (Fabricius, 1775)	North America	0	0	6	0	0	6
Vesperidae	Vesperini	<i>Vesperus conicicollis</i> Fairmaire & Coquerel, 1866	Europe	1	0	0	0	0	1
Vesperidae	Vesperini	<i>Vesperus strepens</i> (Fabricius, 1793)	Europe	6	0	0	0	0	6

In Europe, a total of 192 cerambycid species were trapped, of which seven were non-natives (three Clytini: the North American *N. a. acuminatus* and the Asian *X. chinensis* and *Xylotrechus stebbingi* Gahan; three Phoracanthini: the African *Cordylomera spinicornis* (F.) and the Australasian *Phoracantha recurva* Newman and *P. semipunctata* (F.); and one Hesperophanini: the Asian *T. campestris*). The captures amounted to about 20% of the total European cerambycid fauna (955 species, including apterous species, according to Vitali and Schmitt 2017). In North America, a total of 97 species were captured, including two non-native species originating from Europe: the Asemini *Arhopalus rusticus* (L.) and the Callidiini *P. testaceus*. In contrast, no non-native species were trapped in Asia (95 total species), the Caribbean (12 total species; i.e. 18% of the 65 species known in Martinique; Touroult and Poirier 2021) and Australia. Three species with Holarctic distribution (the Asemini *Asemum striatum* [L.], the Callidiini *Callidium aeneum* [Degeer] and the Rhagiini *Rhagium inquisitor* [L.]) were trapped in Europe, Asia and North America, where-

as nine species with northern Palaearctic distribution were captured in both Europe and Asia (the Clytini *Xylotrechus rusticus* [L.], the Acanthocinini *Acanthocinus griseus* [F.], the Monochamini *M. galloprovincialis* and congeners *M. saltuarius* [Say] and *M. sartor urussovii* [Fischer von Waldheim], the Lepturini *Stictoleptura rubra* [L.], the Rhagiini congeners *Acmaeops marginatus* [F.] and *A. septentrionis* [C. G. Thomson] and the Asemmini *A. rusticus*).

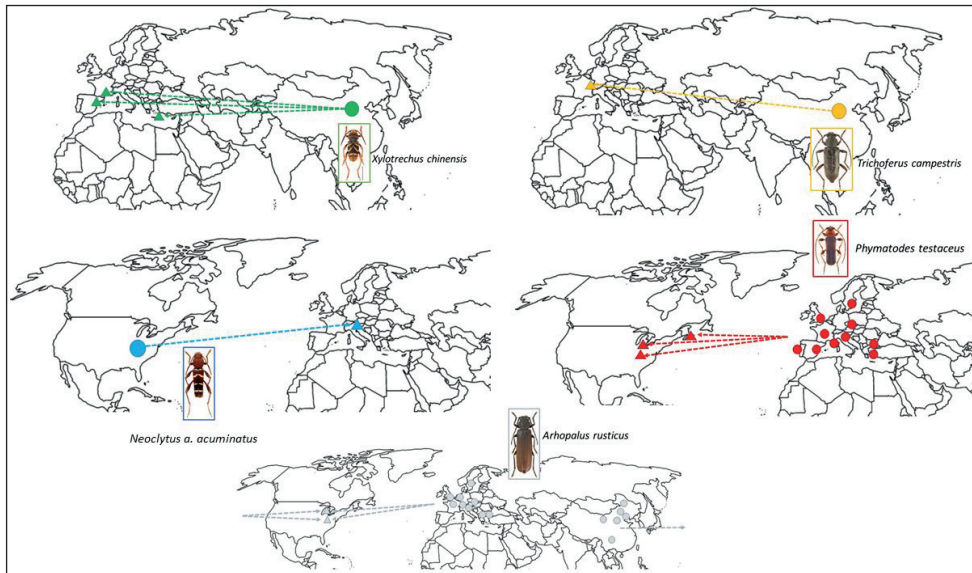
Three species were notably abundant with captures exceeding > 5,000, including the European native *P. testaceus* (which was also trapped in the USA as a non-native species), the Palaearctic *M. galloprovincialis* (trapped in Europe and Northern China) and the Asian *X. stebbingi* which has invaded Europe. Sixteen species were represented by more than 1,000 specimens, 58 species by more than 100 specimens (Fig. 3) and 84 species by more than 50 individuals. In contrast, 109 cerambycid species from the total of 374 species were represented by only one or two specimens. More than 1,000 individuals were caught for four of the Callidiini species, of which three were native European species (*P. testaceus* – 15,126 individuals, 41 of which were trapped in North America where they have been introduced; *Pyrrhidium sanguineum* [L.]– 4,388 individuals and *Phymatodes alni* [L.]– 2,295 individuals), along with the North American *Phymatodes amoenus* (Say) (3,100 individuals).

Some invasive species were trapped in both their native range and in invaded regions (Fig. 4). The Chinese Clytini *X. chinensis* was captured in its native range around Beijing as well as in the invaded European areas in Spain, Greece (Crete) and southern France. The European species *P. testaceus* (Callidiini) and *A. rusticus* (Asemmini) were



**Figure 3.** Cerambycid species with more than 100 individuals captured, ranked by decreasing order and showing the continent of capture.





**Figure 4.** Cerambycid species trapped in both their native range (circles) and invaded range (triangles). Each species is shown by a different colour.

trapped in large numbers in their native Europe, but also as non-native species in North America. Conversely, the North American Clytini *N. a. acuminatus* was captured in its native range in the USA, but also in the invaded areas of Italy. A noticeable anomaly was the Himalayan Clytini *X. stebbingi*, which was caught in large numbers in southern Europe (6,089 specimens) where it is invasive, but not at all in the traps deployed in Asia. The African Phoracanthini *C. spinicornis* was regularly trapped within European ports-of-entry, but not in nearby woody areas.

Simultaneous captures of non-target Coleopteran species were mostly bark and ambrosia beetles (> 100,000 individuals), which are not yet identified to species, but also predators in the family Cleridae, essentially *Clerus mutillarius* Fabricius, 1775 (> 5,000 individuals) and *Thanasimus* spp. (> 2,000 individuals) and Trogossitidae (*Temnoscheila* spp.; > 500 individuals).

### Additional captures resulting from the 10-pheromone blend

The addition of trichoferone and (*E*)-2-*cis*-6,7-epoxynonenal to the 8-pheromone blend in France and China in 2019 onwards, did not significantly change the previous trapping spectrum of the 8-pheromone blend (paired *t*-test;  $P = 0.750$ ). However, the 10-pheromone blend resulted in trapping large numbers of four *Trichoferus* species, including the Asian *T. campestris* in its invasive range in Europe and native range in China (Table 3). In addition, large numbers of *Aromia bungii* were trapped in their native Chinese range. Only a few specimens of these five species had been previously trapped using the 8-pheromone blend.

## Discussion

Capturing 376 species of cerambycid beetles from eight different subfamilies and 60 tribes on different continents, with 84 species captured in numbers greater than 50 individuals, clearly demonstrates the potential of the multi-pheromone lure to constitute an effective tool for the detection of 'unexpected' cerambycid invaders that are accidentally translocated outside their native ranges. Our hypothesis regarding the generic effectiveness of the blend was based on the evolutionary conservatism observed in many cerambycid pheromone structures. Pheromone constituents of the blend composition are shared by phylogenetically-related species on different continents (cf. references in Table 2). Therefore, their combination was expected to simultaneously attract multiple species of different tribes and subfamilies. These expected generic effects were largely supported for the targeted subfamilies, namely the Cerambycinae, Lamiinae, Spondylidinae and Prioninae.

The best represented tribe was Clytini (Cerambycinae). A total of 64 species were trapped overall, including catches in Asia (27 spp.), Europe (22 spp.) and North America (15 spp.). Two of these species were captured in both the native and invaded continents (*X. chinensis*- Asia/Europe, *N. a. acuminatus*- North America/Europe). This richness probably resulted from the presence in the blend of C6-ketol (3-hydroxyhexan-2-one) and *anti*-2,3-hexanediol. Both are known to be male-emitted attractants for a number of species in this tribe (Millar and Hanks 2017; Imrei et al. 2021). Furthermore, using these two compounds in a similar multipheromone blend in tropical China, Wickham et al. (2021) captured 26 Clytini species of which only four were in common with the present study (*Rhaphuma anongi* Gressit & Rondon, *Rhaphuma laosica* Gressit & Rondon, *Xylotrechus buqueti* [Laporte de Castelnau & Gory] and *X. chinensis*), thus suggesting an even larger potential of the blend. The Asian Clytini *X. stebbingi*, a native of the Himalayas (India, Pakistan), provides an illustrative example of the potential of detection of 'unexpected' cerambycid invaders, with a total of 6,089 specimens captured in the invaded countries of southern Europe. The species was trapped each year at more than 50 sites in southern France, Greece, Italy, Spain and Switzerland, but also in nurseries near Paris far from the invaded areas. However, it has apparently not invaded China. Somewhat surprisingly, the pheromone blend of this abundant invasive species has not yet been identified, although racemic 3-hydroxyhexan-2-one was suggested to be a key component of its pheromone (Rasati et al. 2021) and a number of other *Xylotrechus* species have pheromones comprised of 3-hydroxyalkan-2-ones, 2-hydroxyalkan-3-ones and/or 2,3-alkanediols (Millar and Hanks 2017). The richness in the trapped *Xylotrechus* species (19 spp.), a genus known to include a number of invasive species, is especially important for the early detection of new invaders.

In the same subfamily Cerambycinae, the tribe Callidiini was represented by 15 species trapped in Europe and five in North America, including a total of 11 species in the genus *Phymatodes* on the two continents. The very large number of captures (from ~ 2,000 to more than 15,000 individuals) of three *Phymatodes* species, two native to

Europe (*P. testaceus* and *P. alni*) and one from North America (*P. amoeneus*) and those of the closely-related European *P. sanguineum*, probably reflects the inclusion in the blend of both C6-ketol and 2-methylbutan-1-ol, known to be attractants for a number of *Phymatodes* spp. (Millar and Hanks 2017). Hanks et al. (2019) had previously trapped *P. testaceus* and *P. amoeneus* in large numbers using these compounds, but also confirmed that the attraction to C6-ketol is antagonised by 2-methylbutan-1-ol for another species of *Phymatodes*, *P. aereus* (Newman) (Mitchell et al. 2011). Probably for the same reason, few *P. aereus* (14 individuals) were trapped during our study. A species of the Callidiini, *Callidium aeneum*, was represented by more than 200 individuals, but is another example of a species for which pheromones have not yet been identified. However, the congeners *C. antennatum hesperum* Casey and *C. pseudotsugae* Fisher are known to use C6-ketol along with semanopyrrole as their aggregation-sex pheromone blend (Millar et al. 2019). The C6-ketol compound is also likely to be a pheromone component for *Bethelium tillides* (Pascoe), a representative of another Cerambycinae tribe, Callidiopini, in Australia (Hayes et al. 2016), as indicated by our captures of *Bethelium* sp. in Australia and another Callidiopini, *C. flavus*, in Martinique.

In the subfamily Lamiinae, large numbers of individuals of 12 species of Monochamini in the genus *Monochamus* were trapped in Europe, Russia (Siberia), China and North America. This likely resulted from the inclusion in the blend of monochamol (2-[undecyloxy]-ethanol), known as a sex-aggregation pheromone for at least 14 *Monochamus* species in Europe (*M. galloprovincialis*; Pajares et al. 2010), North America (e.g. *M. carolinensis* [Olivier] and *M. scutellatus* [Say]; Millar and Hanks 2017) and Asia (*M. alternatus* Hope; Lee et al. 2018). The captures included species such as *M. sartor* (F.) and *M. sutor longulus* Pic for which no attractant had previously been recorded (but known for *M. sutor* [L.], Pajares et al. 2013). These results confirmed those obtained by Boone et al. (2018), who trapped six *Monochamus* species in North America and *M. alternatus* in Asia using monochamol. Given the importance of *Monochamus* beetles in vectoring the lethal pinewood nematode, the multilure blend would be useful for early detection of such invading species in ports and other high-risk sites. Additionally, another Monochamini in a different genus, *Uraecha angusta* (Pascoe), was trapped in China in high numbers, further indicating that monochamol is not restricted to the genus *Monochamus* Dejean.

In the subfamily Spondylidinae, Žunič-Kosi et al. (2019) recently showed that (S)-fusicumol, with geranylacetone as a minor component, is a sex-aggregation pheromone for a European representative of the Asemini tribe, *A. rusticus*. They also suggested that the fusicumol motif is probably shared more broadly in this subfamily. Our trapping of 15 spondylidine species supports this assumption, as the blend included fusicumol, fusicumol acetate and geranylacetone. Besides the ~ 5,000 trapped *A. rusticus* individuals, other European Asemini were captured in substantial numbers as well, including *Cephalocrius syriacus* Sharp (> 2,000 individuals), *Arhopalus ferus* (Mulsant) and *A. striatum* in Europe, but also other *Asemum* and *Cephalallus* species in China (Table 3). High numbers of captures were also noted for several species in other spondylidine tribes, such as *Spondylis buprestoides* (L.) (Spondylidini, > 2,000

individuals) in both Europe and China, for which no attractants are yet known and the alpine *Tetropium gabrieli* Weise (Tetropiini), for which Schroeder et al. (2021) recently showed an attraction to (*E*)-fusicumol.

In the subfamily Prioninae, the inclusion of prionic acid, originally identified as a female-produced sex pheromone of the North American species *Prionus californicus* Motschulsky (Rodstein et al. 2009), but also as an attractant for most, if not all, other North American species of *Prionus* (Barbour et al. 2011; Millar and Hanks 2017) and for the Asian Prionini *Dorysthenes granulosis* (Thomson) (Wickham et al. 2016a), resulted in substantial catches (> 4,000 specimens) of the European *Prionus coriarius* (L.). Additional captures of other Prionini, such as the Balkanic *Mesoprionus besikanus* (Fairmaire), the Asian *Prionus insularis* Motschulsky, and three Chinese species of *Dorysthenes* (*D. sternalis* [Fairmaire], *D. paradoxus* [Faldermann] and an, as yet, unidentified species), suggest a broad attractive spectrum for prionic acid in this tribe.

Despite the general efficiency of our blend, a number of species, especially those trapped with less than 50 individuals, are likely either random catches or were attracted by physical characteristics (e.g. trap shape and/or colour). Based on the previous results of Fan et al. (2019), who showed highly significant differences in the number of species trapped by multipheromone blends and unbaited traps, we did not deploy any unbaited control traps in this study which could help in clarifying this point. However, it is noteworthy that, very unexpectedly, we trapped a total of 79 lepturine species, including 49 in Europe, 12 in Asia and 18 in North America, although few pheromones are known in the subfamily Lepturinae and none of them, such as *cis*-vaccenyl acetate (Ray et al. 2011) or (*R*)-desmolactone (Ray et al. 2014), was included in the blend. Most of these species were caught in small numbers, consistent with random captures of individuals. Only three species (*Pachytodes erraticus* [Dalman], *Stictoleptura cordigera* [Fueßlins] and *Rutpela maculata* [Poda von Neuhaus]) out of the 44 captured in the tribe Lepturini, were represented by more than 50 individuals (Table 3). For these species, we can only speculate that the beetles were attracted to the trap colour or silhouette, rather than to the lure (see details in Cavaletto et al. 2021). Analogous results were obtained for another Lepturine tribe, the Rhagini, where more than 600 specimens of a species considered as Holarctic, *R. inquisitor*, were caught in Europe, Asia and North America, together with the closely-related *R. japonicum* Bates trapped in China.

Attraction of these lepturines may also have been a result of the addition of high release rate ethanol and  $\alpha$ -pinene lures to traps, rather than attraction to the blend of synthetic pheromones. Plant volatiles can, in some cases, effectively enhance the attraction of cerambycids to pheromone lures (e.g. for *Monochamus* species; Pajares et al. 2010). Indeed, plant volatiles alone, such as turpentine, have long been used as generic attractants for wood-boring insects, including some species of cerambycids, but are not as effective as pheromone-baited traps for target species. For example, Rassati et al. (2019) showed that traps deployed in Italy with a multi-lure including most of the compounds of our blend (C6-ketol, racemic 3-hydroxyoctan-2-one, *syn*-2,3-hexanediols, [*E/Z*]-fusicumol and [*E/Z*]-fusicumol acetate) caught more than twice the number of cerambycid species as ethanol-baited traps.

Our results also provide leads to possible pheromone structures in new species (see also above), building on the previously-articulated concept of “pheromone identification by proxy”, in which identification of pheromones for one species may provide leads for the identification of pheromones of related taxa (Millar et al. 2019). For the 16 species caught in numbers > 1,000 individuals, it is likely that the major component(s) of their pheromones were present in the blend. Pheromones or possible pheromones had been identified from only about half of these species (*M. alternatus*, *M. galloprovincialis* and *M. saltuarius*, *A. rusticus*, *P. amoenus* and *P. testaceus*, *P. sanguineum*, *P. coriarius*, *Xylotrechus antilope* [Schönherr]; Millar and Hanks 2017). Thus, our data represent the first possible leads to the pheromone structures for a number of cerambycine species in the tribe Clytini (*C. glabromaculatus*, > 1,000 individuals), three Lamiinae in the tribes Acanthocinini (*Leiopus femoratus* Fairmaire, > 3,000 individuals; *Leiopus nebulosus* [L.], > 1,000 individuals) and Acanthoderini (*Aegomorphus clavipes* [Schrank von Paula], > 1,000 individuals) and two Spondylidinae in the tribes Asemini (*C. syriacus*, > 2,000 individuals) and Spondylidini (*S. buprestoides*, > 2,000 individuals). It is likely that the same could be true for at least some of the remaining 46 species caught in numbers > 100 individuals (and maybe even > 50), but for which pheromones have not been formally identified. For instance, Wickham et al. (2021) considered that their substantial captures of the Clytini *R. anongi* and *R. laosica* in tropical China suggested the presence of pheromone components in the blend that they tested, which was similar to ours. Our results further support this assumption because we trapped ~ 100 *R. anongi* and > 25 *R. laosica* with traps deployed at a single site of southern China.

Trapping of some invasive species in both the native and invaded ranges revealed the potential of the multilure blend for detecting invaders. Some of these non-native species have been present for a long time in the invaded areas (e.g. the European *P. testaceus* and *A. rusticus* in North America and the North American *N. a. acuminatus* in Europe). However, the trapping of very recent invaders within and near ports-of-entry is noteworthy and is indicative of the sensitivity of the blend for early detection at low population levels. For example, the Chinese Clytini *X. chinensis* was captured in its native range around Beijing, as well as in all the scattered European areas it has invaded and established in relatively recently (2013 in Spain-Catalonia; 2017 in Greece-Crete island and 2018 in southern France-Port of Sète; <https://gd.eppo.int/taxon/XYLOCH/distribution/ES>). Similarly, when the 10-pheromone blend including trichoferone was deployed, the Chinese Hesperophanini *T. campestris* was trapped in both its native range in China and in the river port of Huningue (France), where this invasive species had not yet been recorded. Interestingly, despite its presumably low abundance, our trapping studies allowed us to follow the dispersal of this invading species from the port. For example, in 2019 and 2020, specimens were only detected in traps placed within the Huningue Port but, in 2021, the species was captured in traps placed within a 1 km-radius from the Port. Numerous catches of *X. stebbingi* in ports-of-entry and nurseries of northern France, far from the known invaded southern area of France, also highlighted the sensitivity of the blend for its detection.



## What possible improvements can be expected?

Is it possible and useful to continue increasing the number of pheromones included in the blend? The addition of trichoferone and the pheromone of *Aromia bungii* to the 8-pheromone blend in some field trials in France and China since 2020 resulted in relatively high numbers of captures of several *Trichoferus* species (three native European species and one native Chinese species invasive in Europe), as well as individuals of *A. bungii* in China, without reducing the trapping scope observed in nearby traps baited with the primary blend, especially the cerambycine *P. testaceus*. Millar et al. (2021) obtained analogous results in Pennsylvania, USA, where the responses of the major cerambycid species were not affected, except for the lamiine species *Sternidius alpha* (Say) whose catches were shut down by the addition of the pheromones of the two non-native species. Preliminary experiments (not detailed here) carried out in 2020 and 2021 in south-central France consisting of adding the sex-aggregation pheromone of *Rosalia alpina* (Linnaeus), an alkylated pyrone (Žunič-Kosi et al. 2017), to the 8-pheromone blend also resulted in captures of *R. alpina* without altering the cerambycid species richness. Tests of addition of the semanopyrrole structure (1-[1*H*-pyrrol-2-yl]-1,2-propanedione) could also be of interest, given that it occurs in pheromones of species from several continents. Wickham et al. (2016b) suggested that semanopyrrole may correspond to another well-conserved sex-aggregation pheromone motif within the subfamily Cerambycinae, being highly attractive in combination with C6-ketol for the Callidiini *Callidiellum villosulum* (Fairmaire) and as a single component for the Phoracanthini *Allotraeus asiaticus* (Schwarzer) in China. Silva et al. (2017) also identified semanopyrrole as a component of the sex-aggregation pheromone of two South American Cerambycinae in the tribe Elaphidiini, *Ambonus distinctus* (Newman) and *Ambonus electus* (Gahan). Recent work has also shown that 10-methyldodecanol, 11-methyltridecanol and their corresponding aldehydes may form another conserved structural motif, with examples of pheromones from South American (Silva et al. 2020) and North American cerambycid species (JGM and LMH, work in progress). As all these additional compounds exhibit chemical structures substantially different from the ones used in the 8-pheromone blend, it may be hypothesised that their addition will be unlikely to interfere with the attraction of species to the other eight pheromones.

For a more general approach of early detection of xylophagous invaders, targeting not only cerambycids, but also other groups, such as bark and ambrosia beetles (Curculionidae, Scolytinae), woodwasps (Siricidae) and jewel beetles (Buprestidae), represents a valuable opportunity. In fact, traps baited with some (e.g. Marchioro et al. 2020; Miller et al. 2022) or all (Cavaletto et al. 2020) the eight longhorn beetle pheromones used in this study, allowed us to catch a high number of other wood-boring beetle species and associated predators, especially when synergised by generic attractants, such as ethanol or  $\alpha$ -pinene. The possibility of augmenting the blend with complementary attractants specific and/or generic to each of these groups is also of interest. Miller et al. (2016) already tested the combination of monochamol and  $\alpha$ -pinene with ipsenol, a pheromone component of *Ips* bark beetles (Curculionidae: Scolytinae) and

did not observe any negative effect nor synergy on catches of Cerambycidae or on any associated species of bark beetles, weevils or bark beetle predators. However, some of the cerambycid pheromones used in the 8-pheromone blend have been shown to have either positive or negative effects on catches of bark and ambrosia beetles, depending on the species (Marchioro et al. 2020).

The position of the trap also has rather to be carefully managed. In our study, standardisation of trap position was not possible due to the different trapping locations (ports-of-entry, urban parks, forests) and the variety of environments amongst the countries included in the study. However, several recent studies have confirmed that trap position can have a considerable influence on the captures of cerambycid beetles, on a vertical gradient from the forest understorey up to the canopy (Wermelinger et al. 2007; Graham et al. 2012; Flaherty et al. 2019; Rassati et al. 2019; Miller et al. 2020; Wickham et al. 2021), as well as on a horizontal gradient between the forest edge and forest interior (Allison et al. 2019; Sweeney et al. 2020). For instance, *Monochamus maculosus* Haldeman and *M. scutellatus* were more abundant in the clearing adjacent to the forest than in the forest, whereas the contrary was observed for *M. carolinensis* and *M. titillator* (F.). As most of our field trials did not consider the upper canopy and were not deployed along forest edge-interior gradients, except for the specific 2019 experiment, it is possible that a number of species with specific types of behaviour related to these micro-environments were not trapped at all. Moreover, weather conditions during trapping periods, as well as the size of the local populations, were also likely to influence the captures.

Another important point is the colour of the trap. Most traps used in the study were black multifunnel traps (1069 out of 1289; 83%). However, Cavaletto et al. (2021), using the same 8-pheromone blend, showed that trap colour had a considerable influence on cerambycid captures in both species' richness and abundance for several subfamilies, but in different ways. For example, black traps caught significantly fewer species of Cerambycinae than yellow ones, whereas for Lamiinae, both brown and red traps caught significantly more species than black traps and colours in the portion of the visible electromagnetic spectrum (yellow, green, blue) attracted higher numbers of lepturine species than did black traps. A relationship with adult beetle behaviour could be hypothesised. Cavaletto et al. (2021) observed that the number of species of flower-visiting cerambycids was significantly lower in black traps than in yellow, blue and green ones, whereas yellow and green traps were significantly less efficient than black traps for non-flower-visiting species. Therefore, systematic tests of traps of different colours in different world regions could significantly enhance the efficiency of trapping species which respond to the multipheromone blend. Data obtained during the present study will be later merged with those of specifically-designed experiments to test for the influence of trap colour.

The impact of such trappings on local insect biodiversity could be questioned. As all specimens from non-target Coleopteran groups have not been identified yet, we cannot exclude that a few species other than cerambycids, bark and ambrosia beetles and beetle predators (clerids, trogossitids) have also been trapped in significant

numbers (> 500 ind.). However, any trapping study, like our one, is necessarily limited in scope by cost and logistical factors. Thus, unless trappings are intensively conducted over a whole region or country, which is very unlikely, they are likely to affect local biodiversity in a very limited way.

In conclusion, we are delivering a database of nearly 400 species which were trapped during the course of our multiyear field trials with the multipheromone blend, and the two hypotheses of our study are strongly supported. First, the trapping of a species in significant numbers on a continent effectively increased the probability that it can be detected upon arrival in other countries/continents, as shown by the species trapped in large numbers in both native and invaded ranges, supporting hypothesis 1. Second, the multipheromone blend was shown to be an effective generic attractant for multiple species from several cerambycid subfamilies, including numerous species for which pheromones have not yet been identified, supporting hypothesis 2. In addition, some species, such as the lepturine species caught in large numbers, were probably trapped because of trap colour or the host plant lure, rather than as a result of the blend composition. However, regardless of cues used by beetles, trapping of non-native species when they arrive at ports-of-entry has the same value for phytosanitary officials. Antagonistic effects between compounds exist, but appear to be fairly limited and so should not compromise the overall detection potential. Finally, further advances in the effectiveness of detection of cerambycids by multipheromone lures can be expected as parameters, such as trap colour and height, are optimised and as the number of pheromone components which are found to be conserved within and across related taxa and continents expands.

## Acknowledgements

We thank Filippo Giannone, Riccardo Poloni, Kate Van Rooyen, Chantelle Kostanowicz, Vincent Webster, Andrej Kapla, Matic Gabor, Mischa Giasson and Cory Hughes for technical assistance in the lab and field and for species identification. Paige Payter, Michigan State University (MSU), installed and monitored traps in Michigan and Page Payter and Gary Parsons (MSU) identified the captured cerambycids. We are indebted to Frédéric Delpont, François-Xavier Saintonge, Jean-Baptiste Daubrée and all colleagues of the “Santé des Forêts” Department (DSF) and local offices (SRAL) of the French Ministry of Agriculture for the management of the traps in France. Marie-Pierre Dufresne from Fredon Centre - Val de Loire and Sylvain Amiot from the Direction Patrimoine végétal et Biodiversité of Tours-Métropole helped to settle traps in the Val de Loire area, France. We are also grateful to Eddy Poirier and Nicolas Moulin for the management of the traps in Martinique and to the forest health team of Vaersa and the forest management service (SOGF) of the Generalitat Valenciana (Spain). We thank very much Xing Zhong-Ping for his help in the trappings in Yunnan and Anastasia Knorre for helping us with field research in the State Nature Reserve “Stolby” (Krasnoyarsk, Russia). We also want to thank Prof. Ana Paula Ramos for enabling a connection with the administration of the municipalities of Lisbon and



Setúbal for the trappings in Portugal. We are indebted to Eng. Rui Simão and Eng. Ana Júlia Francisco in CM- Lisboa, Dr. António Nobre from the administration board of Lisbon harbour, Eng. Sérgio Gaspar from CM-Setúbal for allowing us to conduct this work in their municipalities. The municipality of L'Argentière la Bessée provided invaluable assistance for the management of the traps in the southern French Alps. We thank Robert Haack, Nicolas Meurisse and a third anonymous reviewer for their very helpful comments and suggestions on the manuscript.

This work was essentially supported by the HOMED project (HOListic Management of Emerging Forest Pests and Diseases) which received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 771271 (<https://homed-project.eu/>). We also acknowledge funding from the European project LIFE SAMFIX (SAVing Mediterranean Forests from Invasions of *Xylosandrus* Beetles and associated Pathogenic Fungi, LIFE17 NAT/IT/000609, <https://www.lifesamfix.eu/>), from the EUPHRESKO project MULTITRAP (“Multi-lure and multi-trap surveillance for invasive tree pests”). Trappings in France were supported from funding by the French Ministry of Agriculture under the PORTRAP project “Test de l'efficacité de pièges génériques multicomposés pour la détection précoce d'insectes exotiques xylophages dans les sites potentiels d'entrée sur le territoire national” and by the Région Centre- Val de Loire under the CANOPEE project (“Biodiversité des insectes des canopées de chênes déperissants“- Project No. 2018-00124136). Trapping in Austria was supported by the Austrian Federal Ministry for Agriculture, Forestry, Regions and Water Management (Research Project 101183). Trapping in China was partially supported by a grant from the French Embassy in Beijing under the programme CaiYuanPei. LR, JS, YQL and YY are grateful for funding by the National Key Research and Development Program of China (Grant No 2021YFC2600400) and the National Natural Science Foundation of China (31770687). Research conducted in Nova Scotia, Canada, was funded by the Pest Risk Management Program of Natural Resources Canada, Canadian Forest Service. Trapping in Michigan was supported by a grant from the Michigan Department of Agriculture and Rural Development. Research in Siberia (Russia) was supported by Sukachev Institute of Forest SB RAS (the basic project, grant No 0287-2021-0011) [field collection] and the Russian Science Foundation (grant No 22-16-00075) [species identification]. AMR and EKL are grateful for the Robert Borcer Endowment and the Undergraduate Research Fund of Xavier University and USDA-APHIS cooperative agreement numbers AP19PPQS and T00C082 and AP20PPQS and T00C173. MZ and CM acknowledge funding by the New South Wales government and Hort Innovation project 16004 NSW DPI component of the Macadamia Integrated Pest Management. Trials in Martinique were part of a natural site inventory funded by the DEAL Martinique (French Ministry of Environment). The work in Slovenia was financially supported by the Slovenian Research Agency (Research Core Funding P1-0255). Trapping in England was supported by the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra). JGM and LMH gratefully acknowledge support from United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) grants 19- to 22-8130-1422-CA.

## References

- Allison JD, McKenney JL, Millar JG, McElfresh JS, Mitchell RF, Hanks LH (2012) Response of the woodborers *Monochamus carolinensis* and *Monochamus titillator* to known cerambycid pheromones in the presence and absence of the host plant volatile  $\alpha$ -pinene. *Environmental Entomology* 41: 1587–1596. <https://doi.org/10.1603/EN12185>
- Allison JD, Strom B, Sweeney J, Mayo P (2019) Trap deployment along linear transects perpendicular to forest edges: impact on capture of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Pest Science* 92(1): 299–308. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1008-7>
- Alvarez G, Gallego D, Hall DR, Jactel H, Pajares GA (2016) Combining pheromone and kairomones for effective trapping of the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Applied Entomology* 140(1–2): 58–71. <https://doi.org/10.1111/jen.12297>
- Aukema JE, McCullough DG, Von Holle B, Liebhold AM, Britton K, Frankel SJ (2010) Historical accumulation of nonindigenous forest pests in the continental US. *BioScience* 60: 886–897. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.11.5>
- Barbour JD, Millar JG, Rodstein J, Ray AM, Alston DG, Rejzek M, Dutcher JD, Hanks LM (2011) Synthetic 3,5-dimethyldodecanoic acid serves as a general attractant for multiple species of *Prionus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Annals of the Entomological Society of America* 104(3): 588–593. <https://doi.org/10.1603/AN10182>
- Bobadoye B, Torto B, Fombong A, Zou Y, Adlbauer K, Hanks LM, Millar JG (2019) Evidence of aggregation-sex pheromone use by longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) species native to Africa. *Environmental Entomology* 48(1): 189–192. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy164>
- Boone CK, Sweeney J, Silk PJ, Hughes CC, Webster RP, Stephen F, MacLauchlan L, Bentz B, Drumont A, Zhao B, Berkvens N, Casteels H, Gregoire JC (2018) *Monochamus* species from different continents can be effectively detected with the same trapping protocol. *Journal of Pest Science* 92(1): 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0954-4>
- Brockhoff EG, Liebhold AM (2017) Ecology of forest insect invasions. *Biological Invasions* 19(11): 3141–3159. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1514-1>
- Brockhoff EG, Jones DC, Kimberley MO, Suckling DM, Donaldson T (2006) Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps baited with pheromones and kairomones. *Forest Ecology and Management* 228(1–3): 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.02.046>
- Cavaletto G, Faccoli M, Marini L, Spaethe J, Magnani G, Rassati D (2020) Effect of trap color on captures of bark-and wood-boring beetles (Coleoptera; Buprestidae and Scolytinae) and associated predators. *Insects* 11(11): 749. <https://doi.org/10.3390/insects11110749>
- Cavaletto G, Faccoli M, Marini L, Spaethe J, Giannone F, Moino S, Rassati D (2021) Exploiting trap color to improve surveys of longhorn beetles. *Journal of Pest Science* 94(3): 871–888. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01303-w>
- Collignon RM, Swift IP, Zou Y, McElfresh JS, Hanks LM, Millar JG (2016) The influence of host plant volatiles on the attraction of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) to pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 42: 215–229. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0679-x>
- Dang Y, Wei K, Wang X, Duan JJ, Jennings DE, Poland TM (2022) Introduced plants induce outbreaks of a native pest and facilitate invasion in the plants' native range: Evidence from

- the emerald ash borer. *Journal of Ecology* 110(3): 593–604. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13822>
- Eschen R, Holmes T, Smith D, Roques A, Santini S, Kenis M (2014) Likelihood of establishment of tree pests and diseases based on their worldwide occurrence as determined by hierarchical cluster analysis. *Forest Ecology and Management* 315: 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.12.021>
- Eschen R, Roques A, Santini A (2015) Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Diversity & Distributions* 21(1): 36–45. <https://doi.org/10.1111/ddi.12267>
- Essl F, Bacher S, Blackburn TM, Booy O, Brundu G, Brunel S, Cardoso AC, Eschen R, Gallardo B, Galil B, García-Berthou E, Genovesi P, Groom Q, Harrower C, Hulme PE, Katsanevakis S, Kenis M, Kühn I, Kumschick S, Martinou AF, Nentwig W, O’Flynn C, Pagad S, Pergl J, Pyšek P, Rabitsch W, Richardson DM, Roques A, Roy HE, Scalera R, Schindler S, Seebens H, Vanderhoeven S, Vilà M, Wilson JRU, Zenetos A, Jeschke JM (2015) Crossing frontiers in tackling pathways of biological invasions. *Bioscience* 65(8): 769–782. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv082>
- Eyre D, Haack RA (2017) Invasive cerambycid pests and biosecurity measures. In: Wang Q (Ed.) *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. CRC Press, Boca Raton, 563–618.
- Fan JT, Denux O, Courtin C, Bernard A, Javal M, Millar JG, Hanks LM, Roques A (2019) Multipheromone blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. *Journal of Pest Science* 92(1): 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0997-6>
- Flaherty L, Gutowski JMG, Hughes C, Mayo P, Mokrzycki T, Pohl G, Silk P, van Rooyen K, Sweeney J (2019) Pheromone-enhanced lure blends and multiple trap heights improve detection of bark and wood-boring beetles potentially moved in solid wood packaging. *Journal of Pest Science* 92(1): 309–325. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1019-4>
- Graham EE, Mitchell RF, Reagel PF, Barbour JD, Millar JG, Hanks LM (2010) Treating panel traps with a fluoropolymer enhances their efficiency in capturing cerambycid beetles. *Journal of Economic Entomology* 103(3): 641–647. <https://doi.org/10.1603/EC10013>
- Graham EE, Poland TM, McCullough DG, Millar JG (2012) A comparison of trap type and height for capturing cerambycid beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology* 105(3): 837–846. <https://doi.org/10.1603/EC12053>
- Haack RA, Britton KO, Brockerhoff EG, Cavey J, Garrett LJ, Kimberley M, Lowenstein F, Nuding A, Olson LJ, Turner J, Vasilaky KN (2014) Effectiveness of the international phytosanitary standard ISPM no. 15 on reducing wood borer infestation rates in wood packaging material entering the United States. *PLoS ONE* 9(5): e96611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096611>
- Halloran S, Collignon RM, McElfresh JS, Millar JG (2018) Fuscumol and geranylacetone as pheromone components of Californian longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in the subfamily Spondylidinae. *Environmental Entomology* 47(5): 1300–1305. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy101>
- Hanks LM, Millar JG (2013) Field bioassays of cerambycid pheromones reveal widespread parsimony of pheromone structures, enhancement by host plant volatiles, and antagonism by

- components from heterospecifics. *Chemoecology* 23(1): 21–44. <https://doi.org/10.1007/s00049-012-0116-8>
- Hanks LM, Millar JG (2016) Sex and aggregation-sex pheromones of cerambycid beetles: Basic science and practical applications. *Journal of Chemical Ecology* 42(7): 631–654. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0733-8>
- Hanks LM, Millar JG, Mongold-Diers JA, Wong JCH, Meier LR, Reigel PF, Mitchell RF (2012) Using blends of cerambycid beetle pheromones and host volatiles to simultaneously attract a diversity of cerambycid species. *Canadian Journal of Forest Research* 42(6): 1050–1059. <https://doi.org/10.1139/x2012-062>
- Hanks LM, Mongold-Diers JA, Atkinson TH, Fierke MK, Ginzel MD, Graham EE, Poland TM, Richards AB, Richardson ML, Millar JG (2018) Blends of pheromones, with and without host plant volatiles, can attract multiple species of cerambycid beetles simultaneously. *Journal of Economic Entomology* 111(2): 716–724. <https://doi.org/10.1093/jee/tox373>
- Hanks LM, Mongold-Diers JA, Mitchell RF, Zou Y, Wong JCH, Meier LR, Johnson TD, Millar JG (2019) The role of minor pheromone components in segregating 14 species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) of the subfamily Cerambycinae. *Journal of Economic Entomology* 112(5): 2236–2252. <https://doi.org/10.1093/jee/toz141>
- Hayes RA, Griffiths MW, Nahrung HF, Arnold PA, Hanks LM, Millar JG (2016) Optimizing generic cerambycid pheromone lures for Australian biosecurity and biodiversity monitoring. *Journal of Economic Entomology* 109(4): 1741–1749. <https://doi.org/10.1093/jee/tow100>
- Hoch G, Connell J, Roques A (2020) Testing multi-lure traps for surveillance of native and alien longhorn beetles (Coleoptera, Cerambycidae) at ports of entry and in forests in Austria. *Management of Biological Invasions* 11(4): 677–688. <https://doi.org/10.3391/mbi.2020.11.4.04>
- Imrei Z, Domingue MJ, Lohonyai Z, Moreira JA, Bálintné Csonka É, Fail J, Csóka G, Hanks LM, Tóth M, Millar JG (2021) Identification of pheromone components of *Plagionotus detritus* (Coleoptera: Cerambycidae), and attraction of conspecifics, competitors, and natural enemies to the pheromone blend. *Insects* 12(10): 899. <https://doi.org/10.3390/insects12100899>
- Lee S, Lee S (2020) Multigene phylogeny uncovers oviposition-related evolutionary history of Cerambycinae (Coleoptera: Cerambycidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 145: 106707. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106707>
- Lee HR, Lee SC, Lee DH, Jung M, Kwon JH, Huh MJ, Kim DS, Lee JE, Park IK (2018) Identification of aggregation-sex pheromone of the Korean *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) population, the main vector of pine wood nematode. *Journal of Economic Entomology* 111(4): 1768–1774. <https://doi.org/10.1093/jee/toy137>
- Liebhold AM, Brockerhoff EG, Garrett L, Parke J, Britton K (2012) Live plant imports, the major pathway for the forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10(3): 135–143. <https://doi.org/10.1890/110198>
- Lovett GM, Weiss M, Liebhold A, Holmes TP, Leung B, Lambert KF, Orwig DA, Campbell FT, Rosenthal J, McCullough DG, Wildova R, Ayres MA, Canham CD, Foster DR, LaDeau SL, Weldy T (2016) Nonnative forest insects and pathogens in the US: Impacts and policy options. *Ecological Applications* 26(5): 1437–1455. <https://doi.org/10.1890/15-1176>
- Marchioro M, Rassati D, Faccoli M, Van Rooyen K, Kostanowicz C, Webster V, Mayo P, Sweeney JD (2020) Maximizing bark and ambrosia beetle (Coleoptera: Curculionidae)

- catches in trapping surveys for longhorn and jewel beetles. *Journal of Economic Entomology* 113(6): 2745–2757. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa181>
- Meier LR, Zou Y, Millar JG, Mongold-Diers JA, Hanks LM (2016) Synergism between enantiomers creates species-specific pheromone blends and minimizes cross-attraction for two species of cerambycid beetles. *Journal of Chemical Ecology* 42(11): 1181–1192. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0782-z>
- Meier LR, Millar JG, Mongold-Diers JA, Hanks LM (2019) (*S*)-sulcatol is a pheromone component for two species of cerambycid beetles in the subfamily Lamiinae. *Journal of Chemical Ecology* 45(5–6): 447–454. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01071-7>
- Millar JG, Hanks LM (2017) Chemical ecology of cerambycids In: Wang Q (Ed.) *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, 161–208.
- Millar JG, Mitchell RF, Mongold-Diers JA, Zou Y, Bográn CE, Fierke MK, Ginzel MD, Johnson CW, Meeker JR, Poland TM, Ragenovich IR, Hanks LM (2018) Identifying possible pheromones of cerambycid beetles by field testing known pheromone components in four widely separated regions of the United States. *Journal of Economic Entomology* 111(1): 252–259. <https://doi.org/10.1093/jee/tox312>
- Millar JG, Richards AB, Halloran S, Zou YF, Boyd EA, Quigley KN, Hanks LM (2019) Pheromone identification by proxy: identification of aggregation-sex pheromones of North American cerambycid beetles as a strategy to identify pheromones of invasive Asian congeners. *Journal of Pest Science* 92: 213–220. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0962-4>
- Millar JG, Zou YF, Barringer L, Hanks LM (2021) Field trials with blends of pheromones of native and invasive cerambycid beetle species. *Environmental Entomology* 50: 1294–1298. <https://doi.org/10.1093/ee/nvab085>
- Miller DR, Allison JD, Crowe CM, Dickinson DM, Eglitis A, Hofstetter RW, Munson AS, Poland TM, Reid LS, Steed BE, Sweeney JD (2016) Pine sawyers (Coleoptera: Cerambycidae) attracted to  $\alpha$ -pinene, monochamol, and ipsenol in North America. *Journal of Economic Entomology* 109(3): 1205–1214. <https://doi.org/10.1093/jee/tow071>
- Miller DR, Crowe CM, Mayo PD, Reid LS, Silk PJ, Sweeney JD (2017) Interactions between ethanol, *syn*-2,3-hexanediol, 3-hydroxyhexan-2-one, and 3-hydroxyoctan-2-one lures on trap catches of hardwood longhorn beetles in Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology* 110(5): 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/jee/tox188>
- Miller SR, Crowe CM, Sweeney JD (2020) Trap height affects catches of bark and woodboring beetles (Coleoptera: Curculionidae, Cerambycidae) in baited multiple-funnel traps in Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology* 113: 273–280. <https://doi.org/10.1093/jee/toz271>
- Miller DR, Crowe CM, Mayo PD, Silk PJ, Sweeney JD (2022) Interactions between *syn*- and *anti*-2,3-hexanediol lures on trap catches of woodboring beetles and associates in southeastern United States. *Environmental Entomology* 51(1): 83–93. <https://doi.org/10.1093/ee/nvab111>
- Mitchell RF, Graham EE, Wong JC, Reagel PF, Striman BL, Hughes GP, Paschen MA, Ginzel MD, Millar JG, Hanks LM (2011) Fuscumol and fuscumol acetate are general attractants for many species of cerambycid beetles in the subfamily Lamiinae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 141(1): 71–77. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01167.x>



- Nahrung HF, Carnegie AJ (2021) Border interceptions of forest insects established in Australia: intercepted invaders travel early and often. *NeoBiota* 64: 69–86. <https://doi.org/10.3897/neobiota.64.60424>
- Nahrung HF, Liebhold AM, Borckerhoff EG, Rassati D (2023) Forest insect biosecurity: Processes, patterns, predictions, pitfalls. *Annual Review of Entomology* 68(1): 211–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-010854>
- Nie R, Vogler AP, Yang XK, Lin M (2021) Higher-level phylogeny of longhorn beetles (Coleoptera: Chrysomeloidea) inferred from mitochondrial genomes. *Systematic Entomology* 46: 56–70. <https://doi.org/10.1111/syen.12447>
- Nolte O, Krieger D (2008) Nachweis von *Saperda candida* Fabricius 1787 auf Fehmarn – eine weitere, bereits in Ansiedlung befindliche, eingeschleppte Käferart im Mitteleuropa. *DgaaE-Nachrichten* 22: 133–136. [http://www.dgaae.de/html/publi/nachricht/nach22\\_3.pdf](http://www.dgaae.de/html/publi/nachricht/nach22_3.pdf)
- Pajares JA, Álvarez G, Ibeas F, Gallego D, Hall DR, Farman DI (2010) Identification and field activity of a male-produced aggregation pheromone in the pine sawyer beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Chemical Ecology* 36(6): 570–583. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9791-5>
- Pajares JA, Alvarez G, Hall DR, Douglas P, Centeno F, Ibarra N, Schroeder M, Teale SA, Wang Z, Yan S, Millar JG, Hanks LM (2013) 2-(Undecyloxy)-ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 149: 118–127. <https://doi.org/10.1111/eea.12113>
- Pergl J, Pyšek P, Bacher S, Essl F, Genovesi P, Harrower CA, Hulme PE, Jeschke JM, Kenis M, Kühn I, Perglová I, Rabitsch W, Roques A, Roy DB, Roy HE, Vilà M, Winter M, Nentwig W (2017) Troubling travellers: are ecologically harmful alien species associated with particular introduction pathways? *NeoBiota* 32: 1–20. <https://doi.org/10.3897/neobiota3210199>
- Rabaglia RJ, Cognato AI, Hoebeke ER, Johnson CW, LaBonte JR, Carter ME, Vlach JJ (2019) Early detection and rapid response: A 10-year summary of the USDA Forest Service program of surveillance for non-native bark and ambrosia beetles. *American Entomologist* 65(1): 29–42. <https://doi.org/10.1093/ac/tmz015>
- Rassati D, Petrucco Toffolo E, Roques A, Battisti A, Faccoli M (2014) Trapping wood-boring beetles in Italian ports: A pilot study. *Journal of Pest Science* 87(1): 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0499-5>
- Rassati D, Faccoli M, Petrucco Toffolo E, Battisti A, Marini L (2015a) Improving the early detection of alien wood-boring beetles in ports and surrounding forests. *Journal of Applied Ecology* 52(1): 50–58. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12347>
- Rassati D, Faccoli M, Marini L, Haack RA, Battisti A, Petrucco Toffolo E (2015b) Exploring the role of wood waste landfills in early detection of non-native wood-boring beetles. *Journal of Pest Science* 88(3): 563–572. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0639-6>
- Rassati D, Marini L, Marchioro M, Rapuzzi P, Magnani G, Poloni R, Di Giovanni F, Mayo P, Sweeney JD (2019) Developing trapping protocols for wood-boring beetles associated with broadleaf trees. *Journal of Pest Science* 92(1): 267–279. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0984-y>
- Rassati D, Marchioro M, Flaherty L, Poloni R, Edwards S, Faccoli M, Sweeney JD (2021) Response of native and exotic longhorn beetles to common pheromone components

- provides partial support for the pheromone-free space hypothesis. *Insect Science* 28(3): 793–810. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12790>
- Ray AM, Žunič-Kosi A, Alten RL, McElfresh JS, Hanks LM, Millar JG (2011) *cis*-Vaccenyl acetate, a female-produced sex pheromone component of *Ortholeptura valida*, a long-horned beetle in the subfamily Lepturinae. *Journal of Chemical Ecology* 37: 173–178. DOI 10.1007/s10886-011-9908-5
- Ray AM, Francese JA, Zou Y, Watson K, Crook DJ, Millar JG (2019) Isolation and identification of a male-produced aggregation-sex pheromone for the velvet longhorned beetle, *Trichoferus campestris* (Faldermann). *Scientific Reports* 9(1): 4459. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41047-x>
- Ray AM, Arnold RA, Swift I, Schapker PA, McCann S, Marshall CJ, McElfresh JS, Millar JG (2014) (*R*)-Desmolactone is a sex pheromone or sex attractant for the endangered valley elderberry longhorn beetle *Desmocerus californicus dimorphus* and several congeners (Cerambycidae: Lepturinae). *PLoS ONE* 9(12): e115498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115498>
- Reddy GVP, Fettköther R, Noldt U, Dettner K (2005) Enhancement of attraction and trap catch of the old-house borer, *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera: Cerambycidae), by combination of male sex pheromone and monoterpenes. *Pest Management News* 61: 699–704. <https://doi.org/10.1002/ps.1044>
- Rodstein J, McElfresh JS, Barbour JD, Ray AM, Hanks LM, Millar JG (2009) Identification and synthesis of a female-produced sex pheromone for the cerambycid beetle *Prionus californicus*. *Journal of Chemical Ecology* 35(5): 590–600. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9623-7>
- Roques A (2010) Alien forest insects in a warmer world and a globalized economy: Impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *New Zealand Journal of Forestry* 40: 77–94.
- Roques A, Auger-Rozenberg M-A, Blackburn TM, Garnas JR, Pyšek P, Rabitsch W, Richardson DM, Wingfield MJ, Liebhold AM, Duncan RP (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions* 18(4): 907–920. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1080-y>
- Roques A, Shi J, Auger-Rozenberg MA, Ren L, Augustin S, Luo YQ (2020) Are invasive patterns of non-native insects related to woody plants differing between Europe and China? *Frontiers in Forests and Global Change* 2: 91. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00091>
- Rossa R, Goczał J (2021) Global diversity and distribution of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *The European Zoological Journal* 88(1): 289–302. <https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1883129>
- Russo E, Nugnes F, Vicinanza F, Garonna AP, Bernardo U (2020) Biological and molecular characterization of *Aromia bungii* (Faldermann, 1835) (Coleoptera: Cerambycidae), an emerging pest of stone fruits in Europe. *Scientific Reports* 10(1): 7112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63959-9>
- Ryall K, Silk P, Webster RP, Gutowski JM, Meng Q, Li Y, Gao W, Fidgen J, Kimoto T, Scarr T, Mastro V, Sweeney JD (2015) Further evidence that monochamol is attractive to *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) species, with attraction synergised by host plant

- volatiles and bark beetle (Coleoptera: Curculionidae) pheromones. *Canadian Entomologist* 147(5): 564–579. <https://doi.org/10.4039/tce.2014.67>
- Sarto i Monteyes V, Torras i Tutusaus G (2018) A new alien invasive longhorn beetle, *Xylotrechus chinensis* (Cerambycidae), is infesting mulberries in Catalonia (Spain). *Insects* 9(2): 52. <https://doi.org/10.3390/insects9020052>
- Schroeder M, Cocos D, Johansson H, Sweeney J (2021) Attraction of the cerambycid beetles *Tetropium gabrieli*, *T. castaneum* and *T. fuscum* to pheromones and host tree volatiles. *Agricultural and Forest Entomology* 23(2): 203–211. <https://doi.org/10.1111/afe.12422>
- Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Winter M, Arianoutsou M, Bacher S, Blasius B, Brundu G, Capinha C, Celesti-Grapow L, Dawson W, Dullinger S, Fuentes N, Jäger H, Kartesz J, Kenis M, Kreft H, Kühn I, Lenzner B, Liebhold A, Mosena A, Moser D, Nishino M, Pearman D, Pergl J, Rabitsch W, Rojas-Sandoval J, Roques A, Rorke S, Rossinelli S, Roy HE, Scalera R, Schindler S, Štajerová K, Tokarska-Guzik B, Van Kleunen M, Walker K, Weigelt P, Yamanaka T, Essl F (2017) No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications* 8(1): 71314435. <https://doi.org/10.1038/ncomms14435>
- Seebens A, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, Van Kleunen M, Winter M, Ansong M, Arianoutsou M, Bacher S, Blasius B, Brockerhoff EG, Brundu G, Capinha C, Causton CE, Celesti-Grapow L, Dawson W, Dullinger S, Economo EV, Fuentes N, Guénard B, Jäger H, Kartesz J, Kenis M, Kühn I, Lenzner B, Liebhold A, Mosena A, Moser D, Nentwig W, Nishino M, Pearman D, Pergl J, Rabitsch W, Rojas-Sandoval J, Roques A, Rorke S, Rossinelli S, Roy HE, Scalera R, Schindler S, Štajerová K, Tokarska-Guzik B, Walker K, Ward DF, Yamanaka T, Essl F (2018) Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 115(10): E2264–E2273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719429115>
- Seebens H, Bacher S, Blackburn TM, Capinha C, Dawson W, Dullinger S, Genovesi P, Hulme PE, van Kleunen M, Kühn I, Jeschke JM, Lenzner B, Liebhold AM, Pattison Z, Pergl J, Pyšek P, Winter M, Essl F (2021) Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology* 27: 970–982. <https://doi.org/10.1111/gcb.15333>
- Silva WD, Zou Y, Bento JMS, Hanks LM, Millar JG (2017) Aggregation-sex pheromones and likely pheromones of 11 South American cerambycid beetles, and partitioning of pheromone channels. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5: 101. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00101>
- Silva WD, Hanks LM, Alvarez JCS, Madalon FZ, Bento JMS, Bello JE, Millar JG (2020) Variations on a theme: Two structural motifs create species-specific pheromone channels for multiple species of South American cerambycid beetles. *Insects* 11(4): 222. <https://doi.org/10.3390/insects11040222>
- Sweeney JD, Silk PJ, Grebennikov V (2014) Efficacy of semiochemical-baited traps for detection of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in the Russian Far East. *European Journal of Entomology* 111(3): 397–406. <https://doi.org/10.14411/eje.2014.049>
- Sweeney JD, Hughes C, Webster V, Kostanowicz C, Webster R, Mayo P, Allison JD (2020) Impact of horizontal edge–interior and vertical canopy–understorey gradients on the



- abundance and diversity of bark and woodboring beetles in survey traps. *Insects* 11(9): 573. <https://doi.org/10.3390/insects11090573>
- Tavakilian GL, Chevillotte H (2022) Titan: base de données internationales sur les Cerambycidae ou Longicornes.
- Touroult J, Poirier E (2021) Nouvelles espèces et nouveaux signalements de longicornes des Petites Antilles (Coleoptera, Cerambycidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* 126(1): 15–24. [https://doi.org/10.32475/bsef\\_2161](https://doi.org/10.32475/bsef_2161)
- Venette RC, Hutchison WD (2021) Invasive insect species: Global challenges, strategies and opportunities. *Frontiers in Insect Science* 1: 650520. <https://doi.org/10.3389/fnsc.2021.650520>
- Vitali F, Schmitt T (2017) Ecological patterns strongly impact the biogeography of western Palearctic longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycoidea). *Organisms, Diversity and Evolution* 17: 163–180. <https://doi.org/10.1007/s13127-016-0290-6>
- Wermelinger B, Flückiger PF, Obrist MK, Duelli P (2007) Horizontal and vertical distribution of saproxylic beetles (Col., Buprestidae, Cerambycidae, Scolytinae) across sections of forest edges. *Journal of Applied Entomology* 131: 104–114. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01128.x>
- Wickham JD, Harrison RD, Lu W, Guo Z, Millar JG, Hanks LM, Chen Y (2014) Generic lures attract cerambycid beetles in a tropical montane rain forest in southern China. *Journal of Economic Entomology* 107(1): 259–267. <https://doi.org/10.1603/EC13333>
- Wickham JD, Lu W, Jin T, Peng Z, Guo D, Millar JG, Hanks LM, Chen Y (2016a) Prionic acid: an effective sex attractant for an important pest of sugarcane, *Dorystenes granulosus* (Coleoptera: Cerambycidae: Prioninae). *Journal of Economic Entomology* 109(1): 484–486. <https://doi.org/10.1093/jee/tov266>
- Wickham JD, Lu W, Long-Wa Z, Chen Y, Zou Y, Hanks LM, Millar JG (2016b) Likely aggregation-sex pheromones of the invasive beetle species *Callidiellum villosulum*, and the related Asian species *Allotraeus asiaticus*, *Semanotus bifasciatus*, and *Xylotrechus buqueti* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Economic Entomology* 109(5): 2243–2246. <https://doi.org/10.1093/jee/tow187>
- Wickham JD, Harrison RD, Lu W, Chen Y, Hanks LM, Millar JG (2021) Rapid assessment of cerambycid beetle biodiversity in a tropical rainforest in Yunnan Province, China, using a multicomponent pheromone lure. *Insects* 12: 277. <https://doi.org/10.3390/insects12040277>
- Xu T, Yasui H, Teale SA, Fujiwara-Tsujii N, Wickham JD, Fukaya M, Hansen L, Kiriya S, Hao D, Nakano A, Zhang L, Watanabe T, Tokoro M, Millar JG (2017) Identification of a male-produced sex-aggregation pheromone for a highly invasive cerambycid beetle, *Aromia bungii*. *Scientific Reports* 7(1): 7330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07520-1>
- Žunič-Kosi A, Zou YF, Hoskovec M, Vrezec A, Stritih N, Millar JG (2017) Novel, male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia alpina*, a priority species of European conservation concern. *PLoS ONE* 12(8): e0183279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183279>
- Žunič-Kosi A, Stritih-Peljhán N, Zou Y, McElfresh JS, Millar JG (2019) A male-produced aggregation sex pheromone of the beetle *Arhopalus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae, Spondyliinae) may be useful in managing this invasive species. *Scientific Reports* 9: 19570. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56094-7>

## Supplementary material I

### Total trapping network

Authors: Alain Roques, Lili Ren, Davide Rassati, Juan Shi, Evgueni Akulov, Neil Audsley, Marie-Anne Auger-Rozenberg, Dimitrios Avtzis, Andrea Battisti, Richard Bellanger, Alexis Bernard, Iris Bernadinelli, Manuela Branco, Giacomo Cavaletto, Christian Cocquempot, Mario Contarini, Béatrice Courtial, Claudine Courtin, Olivier Denux, Miloň Dvořák, Jian-ting Fan, Nina Feddern, Joseph Francese, Emily K. L. Franzen, André Garcia, Georgi Georgiev, Margarita Georgieva, Federica Giarruzzo, Martin Gossner, Louis Gross, Daniele Guarneri, Gernot Hoch, Doris Hölling, Mats Jonsell, Natalia Kirichenko, Antoon Loomans, You-qing Luo, Deborah McCullough, Craig Maddox, Emmanuelle Magnoux, Matteo Marchioro, Petr Martinek, Hugo Mas, Bruno Mériguet, Yong-zhi Pan, Régis Phélut, Patrick Pineau, Ann Marie Ray, Olivier Roques, Marie-Cécile Ruiz, Victor Sarto i Monteys, Stefano Speranza, Jiang-hua Sun, Jon D. Sweeney, Julien Touroult, Lionel Valladares, Loïs Veillat, Yuan Yuan, Myron P. Zalucki, Yunfan Zou, Alenka Žunič-Kosi, Lawrence M. Hanks, Jocelyn G. Millar

Data type: site description (excel document)

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this Dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/neobiota.84.91096.suppl1>



---

## **Chapitre II : DNA metabarcoding, an efficient way to detect non-native cerambycid beetles in trapping collections ?**

---

### **Résumé en français du chapitre II :**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité du metabarcoding dans un contexte de biosurveillance de cérambycidés xylophages. Pour ce faire, trois technologies de séquençage seront comparées : le MinION d'Oxford Nanopore, le MiSeq d'Illumina et la technologie IonTorrent. De plus, nous examinerons les effets de divers facteurs sur la détection des espèces comme le type de piégeage utilisé (piège sec / piège humide), la concentration / qualité de l'ADN des individus ainsi que la taille de l'amplicon amplifié lors de la PCR. Pour cette étude, nous avons construit six communautés fictives (bulks samples). Les bulks ont été construits avec pour objectifs (i) d'étudier la capacité des différentes technologies de séquençage à identifier et distinguer des espèces génétiquement proches (espèces sœurs, espèces cryptiques) (ii) d'évaluer la capacité des différentes technologies de séquençage à détecter des espèces présentes en très faible quantité dans les pièges et (iii) mimer le contenu de pièges réels, que ce soit en termes de composition en espèce ou en nombre d'individus par espèce. Le MinION a été autant performant que les deux autres technologies de séquençage pour la détection / discrimination d'espèces proches génétiquement et pour la détection d'espèces présentes en faible quantité dans les pièges. Ces résultats nous indiquent que le MinION d'Oxford Nanopore semble équivalent à l'Illumina MiSeq ou à la technologie IonTorrent en termes de fiabilité des résultats dans un contexte de biosurveillance. Concernant nos expérimentations sur les impacts des conditions de capture sur les taux de détection, nos résultats indiquent clairement que les individus capturés au sein des pièges "humides" sont bien moins souvent détectés que les échantillons capturés au sein de pièges "secs". Finalement la qualité de la base de données de référence utilisée est également un paramètre primordial pour effectuer une analyse fiable. En effet nos résultats montrent que les bases de données de référence sont pour le moment loin d'être exhaustives et que de nombreuses erreurs y sont présentes pouvant fausser les résultats obtenus.

To be submitted to Neobiota

## **DNA metabarcoding, an efficient way to detect non-native cerambycid beetles in trapping collections?**

Loïs Veillat<sup>1</sup>, Stéphane Boyer<sup>2</sup>, Marina Querejeta<sup>2,4</sup>, Emmanuelle Magnoux<sup>1</sup>, Alain Roques<sup>1</sup>, Carlos Lopez-Vaamonde<sup>1,2\*</sup>, Geraldine Roux<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>INRAE, UR633, Zoologie Forestière, F-45075 Orléans, France

<sup>2</sup>Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR7261 CNRS - Université de Tours, France

<sup>3</sup>Laboratoire Physiologie, Ecologie et Environnement P2E, Université d’Orléans, 1 rue de Chartres, B.P. 6759, 45067 Orléans cedex 2, France

<sup>4</sup>Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

Correspondance : Loïs Veillat and Géraldine Roux, INRAE, UR633, Zoologie Forestière, F-45075 Orléans, France. [lois.veillat@inrae.fr](mailto:lois.veillat@inrae.fr) ; [geraldine.roux@univ-orleans.fr](mailto:geraldine.roux@univ-orleans.fr)

\*These authors contributed equally to this work

### **Abstract**

Individual sorting and identification of thousands of insects collected in mass trapping biosurveillance programs is a labour intensive and time-consuming process. Metabarcoding, allows for the simultaneous identification of multiple individuals in a single mixed sample and has the potential to expedite this process. However, detecting all the species present in a bulk sample can be challenging, especially when under-represented non-native specimens are intercepted.

In this study, we quantified the effectiveness of DNA metabarcoding at detecting exotic species within six different mock communities of native and non-native species of European xylophagous cerambycid beetles. The main objective is to compare three different sequencing technologies (MinION, Illumina, and IonTorrent) to evaluate which

one is the most suitable in this context. Although we did not observe significant differences in the total number of species detected between the three sequencing technologies, MinION detected a greater number of species on field-like samples. All three sequencing technologies achieved in detecting and identifying closely related species and species at low abundance. The capture method of insects in the field greatly influences sample preservation and detection. Individuals captured in traps containing monopropylene and water had lower DNA concentration, leading to lower species detection rates compared to individuals killed using just an insecticide without any collection medium.

**Keywords:** Alien, Biological invasions, Biosecurity, Cerambycidae, Exotic, Illumina®, IonTorrent®, Oxford Nanopore®, Xylophagous.

## **Introduction**

The exponential increase in biological invasions that has been observed over the past decades is expected to persist (Seebens et al. 2021). This is primarily due to factors such as globalization, tourism, and global warming (Chown et al. 2015). Among the species introduced beyond their native range by human activities, insects are the most prevalent group (Seebens et al. 2018) and can cause a wide range of impacts. Non-native insects can affect native flora, fauna and ecosystems in various ways (Kenis et al. 2009) and they can as well transmit pathogens and diseases, thus threatening public health (Mazza et al. 2014). Economic implications are also to be considered since numerous invasive insects are important pests for agricultural crops and plantation forests, inducing huge management costs (Bradshaw et al. 2016).

Among these non-native insects, species associated with woody plants are increasingly dominating, accounting for 76.5% of all herbivore species newly recorded in Europe from 2000 to 2014 potentially because of the growing trade of ornamental plants and wooden packaging material transported in international cargo shipments (Aukema et al. 2010; Roques et al. 2016). One of these important families of xylophagous beetles is the long-horned Cerambycidae, with more than 200 species affecting forestry, horticulture, and agriculture (Rossa and Goczał 2021), and resulting in multimillion-dollar losses every year (Wang 2017). To detect potential new invasions of Cerambycids, biomonitoring programs have been set up over large geographical areas with intensive trapping campaigns extending over several years (Roques et al. 2023; Mas et al. 2023). However, rapidly evolving trades lead to changes in trade routes and imported goods which results in an increasing arrival of new non-native species. Many of these species have not been previously reported as invaders, some are not considered to be pests in their native ranges, and some could even be unknown to science (Seebens et al. 2018). As part of the European project HOMED (<https://homed-project.eu/>) 244 Cerambycid traps were set up across Europe (France, Italy, Spain, Switzerland, Portugal, Austria, England, Greece, Slovenia, Netherlands, Bulgaria, Czech Republic, and in Sweden), 38 in Asia (China, Siberia, Russia), 11 in North America (USA, Canada), five in the Caribbean (Martinique) and four in Australia, all baited with generic lures, for simultaneous detection of multiple species (Roques et al. 2023). In such large-scale trapping campaigns, thousands of captured insects must be sorted and identified by expert taxonomists. This identification step is time-consuming and labor-intensive, thus limiting the rapid detection of non-native individuals among large numbers of native

ones (Piper et al. 2019; Abeynayake et al. 2021; Chua et al. 2023). Yet, it is essential that those non-native species are detected as quickly as possible to allow their eradication before establishment and dispersal (Richardson et al. 2000; Blackburn et al. 2011; Giovani et al. 2020).

For insects, traditional DNA barcoding, using a short fragment of the Cytochrome Oxidase 1 (*COI*) gene, has truly become a universal tool to identify a species whatever the life stage (Hebert et al., 2003). Namely, DNA barcoding has been successfully used to accurately identify cerambycid pest species for biomonitoring (Hodgetts et al. 2016, Wu et al. 2017, Kelnarova et al. 2019, Javal et al. 2021). Despite its numerous advantages, individual DNA barcoding remains a laborious and time-consuming approach in the context of mass trapped insects as it requires individual sorting of thousands of specimens, tissue sampling (often legs), DNA extraction and amplification and finally sequencing of each sample individually. However, the recent application of high-throughput sequencing (HTS) technologies to DNA barcoding allows to expedite the production of thousands of DNA barcodes (deWaard et al. 2019; Srivathsan et al. 2021).

This metabarcoding approach generates a large number of short DNA sequences (reads), allowing the accurate identification of multiple species simultaneously from a single mixed sample (hereafter called “bulk”) (Liu et al. 2020), such as all the individual insects captured in a single biomonitoring trap. Moreover, compared to traditional morphological identification, metabarcoding offers a significant reduction in costs (Batovska et al. 2021), generally providing equivalent or better detection and identifying a much wider spectrum of taxa (Elbrecht et al. 2017; Andújar et al. 2018). Using DNA as



a proxy for species detection and considering sequence variation within and among taxa, metabarcoding approaches are however constrained by the completeness of the reference databases to accurately assign sequences to correctly identified taxa (Liu et al. 2020).

Although metabarcoding has several advantages, ensuring the accuracy of detections is crucial. Erroneous detections of pest species can have severe environmental and economic consequences (Batovska et al. 2021). However, metabarcoding approaches still suffer from methodological limitations that may make them unsuitable for rapid biosecurity detection (contaminations, limited quantitative aspect, incomplete databases, false positives, etc.). One specific challenge is the time required to process samples, which can be problematic when there are long delays between capturing individuals and obtaining sequencing results. This is especially true when sampling sites are located far away from laboratories, when transporting samples may require specific permits for certain species. Additionally, when external providers are slow to sequence samples, it further delays the process. These limitations can hinder biomonitoring projects and slow down the detection of potential invasive species. As a result, the implementation of measures to mitigate their impacts may also be delayed (Krehenwinkel et al. 2019; Egeter et al. 2022). Despite these limitations, the Illumina MiSeq sequencing technology has been favored due to its lower error rate and well-established bioinformatic procedures (Piper et al., 2019). Yet, Braukmann et al. (2019) demonstrated similar performance in sequence quality and insect species recovery using IonTorrent platforms (Ion Torrent PGM, and Ion Torrent S5), which are more affordable and thus less often dependent on external providers and their sequencing delays.

In recent years, Oxford Nanopore Technologies® have released a very inexpensive portable sequencing platform, the MinION. This small sequencer can be connected via USB to a laptop to perform sequencing (Krehenwinkel et al. 2019) in the field and obtain sequencing data in real time conditions. Indeed, the MinION for a metabarcoding application offers the possibility of performing DNA sequencing of bulk samples directly on site without the need for transport or relying on external sequencing providers. So far, although the MinION does not seem suitable for the characterization of complex communities, it is already suitable for the analysis of metabarcoding data when the species diversity per sample is low and the target species are well represented in public databases (Ho et al. 2020). In addition, recent developments in Nanopore technology and base calling have reduced sequence error from 6% (Srivathsan et al 2021) down to less than 1% (Srivathsan et al 2024).

The primary objective of our study was to determine the most effective metabarcoding approach for the biosurveillance of Cerambycid wood-boring beetles. To achieve this, we compared the performance of three Next Generation Sequencing technologies: the portable Nanopore sequencer MinION, the Illumina MiSeq and the Ion GeneStudio S5 (IonTorrent®). Our evaluation focused on their ability to detect invasive species in different mock communities. Specifically, we assessed their accuracy in differentiating between closely related cerambycid species and detecting low-abundance species in mixed trap samples. Additionally, we analysed various metabarcoding primer pairs to evaluate their accuracy in species identification. Finally, we emphasized the significance

of the field sampling protocol, particularly the trapping methods (dry versus monopropylene glycol) in species detection.

## **Materials and Methods**

### *Taxa sampling*

Mock communities were constructed using 48 field-trapped specimens from different countries in Europe (France, Greece, Portugal, Spain), China (Beijing and Zhejiang Province) and USA (Michigan) (**Tab. 1**), as part of a worldwide trapping experiment using multi-funnel traps baited with a generic attractant blend including eight Cerambycid pheromones (see details of the blend composition and trapping methods in Roques et al. 2023). Most of the specimens (36/48) were caught using  $\alpha$ -cypermethrin insecticide (Storanet®, BASF Pflanzenschutz Deutschland, Germany) in the trap basins, of which the bottom had been replaced with a wire mesh to allow drainage and keep specimens dry (hereafter called “dry” method). Other specimens (12/48) were captured using a 50:50 ratio of monopropylene glycol (MPG) and water (hereafter called “wet” method). Cerambycides collected from field-traps were stored in ethanol 95% and kept at -20°C until further processing. Two individuals were captured by hand (“hand collected” in Table 1) and pinned in collection boxes after capture. Date, country of collection, type of trap and the 48 specimens used in mock communities are detailed in Table 1.

### *Mock community construction and DNA extraction*

Six mock communities with varying species composition were assembled as follows:

Test 1: Identifying closely related species.

To assess the efficiency of the different sequencing technologies and primers to differentiate between sister species, bulks 1 and 2 were composed of congeneric species (**Tab. 1**). Two legs from each individual (one specimen per species) were collected and pooled to constitute the bulks. The whole set of legs was then ground using flame-sterilized metal pestles to limit the risk of contamination. DNA from the ground material was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Two additional legs were taken from the same specimens, to assess the quantity and quality (A260/280 and A260/230 ratios) of DNA for each specimen individually (**Fig. 1a**).

Test 2: Detecting low abundance species.

Bulks 3 and 4 were composed of six species represented by heterogeneous DNA concentrations (**Tab. S1**) to assess the ability of the sequencing technologies and primers to detect species present in a very low abundance. DNA of each individual (one specimen per species) was previously extracted using two legs that were ground as above and processed using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit. To construct bulks 3 and 4, individual DNA extracts were quantified using a fluorometer (Nanodrop™, Thermo Fisher Scientific) and mixed together according to their concentration to achieve the needed proportions of DNA for each individual (six individuals of different species ranging from 41% to 3% for Bulk 3 and six individuals of different species ranging from 50% to 0.5% for bulk 4) (**Tab. 1, Fig. 1b**).

Test 3: Mimicking field trap content on species composition.

Bulks 5 and 6 were built to reconstitute real trap contents by a collaborator involved in Cerambycidae trapping campaigns using multi-pheromonal traps (Roques et al., 2023). These bulks include individuals from a number of species native to Europe usually found in the traps deployed there, with the addition of non-native species which have either already been introduced or at risk of being introduced in Europe (Bulk 5: 22 individuals of eight species, including one non-native (*Cordylomera spinicornis*); Bulk 6: 41 individuals of 12 species including two non-native ones (*Xylotrechus stebbingi* and *Xylotrechus chinensis*) (**Tab. 1**). The DNA was extracted following the same protocol as for bulks 1 and 2 where two legs were taken from each individual and ground together for DNA extraction (**Fig. 1a**).

<b>Bulk</b>	<b>Species</b>	<b>Country of collection</b>	<b>Collection Year</b>	<b>Collection type</b>
1	<i>Arhopalus ferus</i>	Portugal	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
1	<i>Arhopalus rusticus</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
1	<i>Arhopalus syriacus</i>	Portugal	2019	Monopropylene glycol (wet method)
1	<i>Xylotrechus arvicola</i>	Portugal	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
1	<i>Xylotrechus chinensis</i>	Greece	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
1	<i>Xylotrechus stebbingi</i>	Greece	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
1	<i>Xylotrechus undulatus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)

2	<i>Monochamus galloprovincialis</i>	Portugal	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<i>Monochamus sutor</i>	France	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
2	<i>Monochamus carolinensis</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<i>Monochamus scutellatus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<i>Phymatodes amoenus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<b><i>Phymatodes testaceus</i></b>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<i>Phymatodes varius</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<i>Phymatodes aereus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
2	<b><i>Phymatodes dimidiatus</i></b>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
3	<i>Pyrrhidium sanguineum</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
3	<b><i>Xylotrechus stebbingi</i></b>	Spain	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
3	<i>Monochamus galloprovincialis</i>	Spain	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
3	<b><i>Xylotrechus chinensis</i></b>	Greece	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
3	<i>Chlorophorus glabromaculatus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
3	<i>Phymatodes testaceus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
4	<i>Arhopalus ferus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)

4	<i>Monochamus sutor</i>	France	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
4	<i>Aegomorphus francottei</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
4	<i>Monochamus galloprovincialis</i>	France	2018	Cypermethrin insecticide (dry method)
4	<i>Xylotrechus stebbingi</i>	Spain	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
4	<i>Xylotrechus chinensis</i>	Greece	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Pyrrhidium sanguineum</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Batocera rubus</i>	China	2012	Hand collected
5	<i>Cerambyx scopolii</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Cordylomera spinicornis</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Leiopus femoratus</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Leiopus nebulosus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
5	<i>Pachyta bicuneata</i>	China	1987	Hand collected
5	<i>Stictoleptura cordigera</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Arhopalus rusticus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Xylotrechus chinensis</i>	Greece	2019	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Plagionotus detritus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Plagionotus arcuatus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)

6	<b><i>Xylotrechus stebbingi</i></b>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Arhopalus syriacus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Arhopalus fesus</i>	France	2020	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Xylotrechus colonus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)
6	<i>Chlorophorus ruficornis</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Phymatodes testaceus</i>	France	2021	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Prionus coriarius</i>	France	2010	Cypermethrin insecticide (dry method)
6	<i>Phymatodes amoenus</i>	USA	2019	Monopropylene glycol (wet method)

Table 1: Species, origin, date and condition of capture of the specimens used in the 6 bulks used. Species names in bold correspond to exotic species. We consider specimens that have been captured on a different continent than their place of origin as exotic.



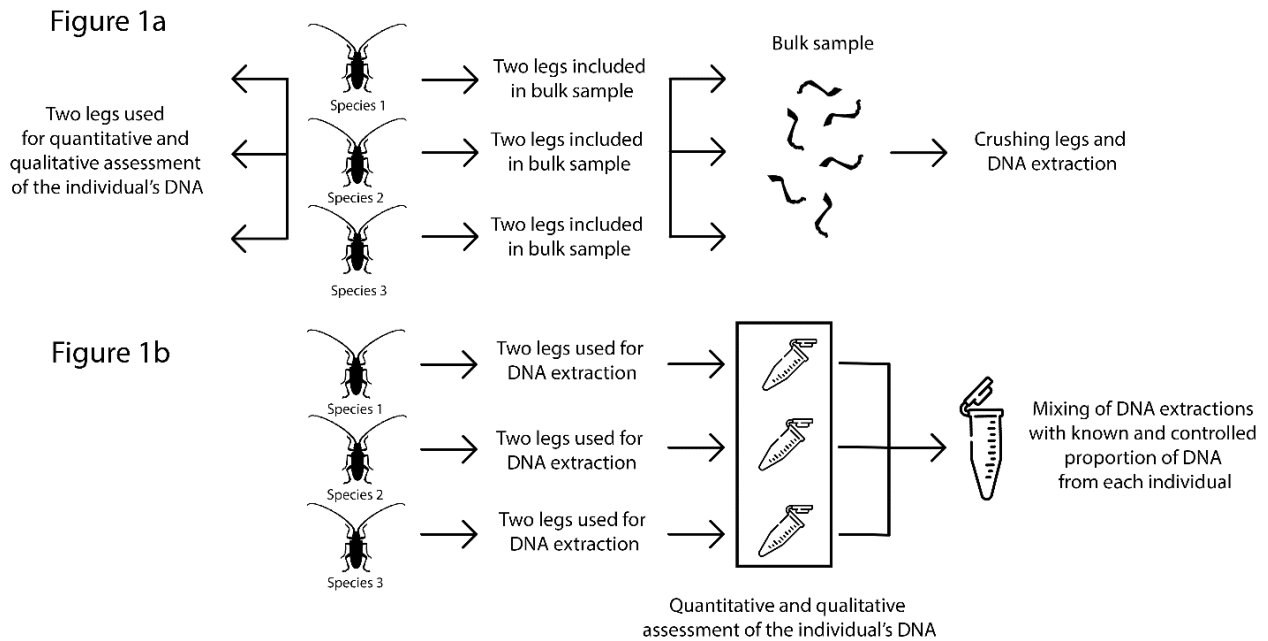


Figure 1: Overview of the DNA extraction protocol for tests 1 (identifying closely related species) and 3 (mimicking field trap content on species composition) (Fig. 1a) and for test 2 (detecting low abundance species) (Fig. 1b).

### PCR amplification

All bulks samples were amplified with two pairs of primers internal to the commonly used barcode fragment : BF3/BR2 (called hereafter “B”) (CCHGAYATRGCHTTYCCHCG / TCDGGRTGNCCRAARAAYCA (Elbrecht and Leese 2017; Elbrecht et al. 2019), which generates a 458 bp was used for all the technologies; and fwhF2/fwhR2n (called hereafter “F”) (GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC / GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG), which generates a shorter 254 bp amplicon (Vamos et al. 2017) was used for Illumina and MinION technologies only. Each PCR comprised 15.3 µl H<sub>2</sub>O, 2.5 µl 10X PCR buffer, 2.5 µl dNTPs [1mM], 1 µl of each primer [0.4mM], 0.2 µl Dream Taq (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µl Betaine [100mM] and 2 µl DNA for a total of 25 µl per reaction. For both primer pairs, PCR was performed using the same program: 95°C for 5 min, 29 cycles of 95°C for 30 s, 48°C for 30 s, and 72°C for 50 s and

72°C for 5 min (Elbrecht et al. 2019). PCR products were then run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualised by UV transilluminator. The PCR products were then purified with the NucleoFast 96 PCR plate purification kit (Macherey-Nagel). Three PCR replicates were performed for the six bulks when using the MinION technology.

#### *Illumina® library preparation*

A second ligation PCR was performed on the products of the first PCR to add Illumina® tags and adapters, prepared by ligating Nextera XT indices through an eight cycle PCR (with a modified PCR protocol). The second PCR was carried out with the same conditions as for the initial PCR. Reactions (25 µl) contained the following: 5 µl of template DNA (purified products from the first PCR), 1 µl of each primer [10 µM], 5 µl of 5X GoTaq (Promega) reaction buffer, 1 µl of MgCl<sub>2</sub> [25mM], 1 µl of BSA [1 mg/ml], 0.5 µl of dNTPs [5mM], 0.125 µl of GoTaq G2 Polymerase (Promega) and 10.375 µl of molecular-grade water to reach 25 µl. The PCR conditions were the same as for the first PCR, with eight cycles. The products of the second PCR were verified on a 2% agarose gel. PCR products were then equimolarly pooled into two different pools (one pool per primer pair used) and purified using the GeneJET Gel Extraction kit from an agarose gel, following manufacturer's instructions. This library was sequenced in Illumina MiSeq using V3 chemistry (300 × 300 bp, 600 cycles) in the Sequencing Center within the Biozentrum of the Ludwig-Maximilian University in Munich (Germany).

#### *MinION library preparation*

Libraries were prepared according to the Oxford Nanopore Technologies ® protocol: "PCR barcoding (96) amplicons (SQK-LSK110) (version:

PBAC96\_9114\_v110\_revF\_10Nov2020)" with the following specifications. After the first PCR describe above, the Nanopore PCR barcoding expansion Pack 1-96 (EXP-PBC096) was used to perform the second PCR to incorporate the Oxford Nanopore Technologies ® barcode sequences on the amplicons generated in the first PCR.

Reactions (50 µl) contained the following: 2 µl of template DNA (purified products from the first PCR), 0.5 µl of each primer [10 µM], 10 µl of 5X GoTaq (Promega) reaction buffer, 2 µl of MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 2 µl of BSA [1 mg/ml], 2 µl of Q solution, 1 µl of dNTPs [5 mM], 0.3 µl of GoTaq G2 Polymerase (Promega) and 29.7 µl of molecular-grade water to reach 25 µL. The thermocycling conditions followed the manufacturer recommendations: 95°C for 3 min, followed by 15 cycles of 95°C for 15 s, 62°C for 15 s, and 65°C for 30 s and 65°C for 7 min.

Final PCR products were then quantified using Qubit and equimolarly pooled before being purified with Agencourt AMPure XP beads (Beckam Coutler). The final pool was then sequenced on the MinION sequencer (Mk1c; Oxford Nanopore Technologies ®, UK) using a R10.3 flowcell (MIN111) with 1331 pores available and the LSK110 ligation sequencing kit. The two replicates of bulk 6 using the MinION technology were of insufficient quality (Nanodrop) and were therefore removed from the analysis.

#### *IonTorrent® library preparation*

For the production of the libraries, we started with 5 ng of DNA extract (Qubit measurement). The Nextflex Cellfree DNaseq kit (PerkinElmer) was used for the process. The quality of the libraries was assessed using Qubit (for quantification) and

Bioanalyzer (using the HighSensitivity kit from Agilent, for size verification). After quality control, each library was amplified by emulsion PCR on the Ion One Touch 2 instrument, with a concentration of 15 pg/ $\mu$ l. Subsequently, the libraries were sequenced on an Ion GeneStudio S5 system using a single-end sequencing protocol with a 300 bp read length. Sequencing was performed on an Ion 520 Chip by the GeT-BioPuces platform (Toulouse, France).

#### *False positive detections*

False positive detections are considered as the detection of a species within a bulk that was not initially present when the bulks were constructed. In order to estimate the representativeness of false positives within true positives in the bulks, the total number of reads assigned to false positive OTUs was reconciled and compared to the number of reads assigned to non-false positive detections. The number of false positives detected according to the different tested combinations are indicated in **Tab. S2**.

#### *Reference Barcode Dataset*

A dataset was built using all the public sequences of all Cerambycidae species available in BOLD systems v4 (Ratnasingham and Hebert 2007). It was then verified whether all 33 species present in the bulk samples were represented by at least one sequence in the database. Three species not previously included in the database were barcoded through Sanger sequencing on an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) using the Big-Dye Terminator V3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) and BF3/BR2 primer pair. They were subsequently added to our local database to ensure that they were

represented by at least one barcode sequence. The number of sequences in the database for each species is shown in **Tab. S1**.

The final reference data set is available from BOLD in the dataset DS-MINION ([dx.doi.org/10.5883/DS-MINION](https://dx.doi.org/10.5883/DS-MINION)) and includes once barcode per species together with the three newly generated barcodes. Lab Sheet from the DS-MinION database is shown in **Tab. S3**.

#### *Illumina® data processing*

The raw data was analysed using the *FROGS v4.0.1* pipeline, a standardized pipeline containing a set of tools that are used to process amplicon reads that have been produced from Illumina® sequencing (Escudié et al. 2018; Henrie et al. 2022). First, amplicons with a size between 408 and 508 for the BF3/BR2 primer pair and 204 and 304 for the fwhF2/fwhR2n primer pair were retained using Pre-process tool. Sequence clustering was then performed using the SWARM algorithm (Mahé et al. 2014) with a maximum sequence difference set at  $d=1$  (--distance 1 parameter), as recommended by SWARM. Chimeric sequences were then removed with Remove chimera tool. Sequences were aligned to the same database used for the MinION and IonTorrent® data analysis. In order to remove all spurious detections, OTU detections with less than 10 reads were removed. In barcoding and metabarcoding studies of insects, the sequence similarity level for OTU identification usually ranges from 95% to 99% (e.g., Gibson et al., 2014; Zenker et al., 2016). We calculated the best threshold value for our dataset by applying the function *localMinima* from R package *spider v1.5.0* (Brown et al., 2012). Based on this

analysis, we used a threshold of 98% to assign OTUs to species level. The resulting OTU tables for Illumina F and Illumina B are provided in **Tab. S4** and **Tab. S5**, respectively.

#### *MinION and IonTorrent® data processing*

Bioinformatics analyses were performed on the Genotoul Bioinformatics Platform (INRAE, Toulouse, France). Basecalling and demultiplexing were performed for MinION data using Guppy v6.1.7; ONT; high accuracy base calling mode; parameters: `-c dna_r10.3_450bps_hac.cfg --min_qscore 5 --trim_barcodes`. Then, for MinION and IonTorrent® data, we used the *msi* data processing pipeline v0.3.6 (Egeter et al. 2022) to reduce the error rate of the reads by polishing them after the basecalling step. Reads smaller than 40bp were removed with cutadapt v4.0 (Martin 2011). The size range was set between 408bp and 508bp for BF3/BR2 and between 204bp and 304bp for fwhF2/fwhR2n. The clustering step was carried out with *ISONCLUST* v0.0.6.1 (Sahlin and Medvedev 2020; with parameters: `--mapped_threshold 0.825` and `--aligned_threshold 0.55`) and a consensus sequence per cluster was generated using RACON v1.5.0 (Vaser et al. 2017). The polished reads were then clustered at 97% sequence identity with *CD-HIT* v4.8.1 (Fu et al. 2012) and a representative sequence from each cluster (centroid) was selected. The polished reads were then aligned to the local database with BLAST (BLASTn algorithm). The following parameters were used: `-word_size 11 -perc_identity 95 -qcov_hsp_perc 98 -gapopen 0 -gapextend 2 -reward 1 -penalty 1 -max_target_seqs 100`. Similarly, to the Illumina® data processing, OTU detections with less than 10 reads were removed. Finally, a taxonomic assignment was performed for each query using a Lowest Common Ancestor (LCA) approach with the bioinformatics package metabinkit (Chain et al. 2016; Egeter et al. 2018; Kitson et al. 2019) with the following thresholds:

98% at species level, 97% at genus level, 95% at family level (Alberdi et al. 2018; Egeter et al. 2022). The resulting OTU tables for MinION B, MinION F and IonTorrent B are provided in Tab. S6, Tab. S7 and Tab. S8 respectively.

### *Statistical analysis*

A two-sample test of proportions was used to compare and assess the significance of the proportion of reads assigned to the species levels for MinION, Illumina, and IonTorrent technologies using the "Social Science Statistics" website (<https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx>). The proportion of reads assigned to different taxonomic levels was calculated by summing the total reads from different bulk samples for each condition. To determine if the number of false positives was significantly different among the three technologies and the two primer pairs, we calculated the detection mean for each bulk under different conditions. We then performed an ANOVA test followed by a Tukey HSD test using the "Social Science Statistics" website. The Wilcoxon test, Exact Fisher's test and standard deviation were calculated in R v4.3.2 (<https://www.R-project.org/>).

### **Results**

A total of 1,248,95 reads were sequenced with the MinION Nanopore® technology using the F primer pair, with an average of 78,037 (SD=28,415) reads per sample. After quality filtering, and removal of reads of incorrect size or insufficient quality, 1,113,844 (89.2%) reads were retained, with an average of 69,615 (SD=25,508) reads per bulk. For the B primer pair, a total of 1,132,604 reads were sequenced, with an average of 62,922

(SD=17,442) reads per sample. After quality filtering, a total of 948,832 (83.8%) reads were retained, with an average of 52,712 (SD=14,512) reads per bulk (**Tab. 2**).

The Illumina® sequencing produced a total of 1,549,894 reads using the B primer pair, with an average of 258,316 (SD=39,365) reads per bulk. After quality filtering, 1,025,637 (66.2%) reads were retained, with an average of 170,940 (SD=69,961) reads per bulk. For the F primer pair, a total of 2,383,028 reads were sequenced, with an average of 397,171 (SD=84,482) reads per bulk. After quality filtering, 1,686,058 (73.3%) reads were retained, with an average of 281,010 (SD=112,512) reads per bulk (**Tab. 2**).

Regarding the IonTorrent® technology, 838,489 reads were sequenced, with an average of 139,748 (SD=17,086) reads per bulks with the B primer pair. After the quality filtering, 280,695 (33.5%) reads remains with an average of 46,782 (SD=5,025) reads per bulks (**Tab. 2**).

Technology	Primer pair	n_raw_reads	n_reads_post_filtering
MinION	B	1,132,604	948,832
	F	1,248,95	1,113,844
Illumina	B	1,549,894	1,025,637
	F	2,383,028	1,686,058
IonTorrent	B	838,489	280,695

Table 2: Number of raw reads obtained after sequencing and after pre-process steps according to sequencing technologies and primer pairs used.

### *Benchmarking of sequencing technologies*

The MinION technology accurately identified 28 out of 48 specimens at the species level, Illumina® technology allowed specific identification of 27 specimens and IonTorrent®



identified 24 specimens. The primer pair F enabled the specific identification of 27 specimens at species level while the primer pair B enabled the identification of 31 specimens at species level. Illumina® F, Illumina® B and MinION B allowed for 25 species-level identifications across all bulks and 24 for MinION F and for IonTorrent® B. This difference was not significant (Fisher's Exact Test,  $p = 1.00$ ) (**Fig. 2**).

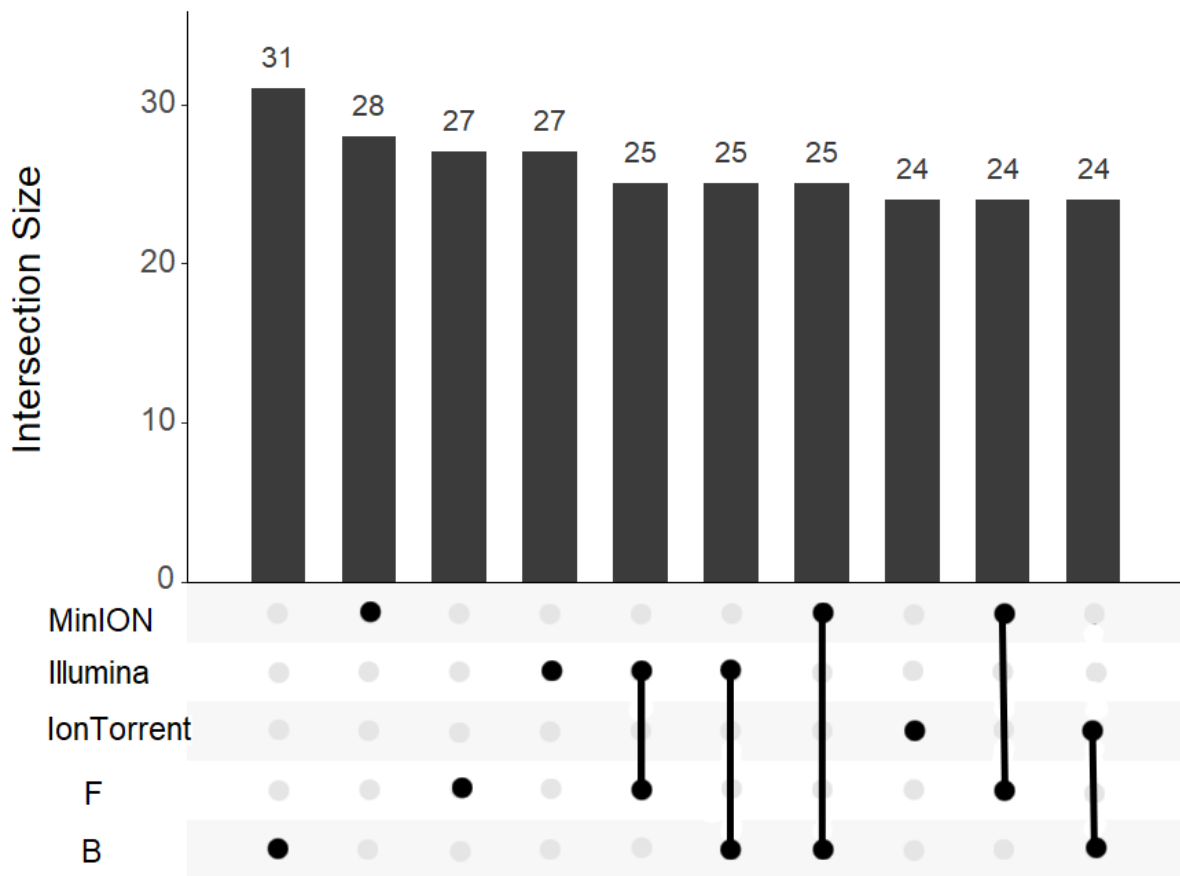


Figure 2: Upset plot showing the number of individuals detected at species level according to the three technologies (Illumina, MinION and IonTorrent), primer pairs (F=fwhF2/fwhR2n [254bp] and B=BF3/BR2 [458bp]) and technology-primer pair combinations tested.

The number of reads assigned at the species level was significantly higher with Illumina® technology ( $p.value < 0.00001$ ) compared to MinION. Nearly 97% of reads were assigned at the species level for the Illumina® F combination compared to 90% for

the MinION F combination (p.value < 0.0001). As for primer pair BF3/BR2, over 87.3% of reads were assigned at the species level for Illumina®, followed by over 79.7% for MinION technology and over 77.2% for IonTorrent® technology (**Fig. 3**). The primer pair fwhF2/fwhR2n resulted in a significantly higher percentage of reads assigned at the species level (93.6%) (considering both Illumina® and MinION technologies) compared to couple of primers B (81.4%) (considering all three technologies) (p.value < 0.00001). Summary table of the number of reads (**Tab. S8a**) or percentage (**Tab. S8b**) assigned to the taxonomic levels of species, genus and family or higher or all conditions tested are shown in **Tab. S9a** and **Tab. S9b**

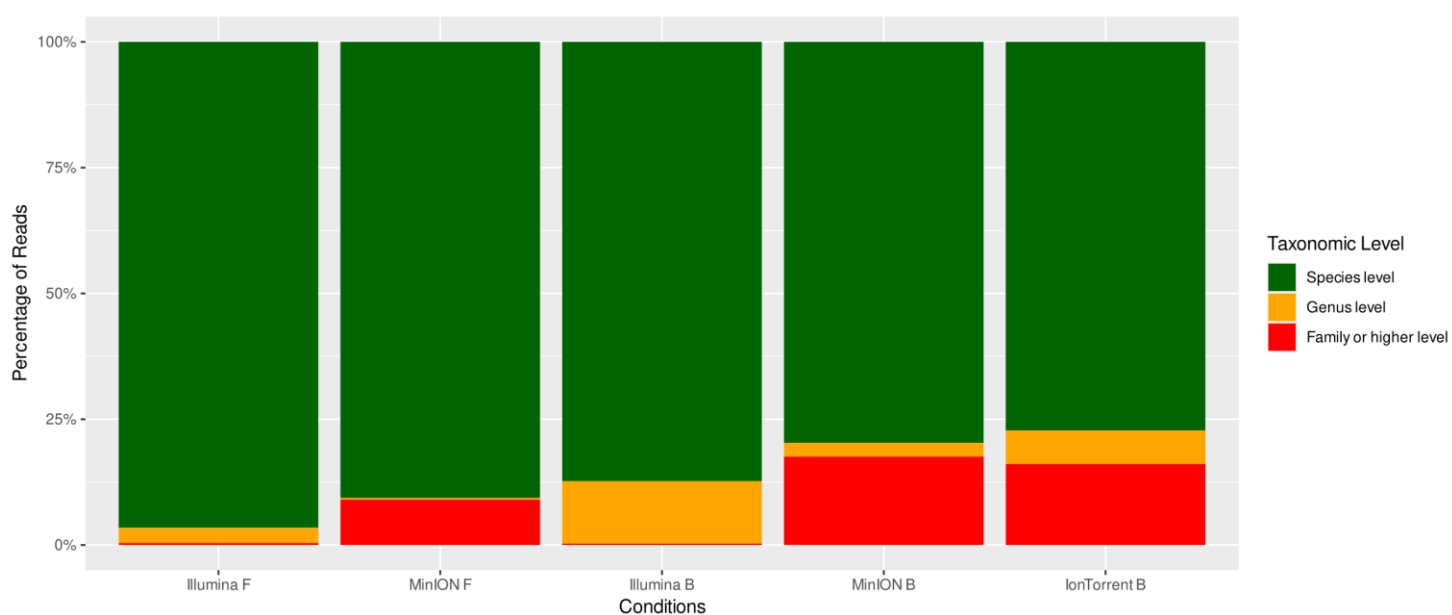


Figure 3: Proportion of reads assigned to each taxonomic level for each combination of sequencing technology and pair of primers (F: fwhF2/fwhR2n; B: BF3/BR2).

False positive detections (i.e. a species detected within a bulk that is not part of the bulk's initial composition) were observed whatever the combination of primers and technology (**Fig. 4**). Hence, an average of 13.5 false positives OTU were recorded for the primer pair fwhF2/fwhR2n, compared to an average of four false positives OTU when

using the primer pair BF3/BR2, the difference being significant here (p.value = 0.00194). According to the technology used, but regardless of the primers, an average of ten, seven and six false positives were recorded for Illumina®, MinION and IonTorrent® technologies respectively. There are no significant differences among the three sequencing technologies in terms of false positives.

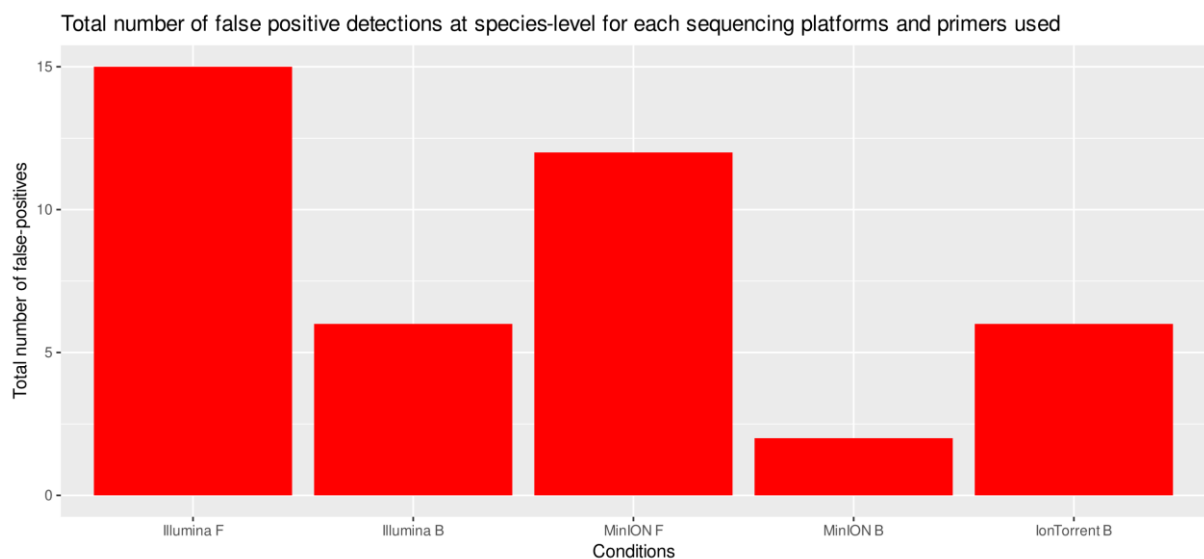


Figure 4: Number of false positive detections at species-level for each sequencing platforms and primers used (F=fwhF2/fwhR2n [254bp] and B=BF3/BR2 [458bp]).

#### *Mock community analysis*

In total, 33 out of 48 individuals (68.8%) were detected at the species level by at least one experimental condition (**Fig. 5**).

Bulks 1 and 2 were assembled to compare the detection rates of closely related species under different sequencing and primers conditions. Illumina® detected seven species out of 16 (43.75%), MinION also detected seven out of 16 (43.75%), and IonTorrent® detected six species out of 16 (37.5%). No significant differences were observed among the different methods used (Kruskal-Wallis chi-squared = 2, df=2, p-value=0.3679).

Metabarcoding of bulks 3 and 4 aimed at comparing the ability of different sequencing technologies to detect low abundance species in the traps. All sequencing technology/primer combinations allowed for the detection of minor species: *Phymatodes testaceus* with a presence of 3% in bulk 3 (relative amount of DNA in the mock community) and *Xylotrechus chinensis* with a percentage of 0.5% in bulk 4. However, some species (although not in minority in the bulks) were not detected in one or several tests (**Fig. 5**). In total, Illumina® was able to detect a higher number of individuals (11/12 individuals detected) compared to MinION (9/12) and IonTorrent® (9/12).

Regarding bulks mimicking the species composition in a field trap, MinION performed better to detect and identify specimens at species level in Bulk 6 (detecting 8/12 species (66.7%)) compared to Illumina® and IonTorrent® technologies (5/12 species (41.7%)), whereas the same number of species was detected for Bulk 5 (4/6 (66.7%)) whatever the technology used. Nevertheless, in bulk 5, the non-native species, *Cordylomera spinicornis* was detected only by Illumina B. For bulk 6, the non-native species *Xylotrechus chinensis* was detected by all three technologies and *Xylotrechus stebbingi* by MinION B only.

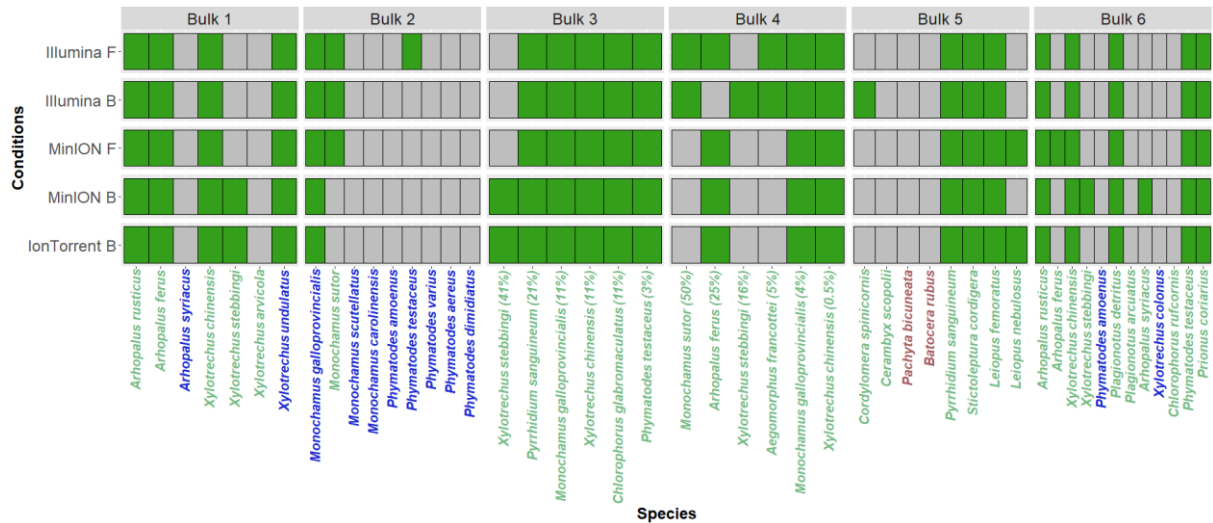


Figure 5: Heatmap comparing the identification of individuals present in bulk samples at the species level (green square) or the absence of detection at the species level (grey square) according to the sequencing technologies and primer pairs used (F=fwhF2/FwhR2n; B=BF3/BR2). Species names written in blue were collected using the wet method, those in green were collected using the dry method, and those in dark red were hand-captured.

#### *Impact of capture and storage conditions on individual detection*

Our results demonstrate significant differences in the mean number of detections between samples that were collected using the “dry” method ( $\alpha$ -cypermethrin insecticide) and the “wet” method (water-diluted propylene glycol) (Wilcoxon rank-sum test,  $W = 74.5$ ,  $p.value = 0.0006342$ ) (**Fig. 6A**). Indeed, 75% (9/12) of specimens collected using the “wet” MPG trapping procedure, were not detected by any of the sequencing technologies. Conversely, 88.2% (30/34) of those collected using the “dry” trapping procedure (based-on  $\alpha$ -cypermethrin insecticide) were detected at least once across all technologies.

Individuals captured using the “dry” method had higher DNA concentration (39 ng/ $\mu$ l on average, (SD=52.79)) than MPG trapped specimens (18.6 ng/ $\mu$ l on average, (SD=21.80)) (Wilcoxon rank-sum test,  $W = 123.5$ ,  $p.value = 0.04533$ ) (**Fig. 6B**). The average

A260/280 ratio was 1.9 for the “dry” method and 2 for MPG method (**Fig. 6C**). However, the average A260/230 ratio of specimens trapped with the “dry” method (0.8) was higher than that of specimens captured with MPG (0.5) (Wilcoxon rank-sum test,  $W = 146$ ,  $p$ .value = 0.1502) (**Fig. 6D**).

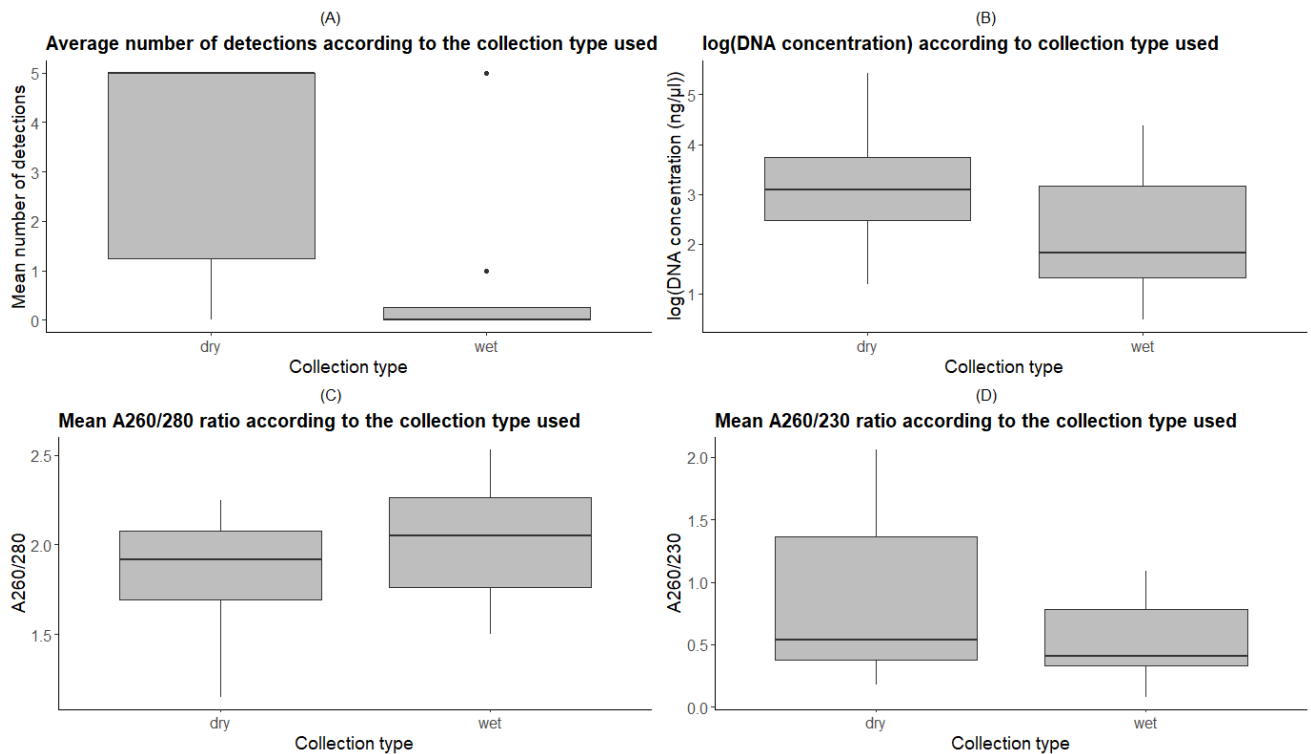


Figure 6: Boxplots representing (A) the average number of detections according to the type of preservation used, (B) the natural logarithm scale (base e) of the average DNA concentration according to the type of preservation used, (C) the A260/280 quality ratio according to the type of preservation used, and (D) the A260/230 quality ratio according to the type of preservation used. The black dots represent the outliers values (values outside the whiskers). Bold line represents the average value, outlines of the boxes represent the first and third quartiles and the whiskers represent the range of the values outside the quartiles.

## Discussion

Rapid and precise detection of exotic insects is crucial to prevent the ecological and economic damage they can cause by invading new environments and disrupting local ecosystems.

### *Benchmarking of sequencing technologies*

A slightly higher number of individuals were detected and identified to species using MinION (28 specimens) compared to Illumina® (27 specimens) or IonTorrent® (24 specimens), although this difference is not significant. However, this result shows similar detection rates between the MinION and Illumina technology, demonstrating that the sequencing error rates long attributed to the MinION did not impact detection rates, while allowing for the elimination of the long delays often required when sequencing is performed on other sequencing technologies (Piper et al., 2019). It must be considered that we worked on a single pair of primers (BF3/BR2) with the IonTorrent® technology, which may have reduced the number of identifications. More specifically, our results showed that the choice of primer pairs, and the length of the amplicon generated, lead to contrasted results regarded to taxonomic assignment. For example, only BF3/BR2 allowed the species-level identification of the invasive species *Xylotrechus stebbingi*. This difference may be due to the longer amplicon generated by this primer pair, which has more informative nucleotide sites to provide a reliable taxonomic assignment. By contrast, fwhF2/fwhR2n generated a significant higher number of false positives than BF3/BR2 (**Fig. 4**). This may be because the amplicon generated by fwhF2/fwhR2n is smaller in size compared to BF3/BR2. As a result, any loss of genetic information is more likely to result in misidentification or false positives (Meusnier et al., 2008).

Regardless of the number of identified species, the Illumina® technology produced a higher percentage of reads allowing species-level identification compared to MinION or IonTorrent®. The detection of specimens at higher taxonomic level (genus or family),

can be explained by sequencing errors that produce reads with less than 98% identity to the reference database. These results confirm that Illumina has a lower sequencing error rate than Oxford Nanopore's MinION sequencer (Piper et al; 2019), although this did not impact the number of individuals identified to the species level.

The three technologies showed similar efficiency in detecting and identifying closely related species. Moreover, the results show that all three sequencing technologies (regardless of the associated primer pairs) enabled the detection and identification of species whose DNA represented a very low percentage in the mock community (**Fig. 5**). This high resolution would allow for the detection of exotic species that are poorly represented in traps, which might otherwise go unnoticed. Thus, all three technologies appear suitable for detecting and identifying species present in low numbers in field traps, enabling effective monitoring.

#### *Impacts of capture and storage conditions on DNA conservation*

Both the conditions of capture (wet versus dry methods) and storage (ie time lag between collection and lab processing) have an impact on DNA concentration and quality and subsequently on the rate of species detection (Piper et al., 2019). Thus, the number of species detected is highly variable between bulks 1 and 2, which can be explained by the capture methods used : 'dry,' where individuals were captured without preservative fluid (as is the case for the majority of detected individuals comprising bulk 1), and 'wet,' where individuals were preserved in 50% MPG until trap retrieval (as is the case for the majority of undetected individuals comprising bulk 2). For instance, the species *Phymatodes testaceus* was always detected (10 out of 10 assays) when dry specimens



were present, even in low concentrations (3% in Bulk 3). On the other hand, wet specimens of *Phymatodes testaceus* were rarely detected (one detection out of five assays). Individuals captured using MPG method had lower DNA concentration and presented significantly much lower detection rates compared to individuals captured using the “dry” method. Ballare *et al.* (2019) also found that insects collected in propylene glycol traps produced lower quality ddRADseq assemblages than specimens collected by net sampling and directly transferred into 100% EtOH or by passive trapping followed by 100% EtOH storage before pinning. In contrast to this, Ferro and Park (2013) found that propylene glycol is an effective DNA preservative for molecular marker-based studies on Coleoptera species. However, in their study, insects were first killed and preserved in 100% ethanol before being stored in glycol. While, in our study insects were killed directly in propylene glycol. The use of 100% ethanol as the initial killing agent may lead to better initial preservation of specimens compared to direct exposure to propylene glycol.

#### *False positives, negatives and unmatched OTUs*

Despite the precautions taken, several false positives were detected in all tested conditions. The number of false positives was significantly higher with the primer pair fwhF2/fwhR2n, which generates a smaller size amplicon compared to BF3/BR2. Even though Illumina technology is known to have a lower sequencing error rate compared to MinION (Silvestre-Ryan and Holmes 2021), our study found 10 false positives generated by Illumina, while MinION produced seven false positives and IonTorrent produced six. The sensitivity of HTS technologies allows for the detection of very small amounts of DNA, thus detecting even the slightest cross contamination between samples (Liu et al.

2020). These DNA contaminations may have occurred during sample collection in the field or in the laboratory through cross-contamination between samples from the same study.

The false negative detections for some individuals may primarily be explained by the highly heterogeneous DNA quality of the different sequenced individuals (**Tab. S1**). In fact, DNA quality can be impacted by numerous mainly abiotic factors (pH, UV radiation, temperature), degrading DNA quality in a matter of days/weeks (Strickler et al. 2015; Collins et al. 2018; Harrison et al. 2019). During field trapping using stationary traps, captured insects are sometimes exposed to such conditions (high temperatures in trap containers when exposed to the sun in summer, high humidity in the container during heavy rains, etc...), which can greatly accelerate the speed of DNA degradation in captured individuals. Such degraded DNA is more difficult to amplify, thus generating false negatives, especially when attempting to detect insects in low abundance within a trap, such as an invasive species in the process of establishing (Preston et al. 2022). Another possible cause for the high number of false negatives is the bias induced by PCR, such as uneven amplification of the DNA of the different individuals present in one sample (Preston et al. 2022). To avoid potential bias arising from identification errors or missing species in the references databases, we decided to work on a local and curated BLAST database. However, when target species are partially unknown, as is the case in field conditions, analyses must rely on public reference databases. Yet, out of the 35,000 known species of Cerambycidae to date, only 2,926 species (8.4%) are recorded in BOLD with a barcode fragment (as of November 16<sup>th</sup>, 2023). Furthermore, databases can contain errors such as misassignment of an DNA sequence to a wrong species due to

morphological identification errors. This was precisely the error encountered for the species *Monochamus sutor* which was genetically identified as *Monochamus sartor* (**Tab. S7**) or the species *Leiopus nebulosus* who has been genetically identified as *Leiopus linnei* (**Tab. S7**) using our local BOLD database.

One also needs to pay attention to synonymy whereby a species appears in the database under multiple names. We encountered this problem in our analysis with *Arhopalus ferus* (Bulks 1, 4, and 6) which was detected but under the name of *Arhopalus tristis* (**Tab. S10**). Finally, mitochondrial paralogues such as NUMTs (non-functional copies of mitochondrial genes transported into the nuclear genome) present in databases can also bias results, making it impossible to identify specimens correctly at the species level (Bensasson et al. 2001). NUMTs are numerous in many organisms, including some cerambycids such as *Monochamus galloprovincialis* (Koutroumpa et al. 2009; Haran et al. 2015).

### *Biases*

Based on the results obtained, it appears that the main biases observed in metabarcoding analyses of trap contents stem from the degradation of DNA from individuals, which generates false negatives. We recommend to favour a "dry" rather than a "wet" trapping method, especially the MPG method and to plan for the collection, transportation, and processing of captured individuals as soon as possible after capture. This includes checking the traps as frequently as possible (at least once a week), thus avoiding excessively long exposure of the individuals to unfavourable environmental conditions. Once individuals are brought back to the laboratory and if DNA cannot be

extracted straight away, it is important to limit any further degradation by keeping samples at -20°C and in 95% ethanol. On the other hand, DNA extractions should be stored in the preservation buffer provided with the extraction kits or in molecular-grade water and kept at -20°C (Preston et al. 2022). We also recommend limiting the use of primer pairs that generate short amplicons, which can favour the amplification of non-target taxa, NUMTs and lead to identification errors. The quality and completeness of the databases is also a very important bias factor. To limit this bias, Egeter et al., 2019 recommended to restrict the database used to targeted species in order to minimize the risk of false positives due to contamination. Limited taxonomic and geographical coverage of sequence databases is a huge limitation in metabarcoding studies. For example, Dopheide et al. (2019) found no representative sequence in the GenBank database for more than 900 invertebrate OTUs in their study when analysing the community of soil arthropods from a native forest in Ireland. Additionally, species identification errors and cases of synonymy lead to false negatives or cases of multiple affiliations.

## **Conclusion**

By comparing the accuracy and detection capacity of three metabarcoding strategies, this study contributes to improving our toolkit for monitoring non-native insect invasion. All three sequencing technologies performed equally well and showed similar results for detecting and identifying exotic Cerambycid species collected in field traps. However, the MinION stands out as a portable, easy-to-use, and cost-effective sequencer, with the potential to become an essential tool for biodiversity monitoring projects. Using the MinION reduces the time spent on laboratory handling compared to Illumina and

eliminates the need to outsource sample sequencing. This saves considerable time when it comes to detecting invasive species. The MinION technology is accurate enough to detect non-native species even when present at low abundances in field traps and allows for accurate identifications as long as there is a sufficiently complete high-quality reference database to avoid identification errors or false positives/negatives. It is also crucial to pay close attention to issues of contamination and insect preservation during and after individual capture in order to work with the least degraded DNA possible.

## **References**

Abeynayake SW, Fiorito S, Dinsdale A, Whattam M, Crowe B, Sparks K, Campbell PR, Gambley C (2021) A Rapid and Cost-Effective Identification of Invertebrate Pests at the Borders Using MinION Sequencing of DNA Barcodes. *Genes* 12: 1138. <https://doi.org/10.3390/genes12081138>

Alberdi A, Aizpurua O, Gilbert MTP, Bohmann K (2018) Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. Mahon A (Ed.). *Methods in Ecology and Evolution* 9: 134–147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>

Andújar C, Arribas P, Gray C, Bruce C, Woodward G, Yu DW, Vogler AP (2018) Metabarcoding of freshwater invertebrates to detect the effects of a pesticide spill. *Molecular Ecology* 27: 146–166. <https://doi.org/10.1111/mec.14410>

Aukema JE, McCullough DG, Von Holle B, Liebhold AM, Britton K, Frankel SJ (2010) Historical Accumulation of Nonindigenous Forest Pests in the Continental United States. *BioScience* 60: 886–897. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.11.5>

Ballare KM, Pope NS, Castilla AR, Cusser S, Metz RP, Jha S (2019) Utilizing field collected insects for next generation sequencing: Effects of sampling, storage, and DNA extraction methods. *Ecology and Evolution* 9: 13690–13705. <https://doi.org/10.1002/ece3.5756>

Batovska J, Piper AM, Valenzuela I, Cunningham JP, Blacket MJ (2021) Developing a non-destructive metabarcoding protocol for detection of pest insects in bulk trap catches. *Scientific Reports* 11: 7946. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85855-6>

Bensasson D, Zhang D-X, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 314–321. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02151-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02151-6)

Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarošík V, Wilson JRU, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>

Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, Roiz D, Albert C, Fournier A, Barbet-Massin M, Salles J-M, Simard F, Courchamp F (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications* 7: 12986. <https://doi.org/10.1038/ncomms12986>

Braukmann TWA, Ivanova NV, Prosser SWJ, Elbrecht V, Steinke D, Ratnasingham S, De Waard JR, Sones JE, Zakharov EV, Hebert PDN (2019) Metabarcoding a diverse arthropod mock community. *Molecular Ecology Resources* 19: 711–727.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13008>

Brown SDJ, Collins RA, Boyer S, Lefort M, Malumbres-Olarte J, Vink CJ, Cruickshank RH (2012) SPIDER: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 562–565.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>

Chain FJJ, Brown EA, MacIsaac HJ, Cristescu ME (2016) Metabarcoding reveals strong spatial structure and temporal turnover of zooplankton communities among marine and freshwater ports. Cowie R (Ed.). *Diversity and Distributions* 22: 493–504.  
<https://doi.org/10.1111/ddi.12427>

Chown SL, Hodgins KA, Griffin PC, Oakeshott JG, Byrne M, Hoffmann AA (2015) Biological invasions, climate change and genomics. *Evolutionary Applications* 8: 23–46.  
<https://doi.org/10.1111/eva.12234>

Chua PYS, Bourlat SJ, Ferguson C, Korlevic P, Zhao L, Ekrem T, Meier R, Lawniczak MKN (2023) Future of DNA-based insect monitoring. *Trends in Genetics* 39: 531–544.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.012>

Collins RA, Wangensteen OS, O’Gorman EJ, Mariani S, Sims DW, Genner MJ (2018) Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology* 1: 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>

Dean MD, Ballard JWO (2001) Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 279–283. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00784.x>

deWaard JR, Levesque-Beaudin V, deWaard SL, Ivanova NV, McKeown JTA, Miskie R, Naik S, Perez KHJ, Ratnasingham S, Sobel CN, Sones JE, Steinke C, Telfer AC, Young AD, Young MR, Zakharov EV, Hebert PDN (2019) Expedited assessment of terrestrial arthropod diversity by coupling Malaise traps with DNA barcoding 1. *Genome* 62: 85–95. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0093>

Dopheide A, Tooman LK, Grosser S, Agabiti B, Rhode B, Xie D, Stevens MI, Nelson N, Buckley TR, Drummond AJ, Newcomb RD (2019) Estimating the biodiversity of terrestrial invertebrates on a forested island using DNA barcodes and metabarcoding data. *Ecological Applications* 29: 1–14. Available from: <https://www.jstor.org/stable/26669248> (June 9, 2023).

Egeter B, Peixoto S, Brito JC, Jarman S, Puppo P, Velo-Antón G (2018) Challenges for assessing vertebrate diversity in turbid Saharan water-bodies using environmental DNA. *Genome* 61: 807–814. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0071>



Egeter B, Veríssimo J, Lopes-Lima M, Chaves C, Pinto J, Riccardi N, Beja P, Fonseca NA (2022) Speeding up the detection of invasive bivalve species using environmental DNA: A Nanopore and Illumina sequencing comparison. *Molecular Ecology Resources* 22: 2232–2247. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13610>

Elbrecht V, Leese F (2017) Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in Environmental Science* 5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2017.00011> (July 2, 2023).

Elbrecht V, Vamos EE, Meissner K, Aroviita J, Leese F (2017) Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. Yu D (Ed.). *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12789>

Elbrecht V, Braukmann TWA, Ivanova NV, Prosser SWJ, Hajibabaei M, Wright M, Zakharov EV, Hebert PDN, Steinke D (2019) Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ* 7: e7745. <https://doi.org/10.7717/peerj.7745>

Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Berger B (Ed.). *Bioinformatics* 34: 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

Ferro ML, Park J-S (2013) Effect of Propylene Glycol Concentration on Mid-Term DNA Preservation of Coleoptera. In: The Coleopterists Bulletin. , 581–586. <https://doi.org/10.1649/0010-065X-67.4.581>

Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics (Oxford, England) 28: 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>

Gibson J, Shokralla S, Porter TM, King I, van Konynenburg S, Janzen DH, Hallwachs W, Hajibabaei M (2014) Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111: 8007–8012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406468111>

Giovani B, Blümel S, Lopian R, Teulon D, Bloem S, Galeano Martínez C, Beltrán Montoya C, Urias Morales CR, Dharmapuri S, Timote V, Horn N, Chouibani M, Mezui M’Ella JG, Herrera V, Castinel A, Goletsos C, Moeller C, Naumann I, Stancanelli G, Bronzwaer S, Tramontini S, MacDonald P, Matheson L, Anthoine G, De Jonghe K, Schenk M, Steinmüller S, Rodriguez E, Cruz ML, Luck J, Fraser G, Brunel S, Montuori M, Fedchock C, Steel E, Pennington HG, Day R, Rossi JP, Xia J (2020) Science diplomacy for plant health. Nature Plants 6: 902–905. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0744-x>

Haran J, Koutroumpa F, Magnoux E, Roques A, Roux G (2015) Ghost mtDNA haplotypes generated by fortuitous NUMTs can deeply disturb infra-specific genetic diversity and

phylogeographic pattern. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53: 109–115. <https://doi.org/10.1111/jzs.12095>

Harrison JB, Sunday JM, Rogers SM (2019) Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286: 20191409. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

Hebert PDN, deWaard JR, Zakharov EV, Prosser SWJ, Sones JE, McKeown JTA, Mantle B, La Salle J (2013) A DNA ‘Barcode Blitz’: Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. Kolokotronis S-O (Ed.). *PLoS ONE* 8: e68535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068535>

Henrie JR, Thomson BM, Yungfleisch AA, Kerr M, Leavitt SD (2022) Characterizing Crustose Lichen Communities—DNA Metabarcoding Reveals More than Meets the Eye. *Diversity* 14: 766. <https://doi.org/10.3390/d14090766>

Ho JKI, Puniamoorthy J, Srivathsan A, Meier R (2020) MinION sequencing of seafood in Singapore reveals creatively labelled flatfishes, confused roe, pig DNA in squid balls, and phantom crustaceans. *Food Control* 112: 107144. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107144>

Hodgetts J, Ostojá-Starzewski JC, Prior T, Lawson R, Hall J, Boonham N (2016) DNA barcoding for biosecurity: case studies from the UK plant protection program. Wilson J-J (Ed.). *Genome* 59: 1033–1048. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0010>

Javal M, Terblanche J, Conlong D, Delahaye N, Grobbelaar E, Benoit L, Lopez-Vaamonde C, Haran J (2021) DNA barcoding for bio-surveillance of emerging pests and species identification in Afrotropical Prioninae (Coleoptera, Cerambycidae). *Biodiversity Data Journal* 9: e64499. <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e64499>

Kelnarova I, Jendek E, Grebennikov VV, Bocak L (2019) First molecular phylogeny of *Agrilus* (Coleoptera: Buprestidae), the largest genus on Earth, with DNA barcode database for forestry pest diagnostics. *Bulletin of Entomological Research* 109: 200–211. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000330>

Kenis M, Auger-Rozenberg M-A, Roques A, Timms L, Péré C, Cock MJW, Settele J, Augustin S, Lopez-Vaamonde C (2009) Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions* 11: 21–45. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9318-y>

Kitson JJN, Hahn C, Sands RJ, Straw NA, Evans DM, Lunt DH (2019) Detecting host–parasitoid interactions in an invasive Lepidopteran using nested tagging DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 28: 471–483. <https://doi.org/10.1111/mec.14518>

Koutroumpa FA, Lieutier F, Roux-Morabito G (2009) Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome ( *Numts* ) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 47: 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00492.x>

Krehenwinkel H, Pomerantz A, Prost S (2019) Genetic Biomonitoring and Biodiversity Assessment Using Portable Sequencing Technologies: Current Uses and Future Directions. Genes 10: 858. <https://doi.org/10.3390/genes10110858>

Lindahl, T. "Instability and Decay of the Primary Structure of DNA." Nature, vol. 362, no. 6422, Apr. 1993, pp. 709–15, <https://doi.org/10.1038/362709a0>.

Liu M, Clarke LJ, Baker SC, Jordan GJ, Burrige CP (2020) A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. Ecological Entomology 45: 373–385. <https://doi.org/10.1111/een.12831>

Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M (2014) Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2: e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>

Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17: 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Mas H, Santoiemma G, Lencina JL, Gallego D, Pérez-Laorga E, Ruzzier E, Rassati D (2023) Investigating beetle communities in and around entry points can improve surveillance at national and international scale. *NeoBiota* 85: 145–165. <https://doi.org/10.3897/neobiota.85.103904>

Mazza G, Tricarico E, Genovesi P, Gherardi F (2014) Biological invaders are threats to human health: an overview. *Ethology Ecology & Evolution* 26: 112–129. <https://doi.org/10.1080/03949370.2013.863225>

Meusnier, Isabelle, et al. "A Universal DNA Mini-Barcode for Biodiversity Analysis." *BMC Genomics*, vol. 9, no. 1, May 2008, p. 214, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-214>.

Piper AM, Batovska J, Cogan NOI, Weiss J, Cunningham JP, Rodoni BC, Blacket MJ (2019) Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience* 8: giz092. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>

Preston, M., Fritzsche, M. & Woodcock, P. 2022. Understanding and mitigating errors and biases in metabarcoding: an introduction for non-specialists. JNCC Report No. 699, JNCC, Peterborough, ISSN 0963-8091.

Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>): BARCODING. *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>

Richardson DM, Pyšek P, Rejmanek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity & Distributions* 6: 93–107. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x>

Roques A, Auger-Rozenberg M-A, Blackburn TM, Garnas J, Pyšek P, Rabitsch W, Richardson DM, Wingfield MJ, Liebhold AM, Duncan RP (2016) Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions* 18: 907–920. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1080-y>

Roques A, Ren L, Rassati D, Shi J, Akulov E, Audsley N, Auger-Rozenberg M-A, Avtzis D, Battisti A, Bellanger R, Bernard A, Bernadinelli I, Branco M, Cavaletto G, Cocquempot C, Contarini M, Courtial B, Courtin C, Denux O, Dvořák M, Fan J, Feddern N, Francese J, Franzen EKL, Garcia A, Georgiev G, Georgieva M, Giarruzzo F, Gossner M, Gross L, Guarneri D, Hoch G, Hölling D, Jonsell M, Kirichenko N, Loomans A, Luo Y, McCullough D, Maddox C, Magnoux E, Marchioro M, Martinek P, Mas H, Mériguet B, Pan Y, Phélut R, Pineau P, Ray AM, Roques O, Ruiz M-C, Monteys VS i, Speranza S, Sun J, Sweeney JD, Touroult J, Valladares L, Veillat L, Yuan Y, Zalucki MP, Zou Y, Žunič-Kosi A, Hanks LM, Millar JG (2023) Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species. *NeoBiota* 84: 169–209. <https://doi.org/10.3897/neobiota.84.91096>

Rossa R, Goczał J (2021) Global diversity and distribution of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *The European Zoological Journal* 88: 289–302. <https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1883129>

Sahlin K, Medvedev P (2020) De Novo Clustering of Long-Read Transcriptome Data Using a Greedy, Quality Value-Based Algorithm. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 27: 472–484. <https://doi.org/10.1089/cmb.2019.0299>

Seebens H, Bacher S, Blackburn TM, Capinha C, Dawson W, Dullinger S, Genovesi P, Hulme PE, Kleunen M, Kühn I, Jeschke JM, Lenzner B, Liebhold AM, Pattison Z, Pergl J, Pyšek P, Winter M, Essl F (2021) Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology* 27: 970–982. <https://doi.org/10.1111/gcb.15333>

Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke JM, Pagad S, Pyšek P, van Kleunen M, Winter M, Ansong M, Arianoutsou M, Bacher S, Blasius B, Brockerhoff EG, Brundu G, Capinha C, Causton CE, Celesti-Grapow L, Dawson W, Dullinger S, Economo EP, Fuentes N, Guénard B, Jäger H, Kartesz J, Kenis M, Kühn I, Lenzner B, Liebhold AM, Mosena A, Moser D, Nentwig W, Nishino M, Pearman D, Pergl J, Rabitsch W, Rojas-Sandoval J, Roques A, Rorke S, Rossinelli S, Roy HE, Scalera R, Schindler S, Štajerová K, Tokarska-Guzik B, Walker K, Ward DF, Yamanaka T, Essl F (2018) Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719429115>



Silvestre-Ryan J, Holmes I (2021) Pair consensus decoding improves accuracy of neural network basecallers for nanopore sequencing. *Genome Biology* 22: 38. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02255-1>

Srivathsan, Amrita, et al. "ONTbarcoder 2.0: Rapid Species Discovery and Identification with Real-time Barcoding Facilitated by Oxford Nanopore R10 .4." *Cladistics*, vol. 40, no. 2, 2024, pp. 192–203, <https://doi.org/10.1111/cla.12566>.

Srivathsan A, Lee L, Katoh K, Hartop E, Kutty SN, Wong J, Yeo D, Meier R (2021) ONTbarcoder and MinION barcodes aid biodiversity discovery and identification by everyone, for everyone. *BMC Biology* 19: 217. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01141-x>

Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS (2015) Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183: 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>

Vamos E, Elbrecht V, Leese F (2017) Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1: e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>

Vaser R, Sović I, Nagarajan N, Šikić M (2017) Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research* 27: 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>

Wang Q (2017) *Cerambycidae of the World: Biology and Pest Management*. CRC Press, 643 pp.

Wu Y, Trepanowski NF, Molongoski JJ, Reagel PF, Lingafelter SW, Nadel H, Myers SW, Ray AM (2017) Identification of wood-boring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade-associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. *Scientific Reports* 7: 40316. <https://doi.org/10.1038/srep40316>

Zenker MM, Rougerie R, Teston JA, Laguerre M, Pie MR, Freitas AVL (2016) Fast Census of Moth Diversity in the Neotropics: A Comparison of Field-Assigned Morphospecies and DNA Barcoding in Tiger Moths. Cimmaruta R (Ed.). *PLOS ONE* 11: e0148423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148423>

### **Acknowledgements**

We would like to thank all colleagues who participated in the taxa sampling (see Roques et al. 2023). We are thankful to Lucas Sire for insightful discussion on primer choice. The authors thank the GeT-Biopuces platform of INSA Toulouse for the IonTorrent sequencing study. This work was supported by the PORTRAP project “Test de l’efficacité de pièges génériques multicomposés pour la détection précoce d’insectes exotiques xylophages dans les sites potentiels d’entrée sur le territoire national” and HOMED

project (HOListic Management of Emerging Forest Pests and Diseases) which received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 771271 (<https://homed-projecteu/>). We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees for providing help and computing storage resources. Loïs Veillat was supported by a PhD studentship from HOMED project and doctoral school SSBCV at the university of Orléans.

### **Data accessibility**

Barcode data for the 33 species used in the mock community experiment are available from BOLD in the dataset DS-MINION ([dx.doi.org/10.5883/DS-MINION](https://dx.doi.org/10.5883/DS-MINION)). Raw sequence data for this project and analytical script and files are available on figshare ([https://figshare.com/projects/DNA\\_metabarcoding\\_an\\_efficient\\_way\\_to\\_detect\\_non-native\\_cerambycid\\_beetles\\_in\\_trapping\\_collections\\_/171432](https://figshare.com/projects/DNA_metabarcoding_an_efficient_way_to_detect_non-native_cerambycid_beetles_in_trapping_collections_/171432)).

### **Author contributions**

Loïs Veillat, Géraldine Roux, Carlos Lopez-Vaamonde and Stéphane Boyer conceived the study. Alain Roques collected field samples. Stéphane Boyer, Marina Querejeta, Emmanuelle Magnoux and Loïs Veillat conducted the laboratory sample processing. Loïs Veillat analysed the data and wrote the first draft. All authors contributed to the preparation of the manuscript. Both senior authors, Géraldine Roux and Carlos Lopez-Vaamonde, contributed equally to this study.



---

# **Chapitre III : Librairies de référence de codes-barres de cérambycidés capturés en Europe à l'aide de pièges multi-phéromonaux.**

---

## **Résumé en français du chapitre III :**

Les bases de données de référence de barcodes ADN constituent donc un outil indispensable pour la taxonomie moléculaire. Elles associent des données moléculaires génétiques, des données taxonomiques ainsi que diverses métadonnées sur les spécimens capturés. Cependant, de telles bases de données ne sont pas exhaustives, en particulier pour les espèces situées dans les régions à haute diversité ou endémicité. De plus, de nombreux exemples de barcodes sont, soit insuffisamment annotés, soit annotés avec un taxon incorrect, soit plusieurs espèces cryptiques sont assignées au même code-barres ADN, ce qui induit des erreurs d'identification avec l'existence de complexes d'espèces. Le but de cette étude est de proposer une base de données de barcodes des cérambycides collectés avec des pièges multi-phéromonaux en Europe, afin de fournir un système d'identification rapide et fiable pour ces espèces. L'aspect qualitatif des données sera ici priorisé afin de fournir un outil fiable permettant une identification fiable des espèces de cérambycides présents sur le territoire européen. Nous nous sommes concentrés sur les 185 espèces de cérambycides capturées en Europe à l'aide de pièges à phéromones dans l'étude de Roques et al. 2023. Des séquences publique de ces 185 spécimens ont été ajoutées à nos propres données afin de créer une base de données des spécimens ciblés. Ces données ont ensuite été filtrées selon plusieurs critères afin de supprimer les séquences qui pourraient être des sources potentielles d'erreurs lors des assignations taxonomiques. Notre étude a permis d'assembler 2,928 séquences de barcodes ADN pour 147 espèces de cérambycides ce qui représente 79% des 185 espèces capturées en Europe à l'aide de pièges multi-phéromonaux. Cette nouvelle base de données pourrait servir à identifier avec précision les contenus de pièges multi-phéromonaux déposés en Europe afin d'en identifier le contenu lors d'analyses barcoding ou metabarcoding. Notre base de données met de plus en évidence l'importance de la curation manuelle lors du développement de bases de données de références à usage local.

## I. Introduction

Au cours des dernières décennies, on observe une croissance exceptionnelle des échanges commerciaux entre continents, entraînant une augmentation significative de l'introduction d'insectes non-indigènes en dehors de leur habitat d'origine (Seebens et al., 2021). En Europe, ce sont principalement les insectes herbivores, en particulier ceux associés aux plantes ligneuses, qui sont responsables de cette hausse, représentant 76,5% de toutes les nouvelles espèces d'herbivores enregistrées entre 2000 et 2014 (Roques et al., 2016). Cette augmentation est principalement due au commerce accru de plantes ornementales et à l'utilisation de matériaux d'emballage en bois tels que les palettes et les caisses de stockage (Roques et al., 2020; Lovett et al., 2016).

Les cérambycidés (Coléoptères) font partie des espèces phytophages exotiques les plus couramment interceptées en quarantaine internationale (Haack 2006). On estime aujourd'hui que cette famille comporte entre 34,000 et 38,000 espèces décrites (Tavakilian et Chevillotte 2022) dans le monde dont 699 espèces en Europe (checklist dans BOLD, en comprenant les îles açores, canaries chypre et jusqu'aux uralles) et 250 espèces en France métropolitaine, avec la Corse (Touroult et al., 2019). Les larves de nombreuses espèces de cérambycidés se développent sous l'écorce de plantes ligneuses où elles se nourrissent du bois en creusant des galeries, les rendant difficilement détectables. Ce mode de développement caché, parfois long, facilite le transport de ces insectes à travers le monde dans les matériaux d'emballage en bois (Eyre et Haack 2017) mais également via le commerce de plantes lorsqu'elles ont un diamètre suffisamment large. Cela induit un nombre croissant d'espèces de cérambycidés devenant d'importants ravageurs envahissants des forêts et des vergers (Venette et Hutchison 2021) endommageant et tuant les arbres dans les habitats naturels et aménagés ou dégradant le bois destiné au bois d'œuvre (Solomon 1995).

Une approche de détection précoce de potentiels cérambycidés exotiques consiste en l'utilisation de pièges multi-phéromonaux comme ceux utilisés dans Roques et al 2023. Cette approche s'est révélée être efficace pour de multiples espèces de plusieurs sous-familles de Cerambycidae permettant le piégeage d'un grand nombre d'individus augmentant ainsi la probabilité de détection de potentielles

espèces non-indigènes. La principale problématique est ensuite l'identification du grand nombre d'individus capturés. En effet, les méthodes traditionnelles de biosurveillance qui incluent des collectes de spécimens utilisant une variété de méthodes de piégeage sont souvent suivies d'une identification des individus capturés par une analyse morphologique, processus long nécessitant une expertise en taxonomie relativement importante (Poland et Rassati, 2019). Certaines études ont déjà utilisé l'approche du barcoding pour l'identification de Cerambycides et de Buprestes interceptés dans des matériaux d'emballage en bois en complément d'identifications morphologiques classiques (Wu et al., 2017 ; Hodgetts et al., 2016). Ces approches moléculaires permettent d'accélérer les identifications ainsi que de normaliser et de numériser les résultats (Hebert et al., 2003). Ce sont des méthodes efficaces car elles répondent au besoin d'une identification rapide, efficace et fiable des espèces dans un contexte de biosurveillance. Le barcode a également l'avantage de pouvoir identifier les organismes à différentes étapes de leur vie, telles que les œufs, les larves et bien évidemment les adultes.

Les bases de données de référence de barcodes ADN constituent donc un outil indispensable pour la taxonomie moléculaire (Wu et al., 2017). Elles associent des données moléculaires (le fragment barcode du gène COI de l'ADN mitochondrial chez les animaux, de 658 paires de bases), des données taxonomiques ainsi que diverses métadonnées sur les spécimens capturés (dates et lieux de capture, photo des spécimens). La principale base de données en ligne mondiale est le Barcode of Life DataSystems (BOLD) qui sert de dépôt central ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) permettant de déposer, mais également d'effectuer des analyses et le partage des données génétiques (Ratnasingham et Hebert 2007). Ces bases de données sont des outils primordiaux pour le bon fonctionnement des analyses barcoding ou métabarcoding, permettant l'identification automatique des espèces, sur la base de leur barcode respectifs. Le développement du "Barcode Index Number systems" (BINs) dans BOLD permet également l'attribution automatique de barcodes à des clusters génétiques, générant une page web spécifique à chaque cluster (Ratnasingham & Hebert, 2013). Cependant, de telles bases de données ne sont pas exhaustives (Wu et al., 2017), en particulier pour les espèces situées dans les régions à haute diversité ou endémicité (Phillips et al. 2019). De plus, de nombreux exemples de barcodes sont,

soit insuffisamment annotés (Porter & Hajibabaei, 2018), soit annotés avec un taxon incorrect (Boykin et al., 2012 ; Bengtsson-Palme et al., 2016), soit plusieurs espèces cryptiques sont assignées au même code-barres ADN, ce qui induit des erreurs d'identification avec l'existence de complexes d'espèces (Ashfaq & Hebert, 2016).

Le but de cette étude est de proposer une base de données de barcodes des cérambycides collectés avec des pièges multi-phéromonaux en Europe, afin de fournir un système d'identification rapide et fiable pour ces espèces. L'aspect qualitatif des données sera ici priorisé afin de fournir un outil fiable permettant une identification fiable des espèces de cérambycides présents sur le territoire européen.

## II. Matériel et méthode

Afin d'établir la liste des espèces à cibler, nous nous sommes concentrés sur les 185 espèces de cérambycidés capturées en Europe à l'aide de pièges à phéromones dans l'étude de Roques et al. 2023 (**Table 1**).

Sous-famille	Tribu	Espèce	Origine	Nbarcodes
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Anaglyptus gibbosus</i>	Europe	1
Cerambycinae	Anaglyptini	<i>Anaglyptus mysticus</i>	Europe	23
Cerambycinae	Callichromatini	<i>Aromia moschata</i>	Europe	17
Cerambycinae	Callidiini	<i>Callidium aeneum</i>	Holarctic	5
Cerambycinae	Callidiini	<i>Callidium violaceum</i>	Europe	21
Cerambycinae	Callidiini	<i>Lioderina linearis</i>	Europe	0
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes alni</i>	Europe	39
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes fasciatus</i>	Europe	3
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes glabratus</i>	Europe	8
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes lividus</i>	Europe	1
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes pusillus</i>	Europe	7
Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes rufipes</i>	Europe	11



Cerambycinae	Callidiini	<i>Phymatodes testaceus</i>	Europe	73
Cerambycinae	Callidiini	<i>Pyrrhidium sanguineum</i>	Europe	13
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus clavipes</i>	Europe	4
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus femoratus</i>	Europe	4
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus macropus</i>	Europe	0
Cerambycinae	Callidiini	<i>Ropalopus varini</i>	Europe	4
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx cerdo</i>	Europe	12
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx miles</i>	Europe	4
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx scopolii</i>	Europe	36
Cerambycinae	Cerambycini	<i>Cerambyx welensii</i>	Europe	9
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus figuratus</i>	Europe	38
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus glabromaculatus</i>	Europe	7
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus glaucus</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus herbstii</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus ruficornis</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus sartor</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus trifasciatus</i>	Europe	5
Cerambycinae	Clytini	<i>Chlorophorus varius</i>	Europe	4
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus arietis</i>	Europe	89
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus lama</i>	Europe	24
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus rhamni</i>	Europe	43
Cerambycinae	Clytini	<i>Clytus tropicus</i>	Europe	3
Cerambycinae	Clytini	<i>Isotomus speciosus</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Plagionotus arcuatus</i>	Europe	19
Cerambycinae	Clytini	<i>Plagionotus detritus</i>	Europe	5
Cerambycinae	Clytini	<i>Pseudosphegesthes cinerea</i>	Europe	1
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus antilope</i>	Europe	70
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus arvicola</i>	Europe	10

Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus chinensis</i>	Asia	5
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus pantherinus</i>	Europe	0
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus rusticus</i>	Europe / Asia	15
Cerambycinae	Clytini	<i>Xylotrechus stebbingi</i>	Asia	38
Cerambycinae	Deilini	<i>Deilus fugax</i>	Europe	16
Cerambycinae	Graciliini	<i>Axinopalpis gracilis</i>	Europe	3
Cerambycinae	Graciliini	<i>Gracilia minuta</i>	Europe	6
Cerambycinae	Graciliini	<i>Penichroa fasciata</i>	Europe	2
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Hesperophanes sericeus</i>	Europe	2
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Stromatium auratum</i>	Europe	0
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus campestris</i>	Asia	1
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus fasciculatus</i>	Europe	2
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus holosericeus</i>	Europe	8
Cerambycinae	Hesperophanini	<i>Trichoferus pallidus</i>	Europe	4
Cerambycinae	Hylotruperini	<i>Hylotrupes bajulus</i>	Europe	19
Cerambycinae	Molorchini	<i>Dolocerus reichii</i>	Europe	0
Cerambycinae	Molorchini	<i>Molorchus minor</i>	Europe	52
Cerambycinae	Molorchini	<i>Molorchus umbellatarum</i>	Europe	27
Cerambycinae	Oabriini	<i>Obrium brunneum</i>	Europe	20
Cerambycinae	Oabriini	<i>Obrium cantharinum</i>	Europe	0
Cerambycinae	Phoracanthini	<i>Cordylomera spinicornis</i>	Africa	0
Cerambycinae	Phoracanthini	<i>Phoracantha recurva</i>	Australasia	4
Cerambycinae	Phoracanthini	<i>Phoracantha semipunctata</i>	Australasia	4
Cerambycinae	Psebiini	<i>Nathrius brevipennis</i>	Europe	11
Cerambycinae	Pytheini	<i>Certallum ebulinum</i>	Europe	0
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Callimus abdominalis</i>	Europe	1

Cerambycinae	Stenopterini	<i>Callimus angulatus</i>	Europe	5
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Stenopterus ater</i>	Europe	13
Cerambycinae	Stenopterini	<i>Stenopterus rufus</i>	Europe	66
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus budensis</i>	Europe	0
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus globulicollis</i>	Europe	0
Cerambycinae	Trachyderini	<i>Purpuricenus kaehleri</i>	Europe	0
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Acanthocinus aedilis</i>	Europe / Asia	16
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Acanthocinus griseus</i>	Europe / Asia	9
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus femoratus</i>	Europe	0
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus linnei</i>	Europe	0
Lamiinae	Acanthocinini	<i>Leiopus nebulosus</i>	Europe	0
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus clavipes</i>	Europe	15
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus francottei</i>	Europe	1
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Aegomorphus krueperi</i>	Europe	8
Lamiinae	Acanthoderini	<i>Oplosia cinerea</i>	Europe	5
Lamiinae	Agapanthiini	<i>Agapanthia cardui</i>	Europe	40
Lamiinae	Agapanthiini	<i>Agapanthia villosoviridescens</i>	Europe	34
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Anaesthetis testacea</i>	Europe	16
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Deroplia genei</i>	Europe	2
Lamiinae	Desmiphorini	<i>Deroplia troberti</i>	Europe	1
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus adpersus</i>	Europe	47
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus lusitanus</i>	Europe	13
Lamiinae	Exocentrini	<i>Exocentrus punctipennis</i>	Europe	11
Lamiinae	Mesosini	<i>Mesosa curculionoides</i>	Europe	6
Lamiinae	Mesosini	<i>Mesosa nebulosa</i>	Europe	18
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus galloprovincialis</i>	Europe / Asia	25
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus saltuarius</i>	Asia / Europe	1
Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sartor</i>	Europe	0

Lamiinae	Monochamini	<i>Monochamus sutor</i>	Europe/Asia	0
Lamiinae	Obereini	<i>Oberea linearis</i>	Europe	10
Lamiinae	Parmenini	<i>Parmena balteus</i>	Europe	4
Lamiinae	Parmenini	<i>Parmena unifasciata</i>	Europe	0
Lamiinae	Phytoeciini	<i>Phytoecia pustulata</i>	Europe	19
Lamiinae	Phytoeciini	<i>Phytoecia nigricornis</i>	Europe	15
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus caroli</i>	Europe	3
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus decoratus</i>	Europe	8
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus fasciculatus</i>	Europe	15
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus hispidulus</i>	Europe	7
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus hispidus</i>	Europe	31
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus ovatus</i>	Europe	1
Lamiinae	Pogonocherini	<i>Pogonocherus perroudi</i>	Europe	3
Lamiinae	Pteropliini	<i>Niphona picticornis</i>	Europe	5
Lamiinae	Saperdini	<i>Menesia bipunctata</i>	Europe	6
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda octopunctata</i>	Europe	2
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda perforata</i>	Europe	0
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda populnea</i>	Europe	10
Lamiinae	Saperdini	<i>Saperda scalaris</i>	Europe	21
Lamiinae	Saperdini	<i>Stenostola dubia</i>	Europe	13
Lamiinae	Saperdini	<i>Stenostola ferrea</i>	Europe	3
Lepturinae	Lepturini	<i>Alosterna tabacicolor</i>	Europe	62
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia dubia</i>	Europe	0
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia reyi</i>	Europe	0
Lepturinae	Lepturini	<i>Anastrangalia sanguinolenta</i>	Europe	122
Lepturinae	Lepturini	<i>Anoplodera rufipes</i>	Europe	8
Lepturinae	Lepturini	<i>Anoplodera sexguttata</i>	Europe	26
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura aethiops</i>	Europe	1

Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura aurulenta</i>	Europe	11
Lepturinae	Lepturini	<i>Leptura quadrifasciata</i>	Europe	20
Lepturinae	Lepturini	<i>Pachytodes erraticus</i>	Europe	33
Lepturinae	Lepturini	<i>Paracorymbia fulva</i>	Europe	0
Lepturinae	Lepturini	<i>Paracorymbia hybrida</i>	Europe	0
Lepturinae	Lepturini	<i>Pedostrangalia revestita</i>	Europe	5
Lepturinae	Lepturini	<i>Pseudovadonia livida</i>	Europe	81
Lepturinae	Lepturini	<i>Rutpela maculata</i>	Europe	110
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella nigra</i>	Europe	48
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella bifasciata</i>	Europe	39
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella septempunctata</i>	Europe	8
Lepturinae	Lepturini	<i>Stenurella melanura</i>	Europe	182
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura cordigera</i>	Europe	35
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura erythroptera</i>	Europe	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura fontenayi</i>	Europe	1
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura maculicornis</i>	Europe	39
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura rubra</i>	Europe / Asia	64
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura scutellata</i>	Europe	18
Lepturinae	Lepturini	<i>Stictoleptura trisignata</i>	Europe	7
Lepturinae	Lepturini	<i>Strangalia attenuata</i>	Europe	4
Lepturinae	Lepturini	<i>Vadonia unipunctata</i>	Europe	49
Lepturinae	Oxymirini	<i>Oxymirus cursor</i>	Europe	7
Lepturinae	Rhagiini	<i>Anisorus quercus</i>	Europe	0
Lepturinae	Rhagiini	<i>Brachyta interrogationis</i>	Europe	19
Lepturinae	Rhagiini	<i>Carilia virginea</i>	Europe	0
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera femorata</i>	Europe	13
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera flavimana</i>	Europe	0
Lepturinae	Rhagiini	<i>Cortodera humeralis</i>	Europe	18

Lepturinae	Rhagiini	<i>Dinoptera collaris</i>	Europe	56
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops marginatus</i>	Europe / Asia	4
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops pratensis</i>	Europe	0
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops septentrionis</i>	Europe / Asia	2
Lepturinae	Rhagiini	<i>Acmaeops smaragdulus</i>	Europe	0
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera abdominalis</i>	Europe	11
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera ruficornis</i>	Europe	58
Lepturinae	Rhagiini	<i>Grammoptera ustulata</i>	Europe	25
Lepturinae	Rhagiini	<i>Pidonia lurida</i>	Europe	24
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium bifasciatum</i>	Europe	17
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium inquisitor</i>	Holarctic	40
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium mordax</i>	Europe	35
Lepturinae	Rhagiini	<i>Rhagium sycophanta</i>	Europe	34
Lepturinae	Rhagiini	<i>Stenocorus meridianus</i>	Europe	15
Necydalinae	Necydalini	<i>Necydalis major</i>	Europe	0
Necydalinae	Necydalini	<i>Necydalis ulmi</i>	Europe	3
Prioninae	Aegosomatini	<i>Aegosoma scabricorne</i>	Europe	2
Prioninae	Macrotomini	<i>Prinobius myardi</i>	Europe	25
Prioninae	Prionini	<i>Mesoprionus besikanus</i>	Europe	2
Prioninae	Prionini	<i>Prionus coriarius</i>	Europe	15
Spondylidinae	Anisarthrini	<i>Alocerus moesiacus</i>	Europe	1
Spondylidinae	Anisarthrini	<i>Anisarthron barbipes</i>	Europe	0
Spondylidinae	Asemini	<i>Arhopalus ferus</i>	Europe	16
Spondylidinae	Asemini	<i>Arhopalus rusticus</i>	Europe / Asia	33
Spondylidinae	Asemini	<i>Asemum striatum</i>	Holarctic	6
Spondylidinae	Asemini	<i>Asemum tenuicorne</i>	Europe	0
Spondylidinae	Asemini	<i>Cephalocrius syriacus</i>	Europe	7
Spondylidinae	Nothorhinini	<i>Nothorhina punctata</i>	Europe	0

Spondylidinae	Saphanini	<i>Oxypleurus nodieri</i>	Europe	2
Spondylidinae	Spondylidini	<i>Spondylis buprestoides</i>	Europe	16
Spondylidinae	Asemini	<i>Tetropium castaneum</i>	Europe	0
Spondylidinae	Asemini	<i>Tetropium fuscum</i>	Europe	6
Spondylidinae	Asemini	<i>Tetropium gabrieli</i>	Europe	0
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetrops praeustus</i>	Europe	47
Spondylidinae	Tetropiini	<i>Tetrops starkii</i>	Europe	14

**Table 1** - Taxonomie, origine et nombre de barcodes (2,928 barcodes au total) dans notre base de données locale des 185 espèces ciblées dans cette étude. Les 185 espèces correspondent aux espèces de cérambycides capturées (hors *Vesperidae* et *Disteniidae*) à l'aide de pièges multi-phéromonaux sur le territoire européen dans le chapitre 1 (Roques et al., 2023). Les espèces en rouge correspondent aux espèces actuellement absentes de la base de données.

## II.1 Echantillonnage et traitement des échantillons

L'échantillonnage qui a permis de récupérer les individus est celui réalisé par Roques et al., 2023 par le biais de trois projets de recherche européens (HOMED, MULTITRAP, SAMFIX) et de deux projets français (CANOPEE, PORTRAP) lors de la période 2018-2021 sur 244 sites en Europe (164 en France, 22 en Italie, 13 en Espagne et en Suisse, six au Portugal, cinq en Autriche et en Angleterre, quatre en Grèce et en Slovénie, trois aux Pays-Bas, deux en Bulgarie et en République-Tchèque et une en Suède). Les pièges à phéromones ont été disposés dans des milieux variés tels que dans des peuplements de résineux et de feuillus, dans des environnements naturels et anthropisés, à l'intérieur ou à proximité de zones d'arrivées potentielles (ports, aéroports, ...). Le mélange de phéromones a été conçu par Fan et al (2019) et contient huit phéromones de cérambycides dissoutes dans de l'isopropanol pour un volume total de 1 ml par pièges avec pour objectif de capturer un grand nombre de sous-familles et de tribus de cérambycides selon Hanks et al., 2012.

Les individus récupérés ont été conservés à -20°C dans de l'éthanol à 80% avant d'être identifiés à l'espèce par des taxonomistes spécialistes des cérambycides. Une fois identifiés, les individus ont été photographiés et les métadonnées les concernant ont été renseignées dans la base de données BOLD. Ensuite, un échantillon de tissu a été prélevé sur chaque spécimen (une ou deux pattes selon la taille des individus) et l'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen) en suivant les recommandations du fabricant puis séquencé grâce à la technologie Sanger à l'INRAE d'Orléans - Unité de Recherche en Zoologie Forestière. Les individus n'ayant pas fonctionné avec la technologie Sanger ont été déposés en plaque pour être ultérieurement séquencés au "Canadian Centre for DNA Barcoding (CCDB)" hébergé par "The Biodiversity Institute of Ontario (BIO)" à l'Université de Guelph, Ontario, Canada. Toutes les opérations ont été effectuées en suivant les protocoles haut-débits standards du CCDB (plus d'informations sur le site <http://ccdb.ca/resources.php>). Les amorces LCO1490/HCO2198 (Folmer et al. 1994) ont été utilisées pour l'amplification de l'entièreté du fragment barcode (658 pb) du gène COI.

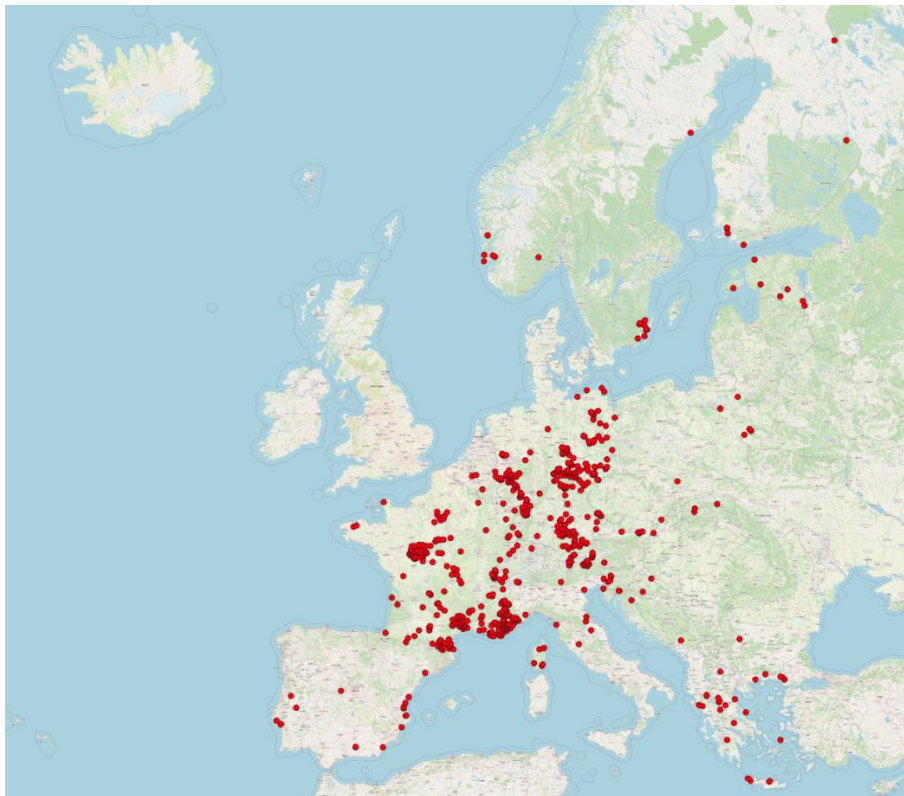
## II.2 Récupération et filtrage qualité des données publiques

Une recherche a été faite dans la base de données BOLD afin de créer une base de données locale contenant les séquences publiques des espèces d'intérêt. La recherche a été faite en ciblant les 185 espèces capturées dans le listing des pays suivants : Albania, Andorra, Austria, Azores, Belarus, Belgium, Bosnia Herzegovina, Great Britain, United Kingdom, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, European Turkey, Finland, France, Germany, Gibraltar, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Kaliningrad oblast, Kosovo, Latvia, Liechtenstein, Lithuania, Luxembourg, Macedonia, Madeira, Malta, Moldova, Monaco, Montenegro, Northern Ireland, Norway, Novaya Zemlya, Poland, Portugal, Romania, San Marino, Serbia, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, The Netherlands, Ukraine, Vatican City. Seules les séquences avec une taille supérieure ou égale à 500 pb et n'ayant pas de codon stop détectés ainsi que de contamination suspectées ont été sélectionnées. Nous avons également prêté attention aux cas de synonymie (une même espèce retrouvée avec plusieurs noms différents dans les bases de données) en conservant un unique nom par espèces.



Avec les différents filtres appliqués, 1480 séquences publiques ont été ajoutées à notre base de données locale. Pour plus d'informations concernant les méthodologies utilisées pour l'obtention des séquences, voire les publications originales. Les autres séquences, privées, ont été récupérées à l'aide de collaborateurs ou bien en séquençant les organismes capturés dans l'étude de Roques et al., 2023.

Finalement, 3202 séquences de cérambycidés capturées en Europe à l'aide de pièges multi-phéromones ont été récupérées (**Figure 1**).



**Figure 1** - *Distribution des points GPS des 3202 séquences (lorsque disponibles) utilisés à travers l'Europe dans la base de données locale. Les séquences sont réparties entre 21 pays : France, Grèce, Espagne, Finlande, Allemagne, Suisse, Autriche, Pologne, Bulgarie, Suède, Belgique, Estonie, Italie, Slovaquie, Norvège, Croatie, Slovénie, Monténégro, Macédoine, Portugal et Hongrie.*

## II.3 Analyses des données barcoding

Nous avons utilisé PyCOIStats v1.3 (Doorenweerd et al., 2020) afin de calculer le nombre d'haplotypes distincts pour chaque espèce dans la base de données sans tenir compte des données manquantes (NA) et des bases dégénérées. La détection des haplotypes a été effectuée sur l'ensemble des 3202 séquences contenues dans notre base de données, préalablement alignées.

Nous avons utilisé l'outil implanté dans la section "Sequences Analysis" de BOLD "Taxon-ID tree" qui consiste en la construction d'arbres de type Neighbor-Joining (NJ) avec la méthode K2P (Kimura 2 Parameter) pour récupérer un fichier Newick qui a ensuite été importé dans MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) pour construire les arbres phylogénétiques. L'outil "BIN discordance" de BOLD a également été utilisé afin de vérifier chaque identification effectuée par barcodes.

L'outil "Distance Summary" de BOLD a été appliqué pour calculer la distance au plus proche voisin (Distance to NN ou Inter\_Dmin\_NN) ainsi que la distance intra-spécifique maximale et moyenne pour chaque espèce de la dataset (Mean intra-spé et Max intra-spé aussi appelé Intra\_Dmax). Pour calculer les mêmes distances mais entre les BINs, l'outil PyCOIStats v1.3 a été appliqué.

Afin d'étudier le barcode gap de chaque espèce et d'identifier de potentielles espèces ne présentant pas de barcodes gap, l'outil "Barcode Gap Analysis", implémenté dans BOLD a été utilisé.

Toutes les figures et tests statistiques générés dans cette étude ont été réalisés à l'aide de R v4.3.0.

## III. Résultats

Dans un premier temps, nous avons compilé 3,202 séquences COI (139 séquences ajoutées par nos soins et 3,063 provenant de BOLD) représentant 160 espèces sur les 185 espèces de cérambycidés ciblées (soit 92,5%) avec une moyenne de 19,9 spécimens par espèces (un individu pour une espèce au minimum et 182

individus pour une espèce au maximum). Toutes les séquences de la dataset ont une taille supérieure ou égale à 500 pb. Les 160 espèces correspondent à 236 BINs différents.

### III.1 BINs partagés et espèces paraphylétiques

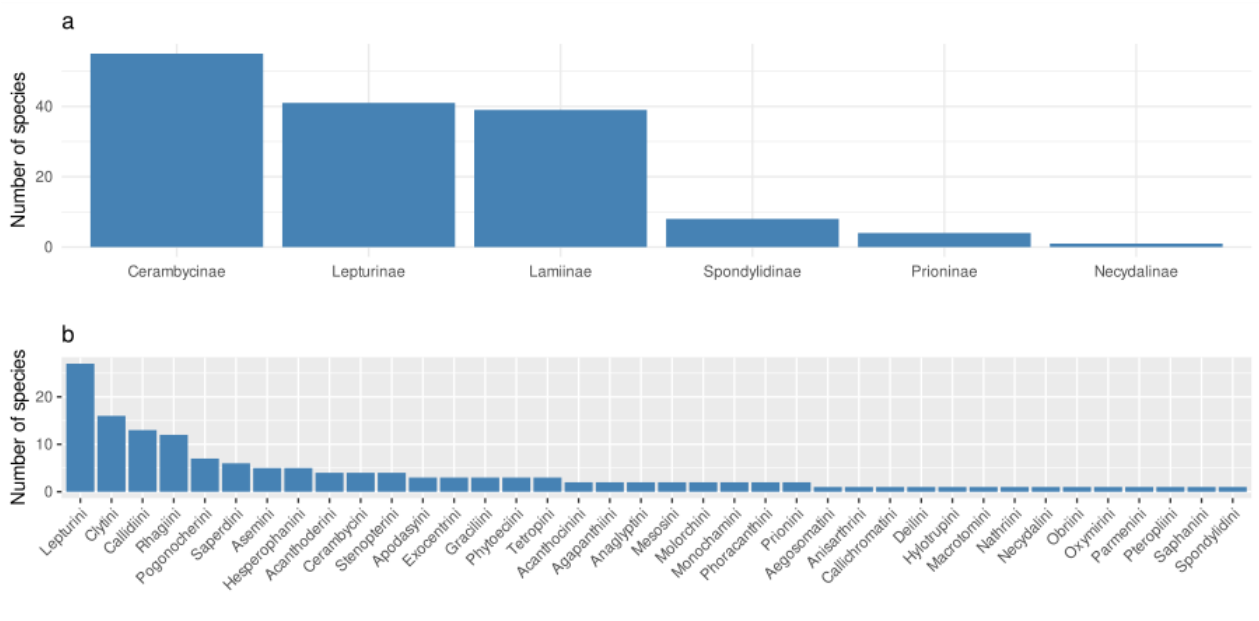
L'arbre Neighbor-Joining ainsi que l'analyse "BIN discordance" a permis de révéler plusieurs cas de paraphylie (groupe d'organismes qui comprend un ancêtre commun et une partie de ses descendants). La plupart, concernait des séquences isolées et mal placées dans l'arbre dû à des erreurs d'identification morphologique ou à des contaminations, mais six cas de paraphylie comprenant 13 espèces différentes (5 paires d'espèces : *Chlorophorus sartor* et *C. ruficornis*; *Anastrangalia dubia* et *A. reyi*; *Monochamus sartor* et *M. sutor*; *Purpuricenus budensis* et *P. kaehleri*; *Tetropium castaneum* et *T. gabrieli* et un triplet : *Leiopus nebulosus*, *L. femoratus* et *L. linnei*) ne concernaient pas des séquences isolées mais des ensembles de séquences.

Toutes les espèces touchées par ces cas de paraphylie ont été temporairement retirées de la base de données en attendant de procéder à des analyses supplémentaires afin de pouvoir confirmer l'identification et la validité des séquences concernées.

### III.2 Présentation de la dataset post-nettoyage

Après le retrait des 274 séquences de 13 espèces concernées par des cas de paraphylie, nous nous retrouvons avec 2,928 séquences COI (129 ajoutées contre 2799 provenant de BOLD) représentant 147 espèces sur les 185 espèces ciblées (soit 85%). Avec une moyenne de 16,9 spécimens par espèces (un individu pour une espèce au minimum et 182 individus pour une espèce au maximum). Actuellement, il nous manque 23 espèces pour compléter les 185 espèces ciblées (Table 1). Certaines de ces espèces, retirées précédemment, seront peut-être ajoutées par la suite si nous parvenons à confirmer ou corriger leur identification.

Les 147 espèces sont réparties entre 6 sous-familles de Cerambycidae et 38 tribus différentes, avec une surreprésentation des sous-familles des Cerambycinae / Lamiinae / Lepturinae et de la tribu des Lepturini (**Figure 2**).



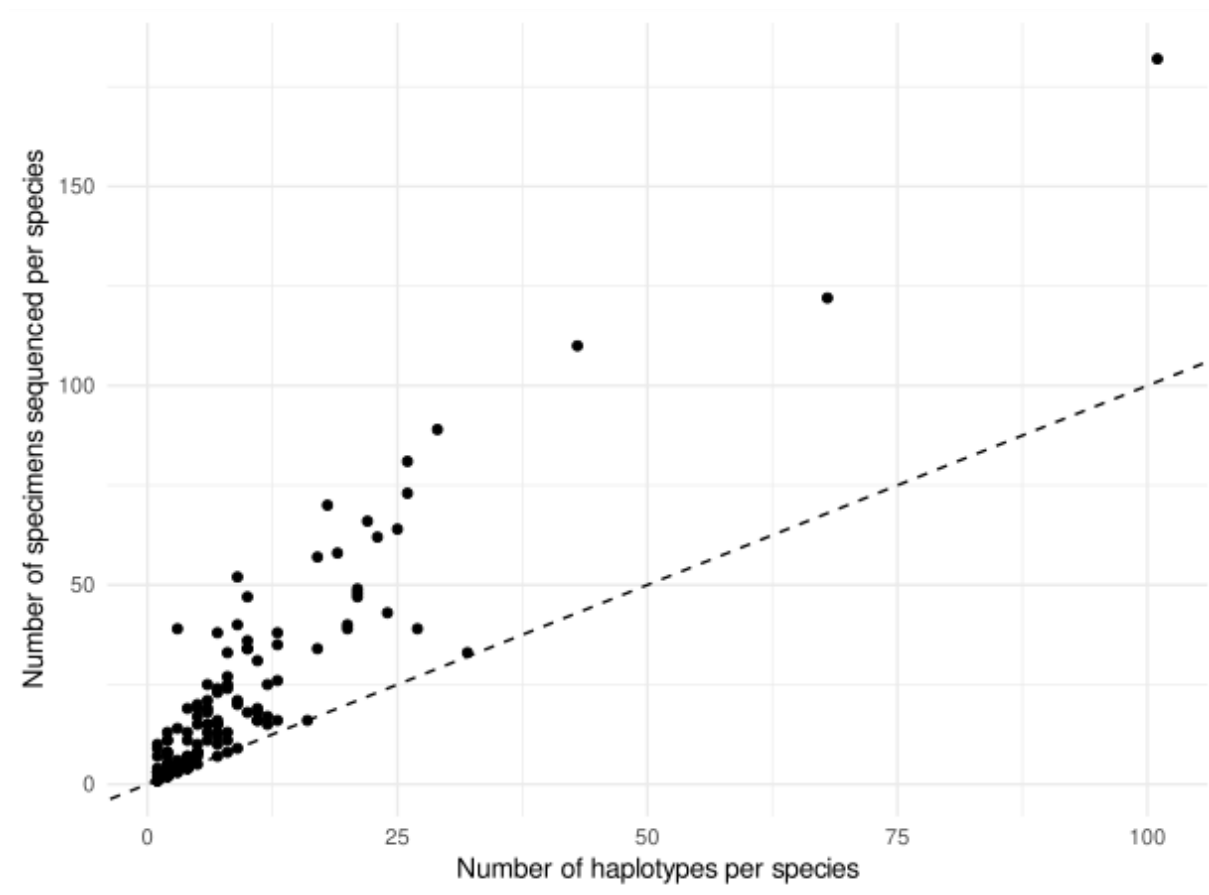
**Figure 2** - Diversité en espèce de la librairie de référence de barcodes. (a) Diversité en espèce selon les différentes sous-familles ; (b) Diversité en espèce selon les différentes tribus.

### III.3 Performance du barcoding moléculaire

Toutes les séquences ont eu une attribution d'un ou plusieurs BIN(s) par BOLD. On décompte au total 218 BINs différents. Parmi les 218 BINs, on dénombre 185 BINs concordants (84,9% des BINs contenant une seule espèce), 0 BINs discordants (les BINs contenant au moins deux espèces différentes) et 33 BINs singletons (15,1% contenant un unique individu, nous ne pouvons donc pas les définir concordants ou discordants sans plus de données).

L'ensemble des données contient 1,250 haplotypes distincts avec un maximum de 101 haplotypes retrouvés au sein des 182 individus de *Stenurella melanura* et une moyenne de 8,7 haplotypes par espèces. La diversité haplotypique est significativement corrélée à l'effort d'échantillonnage exprimé en nombre d'individus

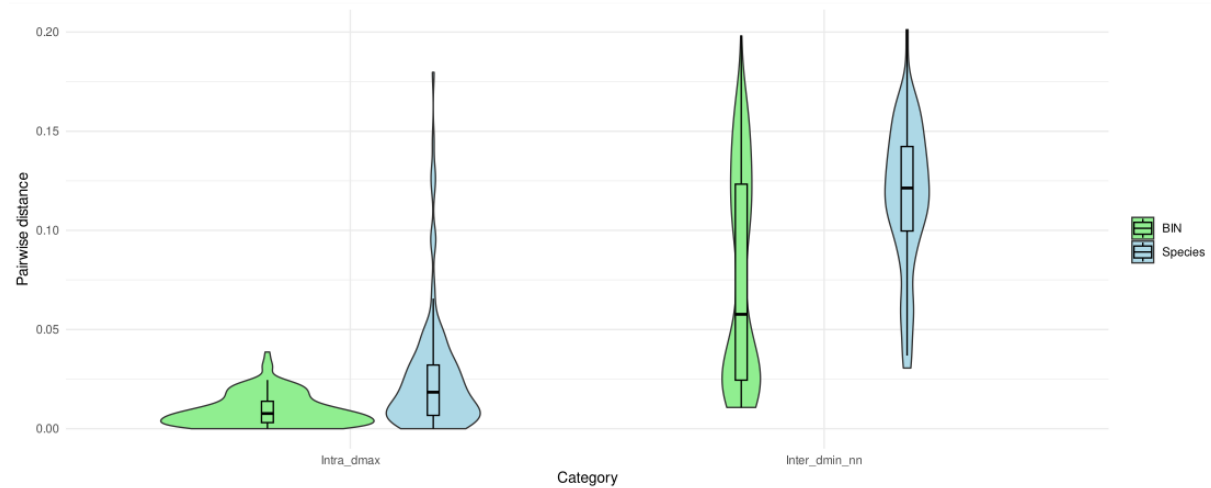
séquencés par espèces (Corrélation de Pearson:  $r = 0.9192$ ,  $N = 147$ ,  $p < 0.05$ ) (**Figure 3**).



**Figure 3** - Nombre d'haplotypes distincts par espèce vs nombre de spécimens séquencés par espèce. Nombre total d'haplotypes distincts : 1,250. Nombre de spécimens séquencés : 2,928

Nous avons évalué la p-distance (pairwise distance) entre et au sein des espèces et des BINS afin d'évaluer si le barcode ADN est considéré comme fiable. En effet, un barcode ADN est considéré comme fiable si Intra\_Dmax (la variation au sein des espèces) est inférieure à Inter\_Dmin\_NN (la variation entre les espèces). Pour notre base de données, que ce soit au niveau des espèces ou des BINS, Dmax reste toujours inférieur à Inter\_Dmin\_NN. Indiquant ainsi que les espèces incluses dans notre base de données peuvent être identifiées et différenciées avec le fragment barcode (**Figure 4**). La valeur maximale au sein des espèces est plus grande que lorsque les espèces sont définies à l'aide de la taxonomie classique (maximum 17,97%) par rapport aux BIN (max 3,4%). Ce résultat n'est guère surprenant car l'algorithme BIN

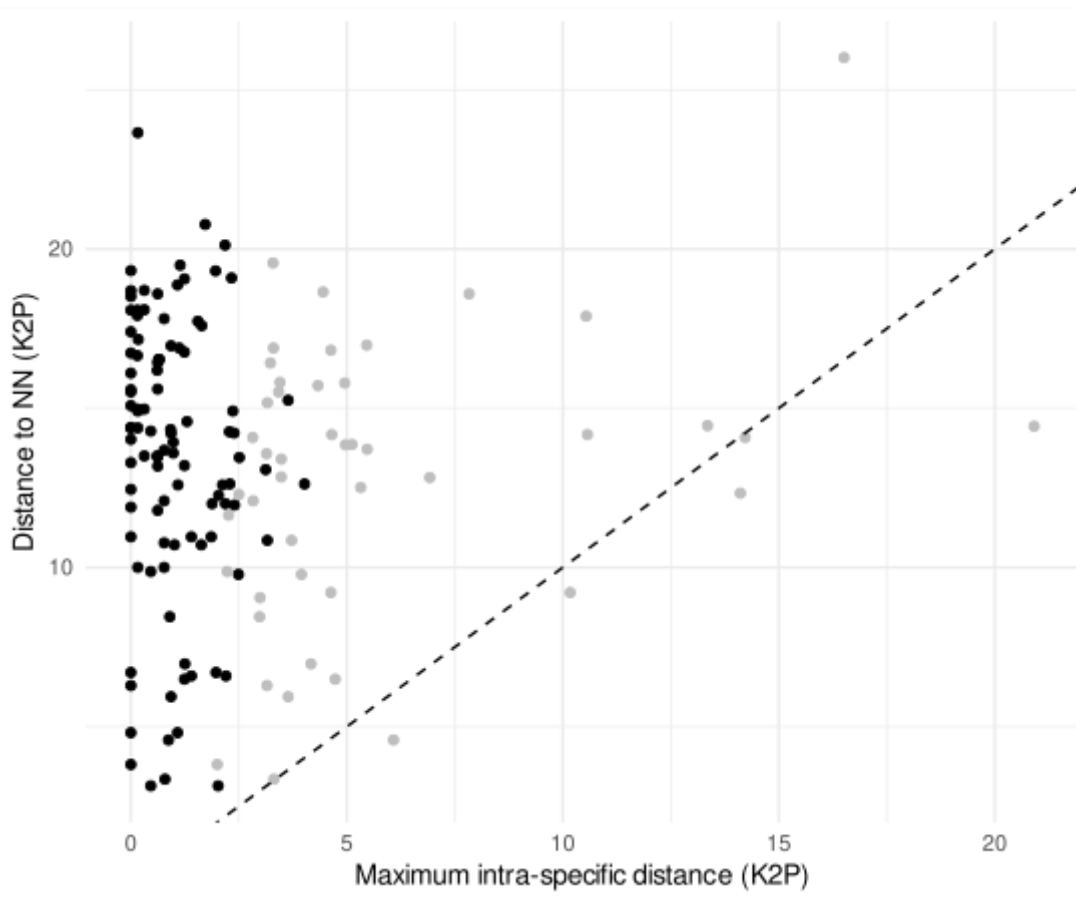
utilise des données de distance génétique. On observe également un clivage plus important et des distances plus faibles entre espèces sœurs : en moyenne 7,44% pour les BIN contre 11,64% pour les espèces.



**Figure 4** – Diagrammes en violon montrant la “pairwise distance” entre (*Inter\_dmin\_nn*) et au sein (*Intra\_dmax*) des espèces et des BINs. Les boîtes à moustaches dans les diagrammes en violon montrent la médiane, le premier et troisième quartile ainsi que les valeurs extrêmes.

### III.4 Analyse des séquences

Au sein des espèces, la divergence intraspécifique n'excède pas 2,46 % en moyenne, tandis que la distance moyenne au plus proche voisin (Distance to NN) atteint une moyenne de 13,25 %. Cela a pour conséquence que l'on observe un “barcode gap” clair pour la très grande majorité des espèces, excepté cinq espèces (*Agapanthia cardui*; *Cortodera femorata*; *Pachytodes erraticus*; *Phytoecia nigricornis* et *Tetrops praeustus*) (**Figure 5**)



**Figure 5** - Barcode gap pour nos 147 espèces de cérambycidés représenté par la corrélation entre le “nearest-neighbour distance” et le “maximum intraspecific divergence”. Les points noirs représentent les espèces assignées à un BIN unique tandis que les points gris représentent les espèces avec plus d’un BIN assigné. Les points en dessous de la diagonale représentent les espèces avec un barcode gap.

#### IV. Discussion

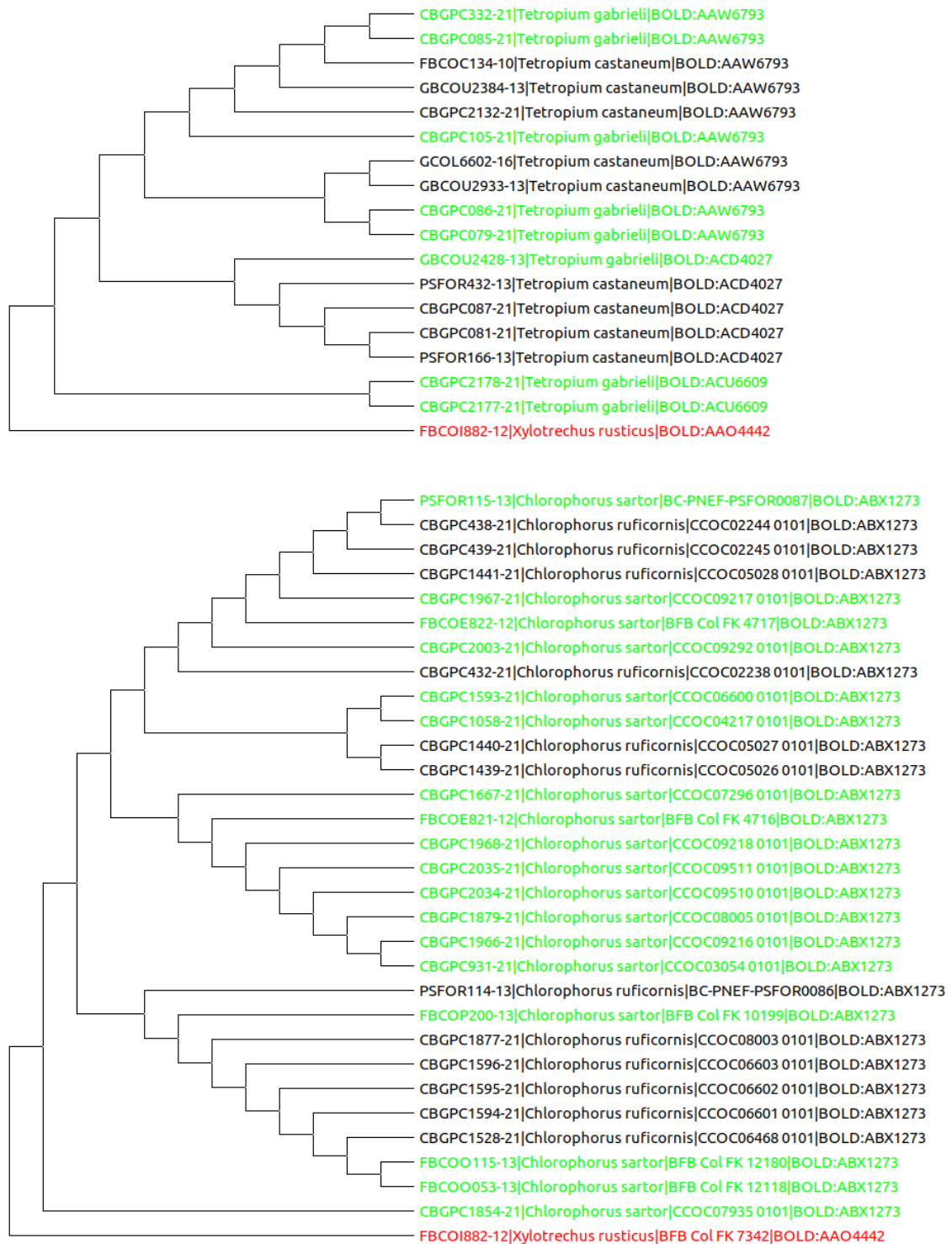
Notre étude a permis d’assembler 2,928 séquences de barcodes ADN pour 147 espèces de cérambycidés ce qui représente 79,47% des 185 espèces capturées en Europe à l’aide de pièges multi-phéromonaux. Cette nouvelle base de données pourrait servir à identifier avec précision les contenus de pièges multi-phéromonaux déposés en Europe afin d’en identifier le contenu lors d’analyses barcoding ou métabarcoding. Une espèce non identifiée dans de tels pièges pourrait donc être le signe d’une nouvelle espèce exotique récemment arrivée sur le territoire Européen.

Notre étude a révélé que la “nearest-neighbour distance” était plus élevée chez ces espèces de cérambycides que la divergence intra-spécifique (13,25% vs 2,46%). Ces mesures supposent que notre tri des séquences publiques problématiques a permis de conserver les spécimens ayant été correctement identifiés. Pour les cinq espèces qui ne présentent pas de divergence au niveau du fragment barcode, des études supplémentaires devraient être menées afin de valider leur isolement reproductif en testant la divergence au niveau de loci nucléaires.

Malgré un effort de nettoyage et de vérification secondaire des séquences disponibles dans les bases de données, divers cas de paraphylie ont été détectés au sein des 3176 séquences. Certains cas observés ont déjà été repérés lors de précédentes études, c’est notamment le cas de la paraphylie entre *Anastragalia dubia* et *Anastrangalia reyi* (Hendrich et al. 2015 ; Rougerie et al 2015).

Nous allons nous concentrer sur deux exemples ici (**Figure 6**) :





**Figure 6** - Arbres phylogénétiques (Neighbor-Joining) obtenus avec BOLD pour deux espèces présentant de la paraphylie. (a) Paraphylie entre *Tetropium gabrieli* (en vert) et *Tetropium castaneum* (en noir) et (b) Paraphylie entre *Chlorophorus sartor* (en vert) et *Chlorophorus ruficornis* (en noir). *Xylotrechus rusticus* (en rouge) a été utilisé comme groupe externe.

Pour le premier cas entre *Tetropium gabrieli* et *Tetropium castaneum*, deux BINs sur trois sont partagés entre les deux espèces. L'identification morphologique des deux espèces étant très délicate (selon Touroult et al., 2019), il est probable que nous ayons à faire ici à une erreur d'identification. Pour le second cas, entre *Chlorophorus sartor* et *C. ruficornis*, un seul BIN est partagé entre les deux espèces. Les deux espèces sont facilement identifiables et distinguables morphologiquement.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces cas de paraphylie et de partage de BINs entre différentes espèces observées.

Une première hypothèse pour cinq de nos six cas (*A.dubia* et *A.reyi* ; *M.sartor* et *M.sutor* ; *P.budensis* et *P.kaehleri* ; *T.castaneum* et *T.gabrieli* ; *L.nebulosus* et *L.femoratus* et *L.linnei*) sont les erreurs d'identifications morphologiques. En effet, toutes les espèces concernées par des cas de paraphylie dans notre étude sont des espèces morphologiquement similaires pouvant facilement amener à des erreurs d'identification. Ce n'est cependant pas le cas entre *Chlorophorus ruficornis* et *Chlorophorus sartor* qui sont deux espèces morphologiquement distinctes où les confusions d'identification sont peu probables.

Une seconde hypothèse pouvant expliquer les cas de paraphylie serait le phénomène de synonymie. Cette hypothèse n'a pas été retenue pour notre jeu de données car nous avons vérifié au préalable que les cas de paraphylie concernaient bien au moins deux espèces différentes et non pas une seule qui serait en fait nommée de plusieurs façons. Cependant lors du premier tri des données, plusieurs séquences ont été retirées pour cause de synonymie, c'est notamment le cas des séquences sous le nom de *Cephalocrius syriacus* (Reitter, 1895) que l'on retrouve également sous le nom d'*Arhopalus syriacus* ou encore de *Monochamus rosenmuelleri* que l'on retrouve également sous le nom de *Monochamus sutor*.

Une troisième hypothèse est celle du phénomène de NUMTs ("Nuclear Mitochondrial DNA segments", aussi appelé pseudogènes) et d'hétéroplasmie mitochondriale qui ont déjà été rapportés chez les cérambycides (Koutroumpa et al.

2009 ; Haran et al., 2015). Les NUMTs sont des copies de gènes mitochondriaux non fonctionnels transportés dans le génome nucléaire (Bensasson et al. 2001). L'hétéroplasmie correspond à l'existence de plus d'un type d'ADNmt chez un seul individu et qui peut être exprimée sous forme de polymorphisme de longueur ou de nucléotide unique. L'hétéroplasmie, comme les NUMTs peuvent être amplifiés simultanément ou préférentiellement avec le fragment d'ADNmt, générant de la variabilité factice qui biaise les résultats en surestimant le nombre d'espèces décrites (Haran et al., 2015).

Une dernière hypothèse concerne le phénomène d'introgression. Le processus d'introgression commence généralement par la rencontre de deux espèces proches, capables de se croiser et de produire une descendance viable et féconde, appelée hybride (Suvorov et al., 2020). Lorsque ces hybrides se reproduisent avec l'une ou l'autre des espèces parentales ou entre eux, les gènes des deux espèces sont mélangés et peuvent être transmis à la génération suivante. C'est un processus biologique relativement courant, affectant au moins 10% des espèces existantes du règne animal (Suvorov et al., 2020). Lorsqu'il y a introgression entre deux espèces, les gènes spécifiques à chacune de ces espèces peuvent être transférés d'une espèce à l'autre (Flouri et al., 2020). Cela peut rendre difficile l'identification moléculaire des individus en se basant sur des marqueurs génétiques spécifiques à une seule espèce. Les marqueurs génétiques utilisés pour l'identification pourraient montrer des signes d'introgression, ce qui rendrait difficile de déterminer à quelle espèce appartient réellement un individu donné. Ce phénomène a déjà été relevé chez les papillons par exemple (Cong et al., 2017) avec des divergences de barcodes allant jusqu'à 2,6% chez deux individus de la même espèce.

Dans cette étude, une base de données de référence de séquences COI pour l'attribution taxonomique des cérambycidés capturés à l'aide de pièges multi-phéromonaux en Europe a été développée à partir des données disponibles sur BOLD ainsi que de données ajoutées spécialement pour cette étude. Ces données ont ensuite été filtrées selon plusieurs critères afin de supprimer les séquences qui pourraient être des sources potentielles d'erreurs lors des assignations taxonomiques.

Notre base de données met en évidence l'importance de la curation manuelle lors du développement de bases de données de références à usage local. Il est nécessaire, bien que ce soit un processus long, de mettre à disposition des données de haute qualité dans les bases afin d'offrir une base solide aux identifications basée sur la génétique des individus comme le font les approches barcoding et métabarcoding.



---

## **Chapitre IV : Population genetic structure of *Xylotrechus stebbingi* along the north Mediterranean basin.**

---

### **Résumé en français du chapitre IV :**

Cette étude se focalise sur *Xylotrechus stebbingi*, un Cerambycide d'origine asiatique, qui s'est établi avec succès sur le pourtour méditerranéen au cours de ces 30 dernières années. Nous cherchons ici à étudier la structure génétique des différentes populations non-natives échantillonnées lors de la campagne de piégeage du chapitre 1 (Roques et al., 2023) afin d'essayer de comprendre l'histoire et la dynamique d'introduction de cette espèce introduite. Pour ce faire, 101 individus de *Xylotrechus stebbingi* provenant de 23 populations ont été analysés à l'aide d'une approche RADseq. Les populations ont été prélevées dans trois types d'environnements : dans les ports, à proximité des ports et dans les forêts avoisinantes. L'analyse génétique des spécimens interceptés de *Xylotrechus stebbingi* a révélé une structure phylogéographique inattendue de cette espèce non indigène dans le bassin méditerranéen. Nos résultats ont montré que la dispersion de cette espèce était due à des événements d'introduction multiples et récurrents depuis 30 ans. Plus intéressant encore, nos résultats ont confirmé que les zones portuaires pourraient être identifiées comme des points d'entrée majeurs pour cette espèce. La variabilité génétique des populations portuaires est en général plus élevée que dans les populations des peuplements forestiers avoisinants. Notre étude sur cette espèce à fort potentiel invasif a permis de tester la perméabilité des zones à risques aux différentes voies d'entrées dans le bassin méditerranéen. Cela contribue à souligner l'importance des dispositifs de piégeage multi-composés à vocation générique dans les zones portuaires afin de maximiser les possibilités de détection précoces d'espèces exotiques émergentes.

## I. Introduction

Biological invasions have increased over the past decades without showing signs of saturation (Seebens et al., 2017). They can, however, be damaging to ecosystems and local biodiversity (Kenis et al., 2009), the economy, or even human health (Roy et al. 2023). As international trade continues to grow, the number of harmful organisms establishing themselves outside their native range also increases (Hulme, 2009), particularly among insects (Gippet et al., 2019). Many phytophagous species are arriving in Europe with the trade of ornamental plants (Nacambo et al., 2014). Other insects are moving westward either as stowaways inadvertently carried with imports of goods from Asia (Meng et al., 2015), or by expanding their geographical area on their own (Kirichenko et al., 2017). Therefore, a multitude of invasion scenarios can be encountered.

Among Coleoptera, the Cerambycidae family, which includes 34,000 to 38,000 species, is economically and ecologically significant since many of these species are xylophagous and can spread in European forest causing significant economical damage (Sidharthan et al. 2023 ; Rossa and Goczał 2021). For example, several detections of *Xylotrechus chinensis* (Chevrolat, 1852), have been made in recent years in Crete (2018), Spain (2018) (OEPP/EPPO, 2018a, b), Germany (2017) (OEPP, 2018c), the United States (2011) (Brockerhoff et al., 2014), and France (2018) (Cocquempot et al., 2019). This species is considered a significant pest of mulberry trees in its native range, which includes China, Korea (North and South), and Japan (Cocquempot et al., 2019). The detections of this insect in France were reported near port areas (the port of Sète and the port of Bordeaux) and are most likely related to the importation of goods and pallets or formwork wood (Cocquempot et al., 2019). Another example with a species of the same genus, *Xylotrechus stebbingi*, native from northern India, the Himalayas, and western China was first detected in Europe in 1982 from Piedmont (Italy) and has since spread all along the french Mediterranean coast, Switzerland, Greece, Crete, mainland Greece, Germany, Israel, Tunisia and more recently in Spain (see **encadré 1**). *Xylotrechus stebbingi* has a flight period extending from early June to early August. It is a polyphagous species, with its main host plant being mulberries (*Morus* spp.), but it also favors ash, plane, olive, and probably maple trees (Braud et al., 2002). It seems to prefer urban areas and their outskirts, industrial

or commercial zones, parks, avenues, gardens, forests, and scrublands (Valladares & Réglade, 2019).

In order to understand the success of invasive species in establishing in a new area, and propose effective control measures, it is important to determine the pathways of the invasions, the number of introductions, as well as the spatial distribution of intraspecific genetic diversity, which can inform about the dispersion after introduction.

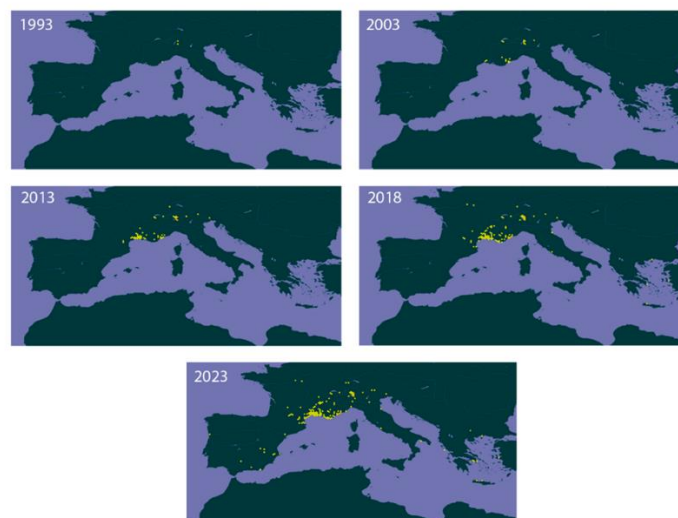
Our study focuses on *Xylotrechus stebbingi*, which has successfully established around the Mediterranean basins and is still captured, notably using multi-funnel traps as shown in chapter 1 (Roques et al., 2023) with more than 6000 individuals captured.

We studied the genome-wide variation within and between 23 populations of *Xylotrechus stebbingi* distributed across six non-native location countries : France, Corsica, Italy, Spain, Greece, and Switzerland. Populations were collected in three types of environments: (i) port areas which are preferred zones of introduction, (ii) intermediate areas, near port cities, as well as (iii) forest environments, farther away from port areas. The population genetic structure will be compared in the three environments to see if potential new individuals introduced in the ports can overcome environmental filters allowing them to expand their territory. We used nuclear data at the genome scale based on DNA sequencing associated with restriction sites (RAD) (Davey and Blaxter 2010) to describe with high resolution the genetic structure of the species.



**Encadré 1 - Dynamics of the invasion of *Xylotrechus stebbingi* on the northern rim of the Mediterranean sea**

This species was first detected in Europe in 1982 with specimens collected from Piedmont (Italy), probably as a result of an accidental introduction (Dioli & Vigano, 1990). *Xylotrechus stebbingi* then rapidly spread throughout southern Europe and the Mediterranean basin. It was first detected in France in 1993 in the Alpes-Maritimes, followed by several sightings of isolated individuals in 2001 (in Hérault) and 2002 (in the Alpes-Maritimes, Alpes-de-Haute-Provence, and Haute-Savoie). Detections have also been made in Switzerland, Crete, mainland Greece, Germany (Braud et al., 2002), as well as in Israel (Pavlicek et al., 1998) and Tunisia (Braud et al., 2002). In France, by 2002 the species was already well established on the French Riviera and present in a triangle bounded to the north by Evian (Haute-Savoie), to the southwest by Montpellier (Hérault), and to the southeast by Menton (Alpes-Maritimes). In 2012, its western distribution limit was pushed back by about 150 km with a detection of the species in the Aude department, confirming the continued expansion of this species. In 2019, the species reached the Toulouse region (Valladares & Réglade, 2019). Today, *Xylotrechus stebbingi* is present all along the French Mediterranean coast and is even found in Spain (**Figure 1**).



**Figure 1 - Evolution of the georeferenced records of *Xylotrechus stebbingi* detections in 1993, 2003, 2013, 2018, and 2023. The yellow points on the maps indicate the locations where *Xylotrechus stebbingi* has been detected (<https://www.gbif.org/species/1159172>).**

## II. Materials and methods

### II.1 Taxon sampling and DNA extraction

We selected 101 individuals of *Xylotrechus stebbingi* from 23 populations captured in the trapping campaign by Roques et al., 2023 (Chapter 1) (Table 1). Populations have been categorized into three categories : « Inside port » when individuals were trapped within a potential arrival zone (all ports or airport for Lyon St Exupéry), « Outside port » when individuals were captured outside of a potential arrival zone while still being geographically close to it, and « Forest » when individuals were captured in a forest area and therefore geographically more distant from potential arrival zones (**Table 1**).

DNA was extracted using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue extraction Kit using two legs following the manufacturer's recommendations.

N (indiv)	Country	Population name	Population type (Forest / Inside port / outside port)	Ho	Hs	Fis
8	France	Sète (in)	Inside port	0,208	0,241	0,138
4	France	Fos sur mer (in)	Inside port	0,205	0,242	0,156
2	France	Bordeaux (in)	Inside port	0,198	0,249	0,204
4	France	Fos sur mer (out)	Outside port	0,211	0,240	0,120
2	France	Lyon St Exupery (out)	Outside port	0,197	0,245	0,196
5	France	Menton	Forest	0,206	0,238	0,134
4	France	Porquerolles	Forest	0,190	0,240	0,210
4	France	Gignac	Forest	0,190	0,231	0,179
2	France	Nice	Forest	0,208	0,237	0,121
2	France	Paradou	Forest	0,216	0,244	0,114
2	France	Manjastre	Forest	0,210	0,226	0,069
2	France	Montarnaud	Forest	0,198	0,244	0,188
2	Corse	Bastia (in)	Inside port	0,196	0,220	0,110
2	Corse	Coti (out)	Outside port	0,217	0,239	0,090
4	Corse	Bastia (out)	Outside port	0,210	0,233	0,097
3	Spain	Sagunt (in)	Inside port	0,210	0,243	0,133
5	Spain	Castello (in)	Inside port	0,212	0,243	0,129
10	Spain	Valencia (in)	Inside port	0,217	0,247	0,123
4	Spain	Valencia (out)	Outside port	0,216	0,247	0,125
6	Spain	Gandia (out)	Outside port	0,218	0,242	0,099
4	Switzerland	Switzerland	Forest	0,209	0,241	0,135
5	Greece	Heraklion (out)	Outside port	0,203	0,240	0,151
2	Italy	Mestre (out)	Outside port	0,171	0,221	0,228

**Table 1** - *Xylotrechus stebbingi* population metadata and statistics. The four individuals collected in Switzerland have been grouped into a single population for convenience. Abbreviations : Fis, inbreeding coefficient ; Ho, observed heterozygosity ; Hs, expected heterozygosity ; N, number of individuals in the population.

## II.2 RAD sequencing

The construction of libraries was carried out following the protocol from the article by Johnson et al., 2008. The DNA from each sample was individually digested with the PstI restriction enzyme. Library validation was performed through DNA quantification on a Fragment Analyzer (High Sensitivity NGS kit) and qPCR (ROCHE Light Cycler 480). Subsequently, sequencing was conducted at MGX (Montpellier, France) using an Illumina NovaSeq 6000 with the Sequence By Synthesis (SBS) technology, facilitated by the NovaSeq Reagent Kits.

## II.3 SNP calling and filtering

Sequences were demultiplexed and cleaned using the `process_radtags` tool in the STACKS pipeline (Catchen et al. 2013). To clean the sequences, the reads with low quality score were discarded using « `-q` » parameter with the default setting of a sliding window and a raw phred score of 10.

After the cleaning step with STACKS, SNP calling were performed with `lpyrad` v0.9.93 (Eaton & Overcast, 2020) using the RAD analysis method and a de novo assembly with the following parameters : min depth for statistical base calling = 6, minimum taxon coverage = 75, max heterozygous sites per locus = 0.5.

The output VCF file was filtered using `VCFtools` v.0.1.16 (Danecek et al. 2011), using the following criteria : max missing rate > 0.8, minor allele frequency (MAF)  $\geq$  0.05, only genotypes greater than or equal to 6 are includes with `-minDP 6` and we only include bi-allelic sites with `--min-alleles 2` and `--max-alleles 2` parameters. All individuals with a missing data percentage > 70% were removed from the analysis, corresponding to 13 individuals. After all filtering steps, the final dataset consists of 79,073 bi-allelic loci.

## II.4 Population genetic analysis

We calculated basic diversity statistics:  $F_{is}$  (inbreeding coefficient),  $H_o$  (observed heterozygosity) and  $H_s$  (mean gene diversity) for all populations using the HIERFSTAT version 0.5-11 function basic.stats (Goudet, 2005).

The Bayesian clustering algorithm of STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) was used to infer individual ancestries to genetic groups, based on the admixture model with uncorrelated allele frequencies. Clustering solutions for  $K=1$  to  $K=10$  were explored through at least 3 replicate runs per  $K$ , each of 200,000 iterations after a burnin period of 10,000. Converged runs were compiled and summary statistics ( $L(P|K), \Delta K$ ) were computed for each  $K$  with STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012).

## II.5 Phylogenetic analysis

The phylogenetic relationships between individuals and populations were assessed using RAxML (Stamatakis, 2014) employing the neighbor-joining (NJ) method based on SNP data. Two individuals of *Xylotrechus chinensis* were added as an outgroup for the construction of the tree. The tree was then constructed using iTOL (Letunic & Bork, 2021).

# III. Results

## III.1 Data processing

The DNA sequencing of 101 individuals of *Xylotrechus stebbingi* resulted in a total of 934,297,300 reads with an average of 9,250,468 reads per individual. After quality filtering steps, we retained a total of 657,742,605 reads (70%) with an average of 6,512,303 reads per individual. The variable sites identified by ipyrad were then filtered to ultimately obtain a total of 25,508 variable sites. During this filtering process conducted with VCFtools, 13 individuals were removed from the analysis because they had a missing data percentage > 70%.

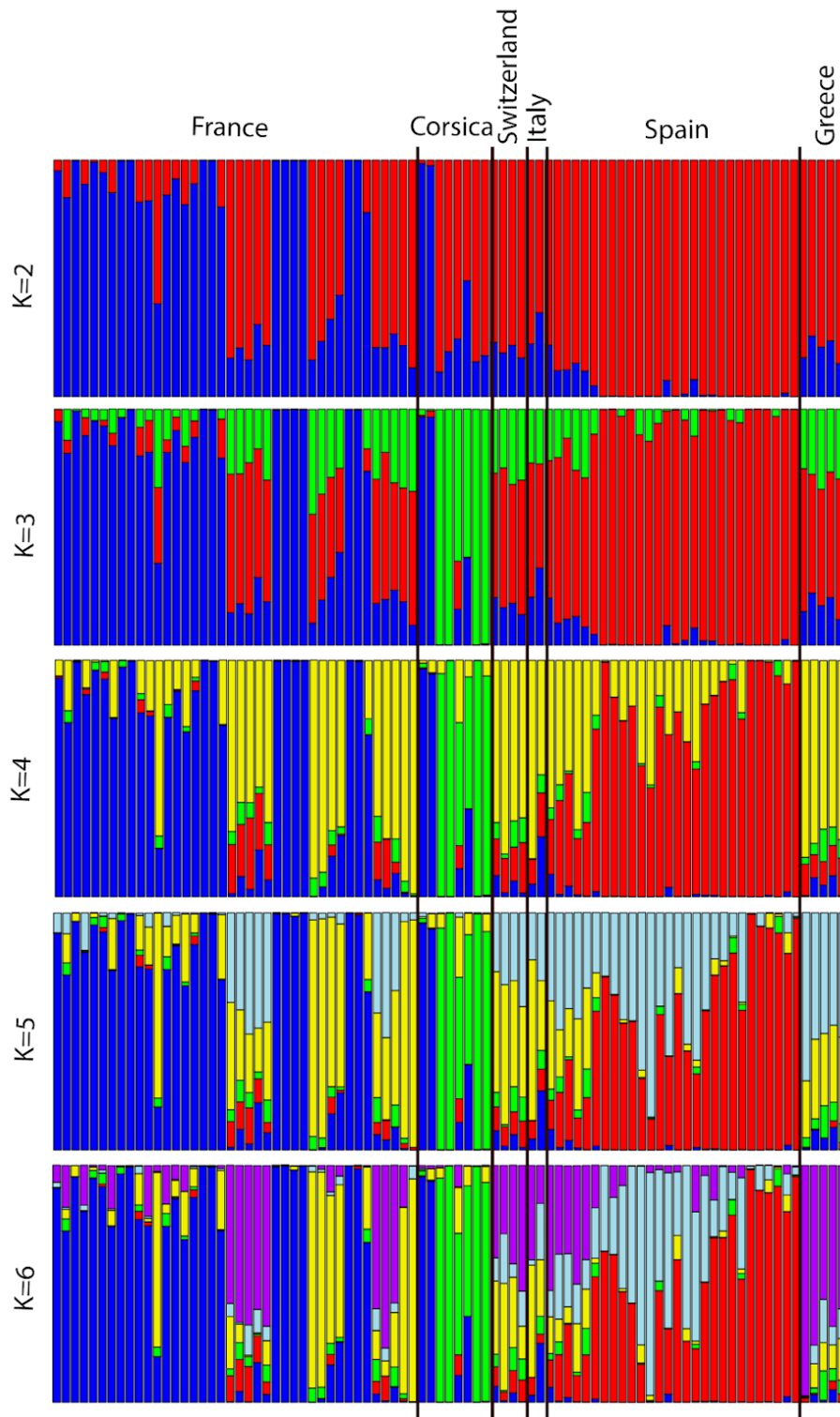
### III.2 Genetic diversity analysis

The diversity measured with bi-allelic SNPs allowed for the obtaining of an average  $H_o$  of 0.205 (0.171-0.218), and an average expected heterozygosity  $H_s$  of 0.239 (0.220-0.249). The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was low, showing good concordance between observed and expected heterozygosities with an average  $F_{is}$  of 0.141 (0,090-0.228).

### III.3 Population structure

The STRUCTURE HARVESTER analysis revealed that  $K=2$  and  $K=4$  were the most suitable values for analyzing the genetic structure of our populations.

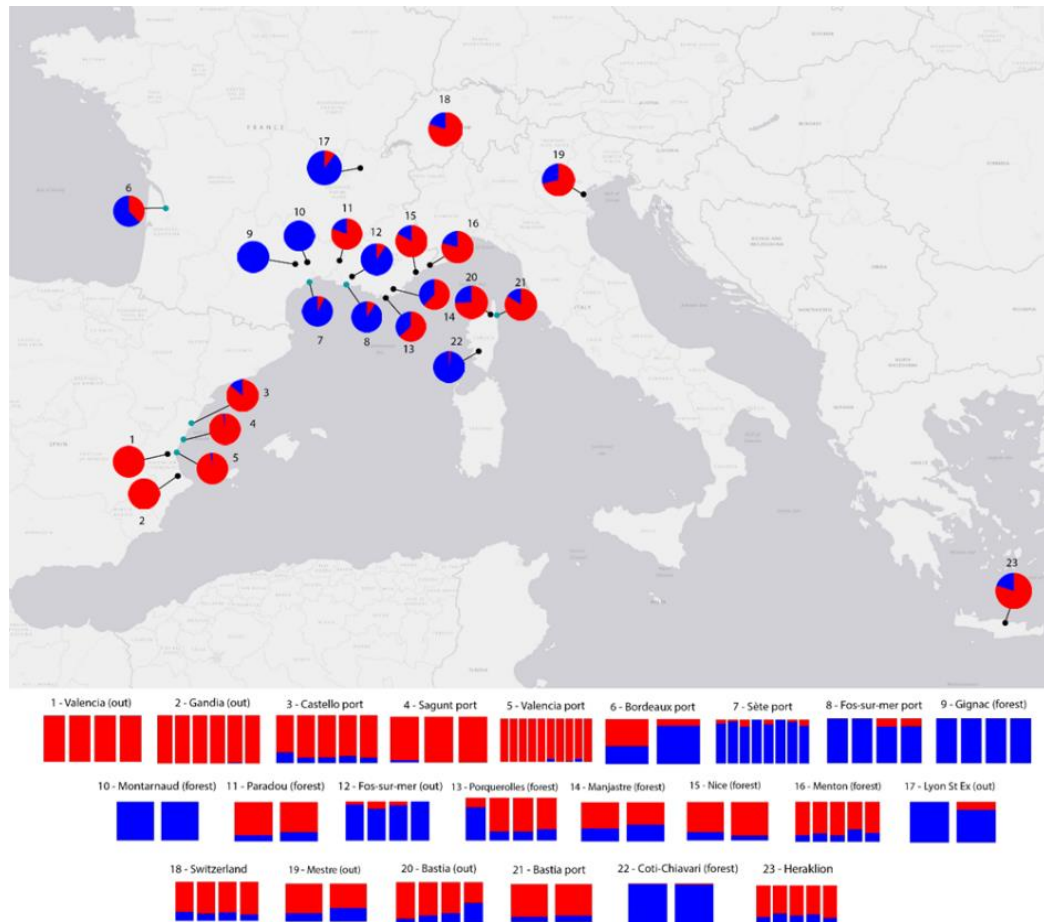
For  $K=2$ , the red cluster is found in all six localities, with a dominance in the Spanish populations. For the blue cluster, it is predominant in the French populations, although it is also present in populations from other localities, albeit in a smaller proportion. For  $K=4$ , the red cluster appears even more exclusive to the Spanish populations and the blue cluster to the French populations than previously. The yellow cluster is present in all the studied localities except Corsica, where it is found in very small proportion. On the contrary, the green cluster predominates only in Corsica and is present in very small proportions in the other localities. For the French populations, the yellow cluster exclusively dominates in forest populations. Conversely, in Spain, the yellow cluster appears dominant in port areas and is much less represented in populations outside the ports (**Figure 2**).



**Figure 2** - Population structure estimated by STRUCTURE analysis. The 88 individuals are represented by the vertical lines, which are partitioned into  $K$  colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in  $K$  clusters. 25,508 SNPs.

### III.4 Geographical population structure with K=2 and K=4 scenarios

With the K=2 scenario (**Figure 3**), we can observe that the red cluster is largely dominant in the Spanish populations. It is also dominant in the populations of southeastern France, as well as in the north of Corsica, Italy, Switzerland, and Greece. The blue cluster is predominant in the populations of southwestern France as well as in the population of southern Corsica, in Bordeaux, and at Lyon Saint Exupéry.



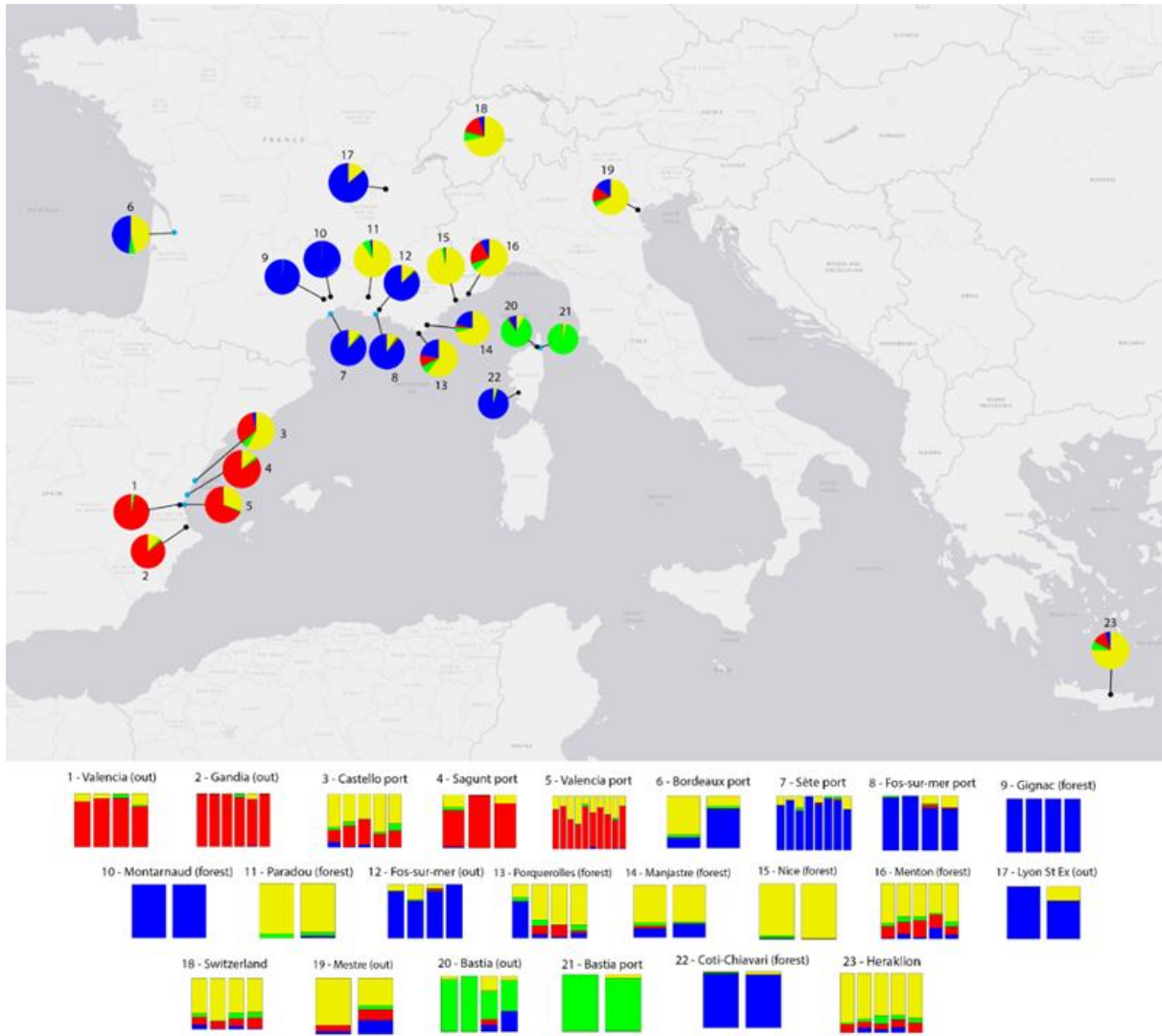
**Figure 3** - Genetic structure of *Xylotrechus stebbingi* individuals, and the relative admixture per individuals and populations for K=2 scenario. The pie charts represent the proportion of variants within each population assigned to each of the two identified clusters. The number next to each pie chart corresponds to the associated bar plot. The bar plots represent the admixture of each individual divided by populations. Each bar corresponds to an individual and shows the proportion of the genotype assigned to each of the two clusters. Black points represent forest or outside port locations. Blue points represent inside port locations.

The scenario with  $K=4$  offers a more precise view of the genetic structure of our populations across the northern Mediterranean basin (**Figure 4**). In this scenario, the blue cluster is predominantly found in the populations of southeastern France (as well as in the population of southern Corsica), and the red cluster in the Spanish populations. The yellow cluster is well represented in almost all the localities, particularly in southeastern France. The green cluster is exclusively dominant in the populations of Northern Corsica.

In Spain, we can notice a greater admixture in the port populations with a much more dominant yellow cluster compared to the non-port populations. The contrast is also marked with the port of Sète in France, where there is a much more pronounced genetic diversity compared to the two nearby forest populations (Gignac and Montarnaud), which are composed 100% of the blue cluster.

Finally, we can note genetic variability among individuals within the following populations: Ports of Castello, Ports of Sagunt, Port of Valencia, Port of Bordeaux, Port of Sète, Port of Fos sur mer, Ile de Porquerolles, Fos sur mer (outside), Forest of Menton, Lyon Saint Exupéry, Mestre, and Bastia (outside).





**Figure 4** - Genetic structure of *Xylotrechus stebbingi* individuals, and the relative admixture per individuals and populations for K=4 scenario. The pie charts represent the proportion of variants within each population assigned to each of the four identified clusters. The number next to each pie chart corresponds to the associated bar plot. The bar plots represent the admixture of each individual divided by populations. Each bar corresponds to an individual and shows the proportion of the genotype assigned to each of the four clusters. Black points represent forest or outside port locations. Blue points represent inside port locations.

### III.5 Phylogenetic reconstruction

The phylogenetic relationships among the 88 individuals of *Xylotrechus stebbingi* are shown in **Figure 5**. The phylogenetic tree reveals a distribution of individuals into nine main clusters. Clusters 1, 2, and 3 represent individuals predominantly represented by the red cluster in Figure 4, clusters 4, 5, and 6 represent individuals over-represented by the yellow or green cluster, while the last clusters 7, 8, and 9 represent individuals predominantly represented by the blue cluster. Within clusters 2 and 3 (including Spanish and French individuals respectively), it is observed that individuals are not distributed within the tree according to the type of environment from which they were collected (ports, outside, and forest). Individuals with non-concordant geographical origins are found within certain clusters, notably a French individual and a Swiss individual among the Spanish individuals (clusters 1 and 3), as well as Spanish individuals among French, Swiss, and Corsican individuals (cluster 5).



**Figure 5** - Neighbor-joining phylogenetic tree estimated with RAxML for the 88 *X. stebbingi* specimens using a dataset of 74,263 SNPs. The labels at the end of branches are colored according to the origin of the sample (red: Spain, dark blue: France, yellow: Switzerland, light blue: Greece, light green: Corsica, dark green: Italy). Labels on branches are bootstrap values > 50%.

## IV. Discussion

The genetic analysis of intercepted specimens of *X. stebbingii* revealed an unexpectedly phylogeographic structure of this non native species in the Mediterranean Basin. More interestingly, our results confirmed that port areas could be identified as major entry points for this species.

*Xylotrechus stebbingii* was first discovered in Italy and Switzerland at the beginning of its invasion in Europe, represented mainly by the yellow cluster. One hypothesis is that this genetic cluster represents an ancestral invasive cluster in Europe, that extended in the southeastern part of France in the 90s, limited to the triangular area bounded by Evian in the north, Montpellier in the west, and Menton in the east (see box 1). The second genetic cluster, represented by the blue color, is mainly found in the southwestern part of the French Riviera. It is possible that this second cluster results of second introduction event, from a different origin than the first one (yellow cluster), from a port in the southwest of France. Moreover, with the K=4 scenario, the blue cluster appears even more exclusive to this geographic area than with the K=2 scenario. With K=4 scenario, the red cluster seems much more specific to Spanish populations. The genetic structure suggests another introduction events of *Xylotrechus stebbingii* into Spanish territory rather than the spread of populations from the southwest of France, especially since the Pyrenees mountain range is a geographical barrier that could greatly slow down or even prevent the expansion of populations from southwestern France into Spain. Finally, the 4th genetic cluster, represented by the green color, is primarily present in the populations of northern Corsica but absent in the population of southern Corsica. The green haplotype might originate from the west coast of Italy. Indeed, the port of Bastia has seven maritime lines, three coming from southeastern France (Marseille, Toulon, and Nice) and four from northeastern Italy (Savona, Genoa, Livorno, and Piombino) (<http://www.bastia.port.fr/>). Sampling populations of *Xylotrechus stebbingii* in this region of Italy could help confirm or refute this hypothesis. The Corsican population captured in the forest of Coti-Chiavari would probably come from a new recent introduction event, from the southwest of the French Riviera, given its genetic structure similar to the French populations of this area.

Our results also reveal greater genetic variability in port areas, compared to neighboring non-port populations. This phenomenon is particularly visible in the Spanish port populations where the red and yellow clusters dominate, compared to other Spanish populations where only the red cluster is dominant. These results also support the scenario of recurrent new introductions in Spanish ports rather than the spread of French populations to Spain. Regarding the ports in the south of France, the phenomenon is less marked than in the Spanish case, but the genetic variability among individuals within the French ports may also be the result of multiple introductions from different origins. Such genetic variability is indeed not as marked in the populations surrounding the two ports in the southwest of France, with the exception of the 'fos-sur-mer out' population where genetic differences between individuals in this population are also observed. This could be due to the spread of individuals outside the port, thus mixing with other individuals.

The phylogenetic analysis of intercepted specimens indicates the probable presence of transfers of individuals between different localities, especially between the Spanish and French individuals. Furthermore, the Corsican individuals captured in the forest at Coti-Chiavari appear to have a common ancestor with the individuals present on the French Riviera, reinforcing our hypothesis of a probable second introduction on the Corsican territory, different from that observed with the populations of northern Corsica. It would be interesting to carry out sampling in the native areas and other introduction zones in order to refine the invasion routes and sources.

## V. Conclusion

Our study confirmed that the invasion dynamics of *Xylotrechus stebbingi* is not a scenario of a single introduction that then spread all around the Mediterranean basin. *Xylotrechus stebbingi* can be considered as a species easily transported and relocated through maritime transport and thus introduced into multiple localities. So far, to our knowledge, its invasion zone is limited to the Mediterranean coast, but new detections over the years show that this highly polyphagous species is rapidly expanding its range further north. Furthermore, it is possible that *Xylotrechus stebbingi* could be transported via maritime transport beyond the Mediterranean area and thus colonize

new territories, as seen with the detections of *Xylotrechus stebbingi* in the port of Bordeaux. This observation made about *Xylotrechus stebbingi* is also applicable to *Xylotrechus chinensis*, whose multiple introductions in France and Europe are also due to numerous maritime transports. In light of our results, we can suggest increased surveillance of wood imports/exports where the larvae of these beetles hide, and to set attractive traps in risk areas (Roques et al., 2023). The use of such traps in non-invaded areas would allow for early detection of new introductions and enable rapid implementation of eradication measures. In already invaded areas, the use of such traps could help detect potential new introductions of different geographic origins, which is crucial information since the origin of the populations plays an important role in the behavior and ecological preferences of individuals (Urvois et al., 2022). So far, *Xylotrechus stebbingi* does not cause particular damage in the majority of the localities it has colonized. However, in Tunisia, *Xylotrechus stebbingi* attacks olive trees that have suffered from prolonged periods of drought (Braud et al., 2002). With climate change and the rising temperatures it brings, it is likely that one day *Xylotrechus stebbingi* will attack other tree species in various localities not currently affected by this problem.



---

## Discussion et perspectives

---

Les invasions biologiques d'insectes xylophages sont devenues un problème mondial majeur, exacerbé par le réchauffement climatique, le tourisme mais aussi et surtout les échanges commerciaux. Ces insectes représentent une menace importante pouvant générer d'importants dommages écologiques et économiques en détruisant les forêts, réduisant la biodiversité et impactant les industries forestières. L'identification rapide des insectes invasifs est cruciale pour une gestion efficace des invasions biologiques. Une action prompte permet d'intervenir avant que ces espèces ne se diffusent largement et s'installent dans de nouveaux écosystèmes. Détecter tôt ces insectes donne une fenêtre d'opportunité pour mettre en œuvre des stratégies de contrôle ou d'éradication, réduisant ainsi significativement les impacts écologiques et économiques. Plus l'intervention est rapide, plus les chances de limiter la propagation et d'atténuer les dommages sont élevées. Cela souligne l'importance d'une surveillance constante, d'une capacité de réaction rapide et de la collaboration entre les chercheurs, les gestionnaires forestiers et les autorités de régulation pour protéger nos écosystèmes et ressources forestières contre les effets dévastateurs des espèces invasives d'insectes xylophages.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse permettent de mettre en lumière l'utilisation d'outils innovants basés sur l'ADN pour la détection et l'identification d'insectes invasifs. En effet, les résultats obtenus dans le chapitre 2 confirment qu'il est possible d'utiliser un mini séquenceur portable, le MinION d'Oxford Nanopore, pour des analyses de métabarcoding en temps réel. Nous avons montré que le MinION est capable de détecter des espèces faiblement représentées dans les pièges (comme pourrait l'être une espèce exotique, piégée sur un nouveau territoire), et cela, même lorsque des espèces sœurs sont présentes dans le même piège. Nos résultats ont également confirmé l'importance des méthodes de capture utilisées dans les campagnes de piégeage. En particulier, le propylène glycol dilué à 50% dans les tubes collecteurs des pièges, offre une moindre protection de l'ADN des échantillons que les pièges sans agents conservateurs (pièges à sec avec seulement des filets



imprégnés d'insecticides), rendant l'identification génétique des individus dégradés complexe voire impossible.

Un second levier important concerne l'identification correcte des échantillons analysés par approches moléculaires. Un des objectifs de la thèse a permis la construction d'une base de données de barcodes de référence des cérambycides capturés sur le territoire Européen (chapitre 3). Cette base de données, qui reste toutefois à compléter, couvre 79% des espèces ciblées, tout en donnant une vue d'ensemble de la diversité génétique de diverses espèces de cérambycides. Cette étude a permis de mettre en lumière les lacunes et les problèmes rencontrés dans les bases de données existantes, qui sont de nature à biaiser les résultats d'identification basées sur l'ADN. Cette base apparaît comme essentielle dans un contexte de biosurveillance, en raison de la priorité accordée à la qualité des données. En mettant l'accent sur la précision et la fiabilité des informations recueillies, cette base de données permettra d'identifier rapidement et précisément les espèces de cérambycides capturées lors de campagnes de piégeage effectuées sur le territoire européen.

Finalement, dans le chapitre 4, nous avons pu, à l'aide d'une approche RADseq, étudier la structure génétique de multiples populations non natives de *Xylotrechus stebbingi*. Cet insecte est introduit sur le territoire européen depuis 1986 et connaît depuis cette date une expansion constante sur tout le pourtour méditerranéen. L'objectif de notre étude étant de mieux comprendre comment, depuis 1986 cet insecte à réussi à se disperser dans tout le bassin méditerranéen. Nos résultats ont montré que la dispersion de *Xylotrechus stebbingi* était accélérée par le déplacement d'individus dans de nouvelles aires géographiques via le transport maritime. Nous alertons sur l'importance de mettre en place des procédures pour limiter au maximum le transport involontaire de *Xylotrechus stebbingi* au sein de bateaux afin de ralentir son expansion qui pourrait à l'avenir s'étendre au-delà du bassin méditerranéen.

## **I. Contextualisation et interprétation des résultats**

### **I.1 Capture et conservation des insectes : optimiser la qualité de l'ADN**

La biosurveillance d'insectes invasifs basée sur des approches génomiques nécessite des moyens de conservation efficaces afin de prévenir la dégradation de l'ADN des spécimens capturés et permettre ainsi l'identification des taxons présents dans un contenu de pièges (Rees et al. 2014, Strickler et al. 2015, Barnes et Turner 2016). Les échantillons utilisés dans cette thèse ont été prélevés dans des conditions différentes (types de pièges, collecteurs, dates et lieux de prélèvement, etc...) amenant à des conditions de piégeage et de conservation hétérogènes entre les différents individus. A l'issue de ces trois années de travail, j'ai pu observer un grand nombre d'échantillons pour lesquels les amplifications par PCR se sont révélées être très compliquées voire impossibles à réaliser (avec un taux d'échec que j'estimerai proche de 50%), probablement en raison de la qualité de l'ADN des échantillons (qui a été systématiquement dosée au spectrophotomètre Nanodrop).

Les pièges utilisés lors de campagnes de biosurveillance restent sur le terrain pendant de longues périodes (généralement plusieurs semaines) afin d'obtenir un large spectre de la communauté d'insectes locale. Les durées peuvent encore augmenter lorsque les pièges sont déposés dans des zones difficiles d'accès (Aristophanous, 2010). Des enzymes exonucléases (Barnes et al., 2014), des facteurs chimiques tels que l'hydrolyse provoquée par les fluctuations de pH (Strickler et al., 2015 ; Tsuji et al., 2017) vont, au fil des jours, dégrader l'ADN des individus capturés. Les conditions météorologiques peuvent de plus avoir un impact négatif sur la conservation de l'ADN, les fortes chaleurs en été par exemple induisent une augmentation des exonucléases accélérant ainsi le processus de dégradation de l'ADN (Barnes et al., 2014 ; Strickler et al., 2015 ; Kasai et al., 2020). De fortes précipitations peuvent également dégrader l'ADN des individus capturés. En effet, le liquide de conservation utilisé se retrouve ainsi dilué à cause de l'eau de pluie s'infiltrant dans les pièges et compromettant ainsi la conservation de la morphologie des individus (Costa-Silva et al., 2019) tout comme de l'ADN.

Les résultats obtenus dans le chapitre 2 ouvrent des perspectives quant à la méthode à utiliser pour la capture et la conservation des échantillons, et ainsi maximiser le taux de réussite de ces approches génomiques. Nous avons pu constater que les individus tués et conservés à sec à l'aide d'un grillage imprégné d'insecticide  $\alpha$ -cyperméthrine dans les collecteurs de pièges présentaient des taux de détection supérieurs à ceux des échantillons conservés à l'aide d'un liquide de conservation à base de propylène glycol dilué. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans l'étude de Ballare et al., 2019 où des spécimens (hyménoptères) collectés dans des pièges au propylène glycol produisaient des assemblages ddRAD de moindre qualité que les spécimens capturés avec des pièges sans conservateur. Cependant, des études antérieures rapportent que le propylène glycol est un conservateur d'ADN efficace pour des études basées sur des marqueurs : Dillon et al., 1996; Rubink et al., 2003 (sur des hyménoptères) ou encore Ferro & Park, 2013 (sur des coléoptères).

Les collectes d'échantillons destinés à des analyses barcoding ou métabarcoding sont généralement stockés dans l'éthanol (Hajibabaei et al. 2012, Steininger et al. 2015, Minamoto et al. 2016, Koziol et al. 2019, Sales et al. 2019) qui inhibe la dégradation de l'ADN, mais qui présente cependant plusieurs limites. Tout d'abord la conservation optimale des individus n'est assurée qu'à une concentration de 95-100%, où par ailleurs les individus deviennent cassants et donc plus fragiles. De plus, c'est un produit inflammable, cher, volatil, et qui peut potentiellement inhiber la PCR (Marquina et al., 2021; Steininger et al. 2015; Nagy, 2010; Schrader et al. 2012). Certains autres conservateurs, tels que l'éthylène glycol et le diméthylsulfoxyde, ne conviennent pas à la préservation de l'ADN (Vink et al., 2005 ; Moreau et al., 2013), et le formaldéhyde doit être évité car il dégrade activement l'ADN bien qu'une étude récente à montré que l'on pouvait améliorer l'extraction d'ADN de spécimens conservés dans du formaldéhyde (Hahn et al., 2024). Concernant le transport des échantillons, la température ambiante ne convient pas pour un stockage prolongé. Les échantillons peuvent être transportés à l'aide d'une glacière ou de neige carbonique jusqu'au laboratoire, pour ensuite y être conservés en congélateur à des températures à  $-20$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  (Piper et al., 2019).

## I.2 Métabarcoding et séquençage haut débit MinION : une technologie portable et en temps réel

Comme nous l'avons vu, dans un contexte de biosurveillance, il est primordial de pouvoir identifier rapidement et précisément les individus capturés afin de pouvoir réagir en conséquence. Le MinION d'Oxford Nanopore offre une solution rentable et accessible pour l'évaluation de la biodiversité aux chercheurs du monde entier tout en offrant la possibilité de générer directement des informations de séquence sur le terrain (Krehenwinkel et al., 2019). Un des points faibles de cette nouvelle technologie est le taux d'erreurs de séquençage (Piper et al., 2019). Nos résultats ont cependant montré une efficacité similaire à la technologie de séquençage Miseq d'Illumina, technologie jusque-là couramment utilisée pour effectuer des analyses métabarcoding, notamment grâce à sa haute précision de séquençage.

Les approches métabarcoding pour la biosurveillance doivent permettre la détection d'espèces minoritaires (car non natives). L'hétérogénéité taxonomique d'un piège peut limiter l'obtention d'une estimation précise de la composition de la communauté (Deiner et al., 2015 ; Zinger et al., 2019). Bien que nous ayons appliqué des conditions « extrêmes », notamment lorsque nous cherchions à tester la capacité du MinION à détecter des espèces minoritaires dans les pièges, nous avons toujours réussi à identifier les espèces ciblées. Toutefois, nous nous sommes focalisés uniquement sur des mélanges de Coléoptères appartenant à l'unique famille des Cérambycides. Il sera nécessaire d'effectuer des tests sur d'autres groupes taxonomiques et sur d'autres types de pièges qui conduiraient à des échantillons plus abondants et plus hétérogènes, avec une diversité taxonomique plus élevée. Certains auteurs ont proposé de procéder préalablement à un tri des individus selon leur taille, et ainsi isoler les espèces les plus grosses, libérant plus d'ADN, des plus petites libérant moins d'ADN (Deagle et al., 2019). De la même manière, l'ADN peut être extrait à partir des pattes des plus gros individus, tandis que pour les individus plus petits, le corps entier pourrait être utilisé (Ji et al., 2013). L'inconvénient de ces approches est qu'elles sont particulièrement chronophages (Liu et al., 2020), c'est pourquoi je conseillerais d'appliquer ces approches uniquement dans les cas extrêmes où l'on constate des contenus de pièges contenant à la fois un nombre particulièrement

important d'individus avec en plus une diversité taxonomique et morphologique très importante.

Le choix du marqueur moléculaire et de la taille de l'amplicon sont des paramètres importants à considérer lors d'analyses métabarcoding. Je conseillerais de favoriser l'utilisation d'un amplicon de « petite » taille. De tels amplicons permettent une amplification simplifiée de l'ADN dégradé. De plus, la littérature montre qu'un fragment barcode compris entre une taille de 135 et 250 pb permet de distinguer de manière fiable la plupart des espèces animales (Hajibabaei et al., 2006 ; Fang et al., 2008). Nos résultats du chapitre 2 corroborent ces observations avec l'utilisation du fragment de 254 pb avec le couple d'amorces fwhF2/fwhR2n qui a permis d'obtenir un nombre de détections plus élevé qu'avec un couple d'amorce générant un amplicon de 458 pb (BF3/BR2). L'inconvénient des amorces de plus petite taille est qu'elles sont moins spécifiques, avec un risque d'amplification de séquences d'ADN d'organismes non cibles (Brown et al., 2016).

Une autre limitation du métabarcoding est sa capacité à estimer de manière fiable l'abondance des espèces présentes dans les échantillons, c'est-à-dire dans notre cas estimer combien d'individus composent un taxon dans notre piège (Lamb et al., 2019). Il existe en effet de nombreuses preuves que la relation entre la véritable composition de l'ADN contenu dans un échantillon et les reads provenant du séquenceur est loin d'être simple et ce chez de nombreux taxons (Shelton et al. 2023) dont les arthropodes (Krehenwinkel et al. 2017). Cette limitation reste cependant moins problématique dans un contexte de biosurveillance que dans un contexte d'évaluation de la biodiversité par exemple, où l'aspect quantitatif des espèces est un paramètre important à prendre en compte.

### **I.3 Les bases de données : piliers des analyses moléculaires**

Une base de données complète avec des séquences ADN de haute qualité, construite à partir de spécimens correctement identifiés, bien documentés et vérifiés, est essentielle pour effectuer des analyses barcoding ou métabarcoding fiables (Weigand et al., 2019). Actuellement, les bases de données disponibles sont encore loin d'être exhaustives et un grand nombre de taxons ne disposent pas encore de

barcodes associés (Elbrecht et al. 2017 ; Weigand et al. 2019). De plus, il existe de très nombreuses erreurs dans les bases.

Des problèmes récurrents concernent l'identification des spécimens (et en particulier des larves) dépendante de l'expertise taxonomique des identificateurs. Ces erreurs d'identifications sont à l'origine de nombreuses discordances entre la séquence moléculaire déposée et le nom taxonomique attribué au spécimen à partir duquel elle a vraisemblablement été obtenue (Piemontese et al. 2020).

Des cas de synonymie (par ex. l'espèce *Arhopalus syriacus* également retrouvée sous le nom de *Cephalocrius syriacus*) complexifient les données intégrées dans les bases et aboutissent à des confusions, en identifiant deux espèces distinctes alors qu'il s'agit en réalité d'une seule et même espèce. La même problématique est observée lors de la présence de complexes d'espèces.

Certaines espèces décrites dans les bases de données montrent des cas de paraphylie, comme nous avons pu le montrer dans la reconstruction phylogénétique des espèces de Cérambycides au chapitre 3. Ce phénomène est généralement causé par des cas d'introggression passées dues à l'hybridation, une divergence récente ou par des pseudogènes (Jordal and Kambestad 2014).

Enfin, les informations associées aux dépôts des séquences sur les bases peuvent également être incomplètes. Par exemple, des métadonnées manquantes ou erronées sont fréquentes et peuvent concerner la photo du voucher, les coordonnées géographiques, la date de capture de l'échantillon, la méthode de capture utilisée, l'absence d'électrophorégrammes, etc. (Piemontese et al. 2020).

Afin de limiter au maximum ces différents biais qui ont un impact important sur la fiabilité des résultats des analyses génétiques, les bases de données nécessitent des normes et un contrôle de qualité plus strict. Des études ont également montré qu'un échantillonnage géographiquement étendu est un facteur clé pour créer des bases de données complètes (Bergsten et al. 2012). De plus, les taxonomistes et biologistes moléculaires devraient se réunir pour discuter et tenter de résoudre les cas

problématiques, d'autant plus que l'expertise taxonomique traditionnelle se fait de plus en plus rare (Elbrecht et al. 2017).

## I.4 Outils génomiques pour le traçage des invasifs

L'utilisation de marqueurs plus polymorphes par l'approche RADseq (chapitre 4), couplés à des échantillonnages dans les zones d'entrée des invasifs ainsi que des zones environnantes, permet de préciser la structure génétique des populations à fine échelle et donc de tester la perméabilité des zones à risques aux différentes voies d'entrées en Europe.

## II. Perspectives : vers des détections de plus en plus innovantes ?

### II.1 Intelligence artificielle et apprentissage automatique

Les méthodes d'apprentissage automatique pourraient être utilisées pour semi-automatiser l'identification des espèces et estimer la biomasse des spécimens (Ärje et al. 2020). Les méthodes d'apprentissage automatique peuvent également être utilisées pour pré-trier les échantillons afin de réduire les efforts d'identification moléculaire (Ärje et al. 2020). Plusieurs systèmes d'identification informatisés pour la biosurveillance ont déjà été proposés, par exemple Liu et al. (2022) ont utilisé des signaux acoustiques pour détecter la présence de larves de *Semanotus bifasciatus* (Cerambycidae). L'apprentissage automatique peut en effet extraire des caractères morphologiques subtils des insectes, qui sont ensuite utilisés pour classer les espèces décrites et identifier les espèces non décrites (Badirli et al. 2023). En effet, d'autres auteurs ont pu classer les abeilles, les papillons, les mouches et les guêpes en fonction des caractéristiques des ailes (Le-Qing and Zhen 2012, Feng et al. 2016, Perre et al. 2016).

Cependant, certaines espèces d'insectes sont rares ou non encore décrites et il est donc impossible d'obtenir des images de ces espèces (Badirli et al. 2023). Bien que les modèles de classification basés sur l'image ne puissent pas encore rivaliser

avec les méthodes basées sur l'ADN, des études récentes ont démontré que les approches d'apprentissage automatique pour l'identification taxonomique basée sur l'image pourraient à terme atteindre le niveau de précision d'un expert humain (Milošević et al., 2020 ; Valan et al., 2019). Le barcoding et le métabarcoding pourraient contribuer à affiner la validité de l'identification des espèces, augmentant ainsi la précision des modèles pour compléter l'approche par intelligence artificielle (Milošević et al. 2020).

## II.2 L'ADN environnemental (eDNA) et extractions non-destructrices

Bien que le métabarcoding ait amélioré l'efficacité du barcoding classique en permettant de séquencer plusieurs échantillons en même temps et en réduisant considérablement le coût d'analyse (Zizka et al. 2019), un des obstacles à l'utilisation du métabarcoding dans un contexte de biosurveillance est l'incapacité à valider les identifications / détections faites à l'aide des spécimens utilisés pour effectuer l'analyse en raison des approches d'extractions d'ADN généralement destructrices. En effet, quand des échantillons de piégeage d'insectes sont analysés pour une analyse métabarcoding, les insectes sont en général broyés entièrement. Cette technique pose une problématique importante : Comment confirmer une identification basée sur l'ADN lorsqu'un doute subsiste ? Les insectes d'origine étant complètement broyés, ils ne peuvent plus être utilisés pour être identifiés morphologiquement afin de confirmer une identification douteuse. Une solution serait de n'utiliser qu'une partie du corps des insectes (une patte ou une antenne par exemple) mais cette approche reste chronophage.

Pour remédier à certaines de ces limitations, l'ADN environnemental (ADNe) commence à être utilisé dans certaines études afin de limiter l'utilisation des organismes capturés pour conserver leur intégrité morphologique (Mächler et al. 2014; Fernández et al. 2018). L'ADN environnemental fait référence à l'ADN collecté dans l'environnement (par exemple l'eau, le sol ou l'air) que l'on retrouve sous forme de cellules cutanées libérées dans le milieu, de matériel reproductif, d'excrétion ou encore d'organismes en décomposition (Taberlet et al. 2012).



Des études récentes ont tenté d'utiliser des méthodes non-destructives basées sur l'ADNe où l'ADN est extrait du tampon d'extraction dans lequel les spécimens ont baigné (Batovska et al. 2021; Carew et al. 2018 ; Nielsen et al. 2019) ou à partir de l'éthanol utilisé pour les conserver (Martins et al. 2019 ; Zizka et al. 2019). Certaines études montrent que de telles approches peuvent être efficaces sur certains groupes taxonomiques à corps mous. En revanche, sur d'autres groupes possédant un exosquelette plus sclérotinisés, comme les coléoptères, les résultats restent pour le moment bien plus mitigés (Sire et al. 2023 ; Marquina et al. 2019 ; Carew et al. 2018 ; Zizka et al. 2019). Des protocoles plus récents ont remplacé l'alcool par des solutions saturées en sels qui présentent plusieurs avantages : un coût réduit, moins d'espace de stockage nécessaire, non toxique pour les humains, moins de contraintes réglementaires pour les laboratoires, non inflammable et un taux d'évaporation plus faible que l'éthanol permettant une utilisation plus longue sur le terrain (Young et al., 2021). Les solutions saturées en sels sont également efficaces pour conserver les structures morphologiques des individus capturés ainsi que pour effectuer des analyses métabarcoding basées sur l'ADN environnemental (Williams et al., 2016).

A l'avenir, grâce à l'extraction non-destructive basée sur l'ADNe et la conservation des spécimens originaux dans leur totalité, il sera possible de résoudre des incohérences entre les identifications moléculaires et morphologiques, en permettant des consultations au sein de collections lorsque cela s'avère nécessaire (Martoni et al. 2019) (Suaste-Dzul et al. 2019). Bien que les avis soient mitigés, certaines études indiquent que le métabarcoding de l'ADNe dans un contexte de biosurveillance n'est, pour le moment, pas un substitut suffisamment efficace au métabarcoding classique car on retrouve trop de différences en termes de détection d'espèces lorsque l'on compare les deux méthodes sur un même échantillon (Gleason et al. 2021 ; Persaud et al. 2021). Des études sont donc encore nécessaires sur l'utilisation de l'ADNe afin de garantir son efficacité. Cependant il est clair que le métabarcoding basé sur l'ADN environnemental présente de nombreuses opportunités pour la recherche future (Persaud et al. 2021) en l'intégrant dans le cadre de protocoles d'identification des espèces capturées lors de programmes de biosurveillance (Milián-García et al. 2021).

### III. Conclusion

Il me semble peu probable que les approches d'identification des insectes basées sur l'ADN soient vouées à remplacer complètement les approches classiques basées sur l'analyse morphologique. En effet, nous avons vu que de nombreuses espèces ne sont pour le moment pas encore renseignées dans les bases de données et que les erreurs présentes dans ces mêmes bases peuvent amener à des erreurs d'identifications. L'expertise d'entomologistes est donc nécessaire afin de permettre l'ajout de données fiables dans les bases de données ou bien pour confirmer des identifications suspectes basées sur l'ADN potentiellement dues à des erreurs dans les bases de données. De plus il me semble, qu'en cas de détection d'une espèce exotique dans un piège via une approche basée sur l'ADN, qu'il soit nécessaire de confirmer l'identification par une approche morphologique du voucher afin d'éviter une erreur d'identification et de déclencher des mesures de contrôle ou d'éradication fortuites. Finalement, l'utilisation d'approches génomiques me semble intéressante en cas d'un nombre d'échantillons importants à identifier. Dans le cas où le nombre d'individus est moins important, faire appel aux compétences d'experts en taxonomie serait selon moi une approche plus rentable.

Nous pouvons cependant imaginer à l'avenir l'utilisation d'approches multidisciplinaires permettant ainsi de pallier les limites des approches individuelles. Ainsi, l'identification morphologique pourrait être combinée à des approches moléculaires et à des approches basées sur l'intelligence artificielle. Cette complémentarité entre l'observation morphologique, l'analyse génétique et le traitement informatique avancé pourrait créer un système robuste et flexible pour la détection et l'identification des insectes invasifs.

# Références

- Abeynayake, S. W., Fiorito, S., Dinsdale, A., Whattam, M., Crowe, B., Sparks, K., Campbell, P. R., & Gambley, C. (2021). A Rapid and Cost-Effective Identification of Invertebrate Pests at the Borders Using MinION Sequencing of DNA Barcodes. *Genes*, 12(8), 1138. <https://doi.org/10.3390/genes12081138>
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., & Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1), 134–147. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12849>
- Allison, J. D., McKenney, J. L., Millar, J. G., McElfresh, J. S., Mitchell, R. F., & Hanks, L. M. (2012). Response of the Woodborers *Monochamus carolinensis* and *Monochamus titillator* (Coleoptera: Cerambycidae) to Known Cerambycid Pheromones in the Presence and Absence of the Host Plant Volatile  $\alpha$ -Pinene. *Environmental Entomology*, 41(6), 1587–1596. <https://doi.org/10.1603/EN12185>
- Allison, J., Strom, B., Sweeney, J., & Mayo, P. (2019). Trap deployment along linear transects perpendicular to forest edges: impact on capture of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Pest Science*, 92(1), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1008-7>
- Álvarez, G., Gallego, D., Hall, D. R., Jactel, H., & Pajares, J. A. (2016). Combining pheromone and kairomones for effective trapping of the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Applied Entomology*, 140(1–2), 58–71. <https://doi.org/10.1111/jen.12297>
- Andújar, C., Arribas, P., Gray, C., Bruce, C., Woodward, G., Yu, D. W., & Vogler, A. P. (2018). Metabarcoding of freshwater invertebrates to detect the effects of a pesticide spill. *Molecular Ecology*, 27(1), 146–166. <https://doi.org/10.1111/mec.14410>
- Andújar, C., Arribas, P., Ruzicka, F., Crampton-Platt, A., Timmermans, M. J. T. N., & Vogler, A. P. (2015). Phylogenetic community ecology of soil biodiversity using mitochondrial metagenomics. *Molecular Ecology*, 24(14), 3603–3617. <https://doi.org/10.1111/mec.13195>
- Anon (2020) World data atlas. <https://knoema.com/atlas/Uruguay/topics/Land-Use/Area/Forest-area>
- Arbes, S. J., Gergen, P. J., Elliott, L., & Zeldin, D. C. (2005). Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.05.017>

- Aristophanous, M. (2010). Does your preservative preserve? A comparison of the efficacy of some pitfall trap solutions in preserving the internal reproductive organs of dung beetles. *ZOOKEYS*, *34*, 1–16. <https://doi.org/10.3897/zookeys.34.215>
- Ärje, J., Melvad, C., Jeppesen, M. R., Madsen, S. A., Raitoharju, J., Rasmussen, M. S., Iosifidis, A., Tirronen, V., Gabbouj, M., Meissner, K., & Høye, T. T. (2020). Automatic image-based identification and biomass estimation of invertebrates. *Methods in Ecology and Evolution*, *11*(8), 922–931. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13428>
- Arnesen, C. H., & Rosell, F. (2021). Pest detection dogs for wood boring longhorn beetles. *Scientific Reports*, *11*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96450-0>
- Arulandhu, A. J., Staats, M., Hagelaar, R., Voorhuijzen, M. M., Prins, T. W., Scholtens, I., Costessi, A., Duijsings, D., Rechenmann, F., Gaspar, F. B., Barreto Crespo, M. T., Holst-Jensen, A., Birck, M., Burns, M., Haynes, E., Hochegger, R., Klingl, A., Lundberg, L., Natale, C., ... Kok, E. (2017). Development and validation of a multi-locus DNA metabarcoding method to identify endangered species in complex samples. *GigaScience*, *6*(10). <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix080>
- Ashfaq, M., & Hebert, P. D. N. (2016). DNA barcodes for bio-surveillance: regulated and economically important arthropod plant pests. *Genome*, *59*(11), 933–945. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0024>
- Aukema, J. E., McCullough, D. G., Von Holle, B., Liebhold, A. M., Britton, K., & Frankel, S. J. (2010). Historical Accumulation of Nonindigenous Forest Pests in the Continental United States. *BioScience*, *60*(11), 886–897. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.11.5>
- Badirli, S., Picard, C. J., Mohler, G., Richert, F., Akata, Z., & Dundar, M. (2023). Classifying the unknown: Insect identification with deep hierarchical Bayesian learning. *Methods in Ecology and Evolution*, *14*(6), 1515–1530. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.14104>
- Ball, S. L., & Armstrong, K. F. (2006). DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research*, *36*(2), 337–350. <https://doi.org/10.1139/x05-276>
- Ballare, K. M., Pope, N. S., Castilla, A. R., Cusser, S., Metz, R. P., & Jha, S. (2019). Utilizing field collected insects for next generation sequencing: Effects of sampling, storage, and DNA extraction methods. *Ecology and Evolution*, *9*(24), 13690–13705. <https://doi.org/10.1002/ece3.5756>
- Barbour, J. D., Millar, J. G., Rodstein, J., Ray, A. M., Alston, D. G., Rejzek, M., Dutcher, J. D., & Hanks, L. M. (2011). Synthetic 3,5-Dimethyldodecanoic Acid Serves as a General Attractant for Multiple Species of *Prionus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *104*(3), 588–593. <https://doi.org/10.1603/AN10182>

- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83(3), 481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- Batovska, J., Piper, A. M., Valenzuela, I., Cunningham, J. P., & Blacket, M. J. (2021). Developing a non-destructive metabarcoding protocol for detection of pest insects in bulk trap catches. *Scientific Reports*, 11(1), 7946. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85855-6>
- Bellard, C., Cassey, P., & Blackburn, T. M. (2016). Alien species as a driver of recent extinctions. *Biology Letters*, 12(2), 20150623. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0623>
- Beng, K. C., Tomlinson, K. W., Shen, X. H., Surget-Groba, Y., Hughes, A. C., Corlett, R. T., & Slik, J. W. F. (2016). The utility of DNA metabarcoding for studying the response of arthropod diversity and composition to land-use change in the tropics. *Scientific Reports*, 6(1), 24965. <https://doi.org/10.1038/srep24965>
- Bengtsson-Palme, J., Boulund, F., Edström, R., Feizi, A., Johnning, A., Jonsson, V. A., Karlsson, F. H., Pal, C., Pereira, M. B., Rehammar, A., Sanchez, J., Sanli, K., & Thorell, K. (2016). Strategies to improve usability and preserve accuracy in biological sequence databases. *PROTEOMICS*, 16(18), 2454–2460. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600034>
- Bensasson, D., Zhang, D.-X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(6), 314–321. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02151-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02151-6)
- Bergsten, J., Bilton, D. T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M. T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G. N., Ribera, I., Nilsson, A. N., Barraclough, T. G., & Vogler, A. P. (2012). The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic Biology*, 61(5), 851–869. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys037>
- Biedermann, P. H. W., Müller, J., Grégoire, J.-C., Gruppe, A., Hagge, J., Hammerbacher, A., Hofstetter, R. W., Kandasamy, D., Kolarik, M., Kostovcik, M., Krokene, P., Sallé, A., Six, D. L., Turrini, T., Vanderpool, D., Wingfield, M. J., & Bässler, C. (2019). Bark Beetle Population Dynamics in the Anthropocene: Challenges and Solutions. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(10), 914–924. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.06.002>

- Birky, C. W. (2001). The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231>
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., Wilson, J. R. U., & Richardson, D. M. (2011a). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(7), 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>
- Bobadoye, B., Torto, B., Fombong, A., Zou, Y., Adlbauer, K., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2019). Evidence of Aggregation–Sex Pheromone Use by Longhorned Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) Species Native to Africa. *Environmental Entomology*, 48(1), 189–192. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy164>
- Boone, C. K., Sweeney, J., Silk, P., Hughes, C., Webster, R. P., Stephen, F., Maclauchlan, L., Bentz, B., Drumont, A., Zhao, B., Berkvens, N., Casteels, H., & Grégoire, J.-C. (2019). Monochamus species from different continents can be effectively detected with the same trapping protocol. *Journal of Pest Science*, 92(1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0954-4>
- Bortolus, A. (2008). Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 37(2), 114–118. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2008\)37\[114:ECITBS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2008)37[114:ECITBS]2.0.CO;2)
- Boykin, L. M., Armstrong, K., Kubatko, L., & De Barro, P. (2012). DNA barcoding invasive insects: database roadblocks. *Invertebrate Systematics*, 26(6), 506. <https://doi.org/10.1071/IS12025>
- Bradshaw, C. J. A., Leroy, B., Bellard, C., Roiz, D., Albert, C., Fournier, A., Barbet-Massin, M., Salles, J.-M., Simard, F., & Courchamp, F. (2016). Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, 7(1), 12986. <https://doi.org/10.1038/ncomms12986>
- Bramanti, B., Stenseth, N. Chr., Walløe, L., & Lei, X. (2016). Plague: A Disease Which Changed the Path of Human Civilization. In R. Yang & A. Anisimov (Eds.), *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective* (Vol. 918, pp. 1–26). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0890-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0890-4_1)
- Brandon-Mong, G.-J., Gan, H.-M., Sing, K.-W., Lee, P.-S., Lim, P.-E., & Wilson, J.-J. (2015). DNA metabarcoding of insects and allies: an evaluation of primers and pipelines. *Bulletin of Entomological Research*, 105(6), 717–727. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000681>
- Brandt, M. I., Trouche, B., Quintric, L., Günther, B., Wincker, P., Poulain, J., & Arnaud-Haond, S. (2021). Bioinformatic pipelines combining denoising and clustering tools allow for more comprehensive prokaryotic and eukaryotic metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 21(6), 1904–1921. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13398>

- Brasier, C. M. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, 57(5), 792–808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x>
- Braud Yoann, Ramos Richard, Cocquempot Christian. Nouvelles observations de *Xylotrechus stebbingi* Gahan, 1906, en Europe et en Afrique du Nord (Col., Cerambycidae). In: Bulletin de la Société entomologique de France, volume 107 (5), décembre 2002. pp. 487-488;
- Braukmann, T. W. A., Ivanova, N. V., Prosser, S. W. J., Elbrecht, V., Steinke, D., Ratnasingham, S., De Waard, J. R., Sones, J. E., Zakharov, E. V., & Hebert, P. D. N. (2019). Metabarcoding a diverse arthropod mock community. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 711–727. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13008>
- Brockhoff, E. G., & Liebhold, A. M. (2017). Ecology of forest insect invasions. *Biological Invasions*, 19(11), 3141–3159. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1514-1>
- Brockhoff, E. G., Bain, J., Kimberley, M., & Knížek, M. (2006). Interception frequency of exotic bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytinae) and relationship with establishment in New Zealand and worldwide. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(2), 289–298. <https://doi.org/10.1139/x05-250>
- Brockhoff, E. G., Jactel, H., Parrotta, J. A., & Ferraz, S. F. B. (2013). Role of eucalypt and other planted forests in biodiversity conservation and the provision of biodiversity-related services. *Forest Ecology and Management*, 301, 43–50. <https://www.fs.usda.gov/research/treesearch/47866>
- Brockhoff, E. G., Jones, D. C., Kimberley, M. O., Suckling, D. M., & Donaldson, T. (2006). Nationwide survey for invasive wood-boring and bark beetles (Coleoptera) using traps baited with pheromones and kairomones. *Forest Ecology and Management*, 228(1), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.02.046>
- Brockhoff, E. G., Kimberley, M., Liebhold, A. M., Haack, R. A., & Cavey, J. F. (2014). Predicting how altering propagule pressure changes establishment rates of biological invaders across species pools. *Ecology*, 95(3), 594–601. <https://doi.org/10.1890/13-0465.1>
- Brown, E. A., Chain, F. J. J., Zhan, A., Maclsaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2016). Early detection of aquatic invaders using metabarcoding reveals a high number of non-indigenous species in Canadian ports. *Diversity and Distributions*, 22(10), 1045–1059. <https://doi.org/10.1111/ddi.12465>
- Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). S PIDER: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 562–565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>
- Buehlmann, U., Bumgardner, M., & Fluharty, T. (2009). Ban on landfilling of wooden pallets in North Carolina: an assessment of recycling and industry capacity.

*Journal of Cleaner Production*, 17(2), 271–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2008.06.002>

- Bush, S. E., Gustafsson, D. R., Tkach, V. V., & Clayton, D. H. (2021). A Misidentification Crisis Plagues Specimen-Based Research: A Case for Guidelines with a Recent Example (Ali et al., 2020). *Journal of Parasitology*, 107(2). <https://doi.org/10.1645/21-4>
- Campbell, M. L., Leonard, K., Primo, C., & Hewitt, C. L. (2018). Marine Biosecurity Crisis Decision-Making: Two Tools to Aid “Go”/“No Go” Decision-Making. *Frontiers in Marine Science*, 5, 331. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00331>
- Carew, M. E., Coleman, R. A., & Hoffmann, A. A. (2018). Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding? *PeerJ*, 6, e4980. <https://doi.org/10.7717/peerj.4980>
- Castro, K. L., Battini, N., Giachetti, C. B., Trovant, B., Abelando, M., Basso, N. G., & Schwindt, E. (2021). Early detection of marine invasive species following the deployment of an artificial reef: Integrating tools to assist the decision-making process. *Journal of Environmental Management*, 297, 113333. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113333>
- Cavaletto, G., Faccoli, M., Marini, L., Spaethe, J., Giannone, F., Moino, S., & Rassati, D. (2021). Exploiting trap color to improve surveys of longhorn beetles. *Journal of Pest Science*, 94(3), 871–883. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01303-w>
- Cavaletto, G., Faccoli, M., Marini, L., Spaethe, J., Magnani, G., & Rassati, D. (2020). Effect of Trap Color on Captures of Bark- and Wood-Boring Beetles (Coleoptera; Buprestidae and Scolytinae) and Associated Predators. *Insects*, 11(11), 749. <https://doi.org/10.3390/insects11110749>
- Chain, F. J. J., Brown, E. A., Maclsaac, H. J., & Cristescu, M. E. (2016). Metabarcoding reveals strong spatial structure and temporal turnover of zooplankton communities among marine and freshwater ports. *Diversity and Distributions*, 22(5), 493–504. <https://doi.org/10.1111/ddi.12427>
- Chown, S. L., Hodgins, K. A., Griffin, P. C., Oakeshott, J. G., Byrne, M., & Hoffmann, A. A. (2015). Biological invasions, climate change and genomics. *Evolutionary Applications*, 8(1), 23–46. <https://doi.org/10.1111/eva.12234>
- Chua, P. Y. S., Bourlat, S. J., Ferguson, C., Korlevic, P., Zhao, L., Ekrem, T., Meier, R., & Lawniczak, M. K. N. (2023). Future of DNA-based insect monitoring. *Trends in Genetics*, 39(7), 531–544. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.012>
- Cocquempot (C.), 2007. - Alien longhorned beetles (Coleoptera Cerambycidae) : Original interceptions and introductions in Europe, mainly in France, and notes about recently imported species. *Redia*, 89 : 35-50.
- Cocquempot, C., Desbles, F., Mouttet, R., & Valladares, L. (2019). *Xylotrechus chinensis* (Chevrolat, 1852), nouvelle espèce invasive pour la France métropolitaine



- (Coleoptera, Cerambycidae, Clytini). *Bulletin de La Société Entomologique de France*, 124(1), 27–32. [https://doi.org/10.32475/bsef\\_2064](https://doi.org/10.32475/bsef_2064)
- Collignon, R. M., Swift, I. P., Zou, Y., McElfresh, J. S., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2016). The Influence of Host Plant Volatiles on the Attraction of Longhorn Beetles to Pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 42(3), 215–229. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0679-x>
- Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1(1), 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
- Cong, Q., Shen, J., Borek, D., Robbins, R. K., Opler, P. A., Otwinowski, Z., & Grishin, N. V. (2017). When COI barcodes deceive: complete genomes reveal introgression in hairstreaks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1848), 20161735. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1735>
- Costa-Silva, V., Grella, M. D., & Thyssen, P. J. (2019). Optimized Pitfall Trap Design for Collecting Terrestrial Insects (Arthropoda: Insecta) in Biodiversity Studies. *Neotropical Entomology*, 48(1), 50–56. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0613-8>
- Coutts, A. (2003). Ships’ sea-chests: an overlooked transfer mechanism for non-indigenous marine species? *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1510–1513. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00292-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00292-3)
- Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.08.001>
- Crystal-Ornelas, R., & Lockwood, J. L. (2020). Cumulative meta-analysis identifies declining but negative impacts of invasive species on richness after 20 yr. *Ecology*, 101(8). <https://doi.org/10.1002/ecy.3082>
- Dang, Y., Wei, K., Wang, X., Duan, J. J., Jennings, D. E., & Poland, T. M. (2022). Introduced plants induce outbreaks of a native pest and facilitate invasion in the plants’ native range: Evidence from the emerald ash borer. *Journal of Ecology*, 110(3), 593–604. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13822>
- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5–6), 416–423. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elq031>
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., & Taberlet, P. (2014). DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 306–323. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12188>

- Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., Kartzinell, T. R., & Eveson, J. P. (2019). Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Molecular Ecology*, 28(2), 391–406. <https://doi.org/10.1111/mec.14734>
- Dean, M. D., & Ballard, J. W. O. (2001). Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98(3), 279–283. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00784.x>
- Decocq, G., Andrieu, E., Brunet, J., Chabrierie, O., De Frenne, P., De Smedt, P., Deconchat, M., Diekmann, M., Ehrmann, S., Giffard, B., Mifsud, E. G., Hansen, K., Hermy, M., Kolb, A., Lenoir, J., Liira, J., Moldan, F., Prokofieva, I., Rosenqvist, L., ... Wulf, M. (2016). Ecosystem Services from Small Forest Patches in Agricultural Landscapes. *Current Forestry Reports*, 2(1), 30–44. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0028-x>
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- deWaard, J. R., Levesque-Beaudin, V., deWaard, S. L., Ivanova, N. V., McKeown, J. T. A., Miskie, R., Naik, S., Perez, K. H. J., Ratnasingham, S., Sobel, C. N., Sones, J. E., Steinke, C., Telfer, A. C., Young, A. D., Young, M. R., Zakharov, E. V., & Hebert, P. D. N. (2019). Expedited assessment of terrestrial arthropod diversity by coupling Malaise traps with DNA barcoding 1. *Genome*, 62(3), 85–95. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0093>
- Diagne, C., Leroy, B., Vaissière, A.-C., Gozlan, R. E., Roiz, D., Jarić, I., Salles, J.-M., Bradshaw, C. J. A., & Courchamp, F. (2021). High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature*, 592(7855), 571–576. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03405-6>
- Dillon, N., Austin, A. D., & Bartowsky, E. (1996). Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5(1), 21–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00036.x>
- DIOLI P. & VIGANO C., 1990. - Presenza in Valtellina di un Cerambicide nuovo per la fauna italiana : *Xylotrechus stebbingi* Gahan, 1906 (Insecta, Coleóptera, Cerambycidae). *Naturalista Valtellinese*, 1 : 7-10.
- Doherty, T. S., Glen, A. S., Nimmo, D. G., Ritchie, E. G., & Dickman, C. R. (2016). Invasive predators and global biodiversity loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11261–11265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602480113>
- Doorenweerd, C., Van Nieukerken, E. J., & Hoare, R. J. B. (2017). Phylogeny, classification and divergence times of pygmy leaf-mining moths (Lepidoptera: Nepticulidae): the earliest lepidopteran radiation on Angiosperms?: Phylogeny and

- divergence times of Nepticulidae. *Systematic Entomology*, 42(1), 267–287. <https://doi.org/10.1111/syen.12212>
- Dopheide, A., Tooman, L. K., Grosser, S., Agabiti, B., Rhode, B., Xie, D., Stevens, M. I., Nelson, N., Buckley, T. R., Drummond, A. J., & Newcomb, R. D. (2019). Estimating the biodiversity of terrestrial invertebrates on a forested island using DNA barcodes and metabarcoding data. *Ecological Applications*, 29(4), 1–14. <https://www.jstor.org/stable/26669248>
- Dopheide, A., Xie, D., Buckley, T. R., Drummond, A. J., & Newcomb, R. D. (2019). Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(1), 120–133. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13086>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eaton, D. A. R., & Overcast, I. (2020). ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(8), 2592–2594. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz966>
- EFSA, Baker Richard, Gilioli, G., Behring Carsten, Candiani Denise, Andrey, G., Tomasz, K., Kinkar Mart, Mosbach-Schulz Olaf, Maria, N. F., Preti Stefano, Chiara, R. M., Siligato Riccardo, Stancanelli Giuseppe, & Sara, T. (2019). *Anoplophora chinensis—Pest Report and Datasheet to support ranking of EU candidate priority pests*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.2785766>
- Egeter, B., Peixoto, S., Brito, J. C., Jarman, S., Puppo, P., & Velo-Antón, G. (2018). Challenges for assessing vertebrate diversity in turbid Saharan water-bodies using environmental DNA. *Genome*, 61(11), 807–814. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0071>
- Egeter, B., Veríssimo, J., Lopes-Lima, M., Chaves, C., Pinto, J., Riccardi, N., Beja, P., & Fonseca, N. A. (2022). Speeding up the detection of invasive bivalve species using environmental DNA: A Nanopore and Illumina sequencing comparison. *Molecular Ecology Resources*, 22(6), 2232–2247. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13610>
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2015). Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLOS ONE*, 10(7), e0130324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00011>
- Elbrecht, V., Braukmann, T. W. A., Ivanova, N. V., Prosser, S. W. J., Hajibabaei, M., Wright, M., Zakharov, E. V., Hebert, P. D. N., & Steinke, D. (2019). Validation of

- COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ*, 7, e7745. <https://doi.org/10.7717/peerj.7745>
- Elbrecht, V., Vamos, E. E., Meissner, K., Aroviita, J., & Leese, F. (2017). Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1265–1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12789>
- Epanchin-Niell, R. S., Brockerhoff, E. G., Kean, J. M., & Turner, J. A. (2014). Designing cost-efficient surveillance for early detection and control of multiple biological invaders. *Ecological Applications*, 24(6), 1258–1274. <https://doi.org/10.1890/13-1331.1>
- Epanchin-Niell, R. S., Haight, R. G., Berc, L., Kean, J. M., & Liebhold, A. M. (2012). Optimal surveillance and eradication of invasive species in heterogeneous landscapes. *Ecology Letters*, 15(8), 803–812. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01800.x>
- Eritja, R., Palmer, J. R. B., Roiz, D., Sanpera-Calbet, I., & Bartumeus, F. (2017). Direct Evidence of Adult *Aedes albopictus* Dispersal by Car. *Scientific Reports*, 7(1), 14399. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12652-5>
- Eschen, R., Holmes, T., Smith, D., Roques, A., Santini, A., & Kenis, M. (2014). Likelihood of establishment of tree pests and diseases based on their worldwide occurrence as determined by hierarchical cluster analysis. *Forest Ecology and Management*, 315, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.12.021>
- Eschen, R., Roques, A., & Santini, A. (2015). Taxonomic dissimilarity in patterns of interception and establishment of alien arthropods, nematodes and pathogens affecting woody plants in Europe. *Diversity and Distributions*, 21(1), 36–45. <https://doi.org/10.1111/ddi.12267>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Essl, F., Bacher, S., Blackburn, T. M., Booy, O., Brundu, G., Brunel, S., Cardoso, A.-C., Eschen, R., Gallardo, B., Galil, B., García-Berthou, E., Genovesi, P., Groom, Q., Harrower, C., Hulme, P. E., Katsanevakis, S., Kenis, M., Kühn, I., Kumschick, S., ... Jeschke, J. M. (2015). Crossing Frontiers in Tackling Pathways of Biological Invasions. *BioScience*, 65(8), 769–782. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv082>
- Essl, F., Biró, K., Brandes, D., Broennimann, O., Bullock, J. M., Chapman, D. S., Chauvel, B., Dullinger, S., Fumanal, B., Guisan, A., Karrer, G., Kazinczi, G., Kueffer, C., Laitung, B., Lavoie, C., Leitner, M., Mang, T., Moser, D., Müller-Schärer, H., ... Follak, S. (2015). Biological Flora of the British Isles: *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Ecology*, 103(4), 1069–1098. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12424>

- Eyre D, Haack RA (2017) Invasive cerambycid pests and biosecurity measures. In: Wang Q (Ed.) *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. CRC Press, Boca Raton, 563–618.
- Fan, J., Denux, O., Courtin, C., Bernard, A., Javal, M., Millar, J. G., Hanks, L. M., & Roques, A. (2019). Multi-component blends for trapping native and exotic longhorn beetles at potential points-of-entry and in forests. *Journal of Pest Science*, *92*(1), 281–297. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0997-6>
- Fang, G., Rocha, E. P., & Danchin, A. (2008). Persistence drives gene clustering in bacterial genomes. *BMC Genomics*, *9*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-4>
- Fantle-Lepczyk, J. E., Haubrock, P. J., Kramer, A. M., Cuthbert, R. N., Turbelin, A. J., Crystal-Ornelas, R., Diagne, C., & Courchamp, F. (2022). Economic costs of biological invasions in the United States. *Science of The Total Environment*, *806*, 151318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151318>
- Feng, L., Bhanu, B., & Heraty, J. (2016). A software system for automated identification and retrieval of moth images based on wing attributes. *Pattern Recognition*, *51*, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2015.09.012>
- Fernández, S., Rodríguez, S., Martínez, J. L., Borrell, Y. J., Ardura, A., & García-Vázquez, E. (2018). Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study. *PLOS ONE*, *13*(8), e0201741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201741>
- Ferro, M. L., & Park, J.-S. (2013). Effect of Propylene Glycol Concentration on Mid-Term DNA Preservation of Coleoptera. *The Coleopterists Bulletin*, *67*, 581–586. <https://doi.org/10.1649/0010-065X-67.4.581>
- Flaherty, L., Gutowski, J. M. G., Hughes, C., Mayo, P., Mokrzycki, T., Pohl, G., Silk, P., Van Rooyen, K., & Sweeney, J. (2019). Pheromone-enhanced lure blends and multiple trap heights improve detection of bark and wood-boring beetles potentially moved in solid wood packaging. *Journal of Pest Science*, *92*(1), 309–325. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1019-4>
- Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., & Yang, Z. (2020). A Bayesian Implementation of the Multispecies Coalescent Model with Introgression for Phylogenomic Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(4), 1211–1223. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz296>
- Floyd, R., Lima, J., deWaard, J., Humble, L., & Hanner, R. (2010). Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions*, *12*(9), 2947–2954. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9709-8>
- 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 invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Foo, C. H. (2016). Linking forest naturalness and human wellbeing—A study on public's experiential connection to remnant forests within a highly urbanized region in Malaysia. *Urban Forestry & Urban Greening*, 16, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2016.01.005>
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(23), 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Futai, K. (2013). Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 61–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172910>
- Gandhi, K. J. K., & Herms, D. A. (2010). Direct and indirect effects of alien insect herbivores on ecological processes and interactions in forests of eastern North America. *Biological Invasions*, 12(2), 389–405. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9627-9>
- Gibson, J. F., Shokralla, S., Curry, C., Baird, D. J., Monk, W. A., King, I., & Hajibabaei, M. (2015). Large-Scale Biomonitoring of Remote and Threatened Ecosystems via High-Throughput Sequencing. *PLOS ONE*, 10(10), e0138432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138432>
- Gibson, J., Shokralla, S., Porter, T. M., King, I., van Konyneburg, S., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hajibabaei, M. (2014). Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8007–8012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406468111>
- Giebner, H., Langen, K., Bourlat, S. J., Kukowka, S., Mayer, C., Astrin, J. J., Misof, B., & Fonseca, V. G. (2020). Comparing diversity levels in environmental samples: DNA sequence capture and metabarcoding approaches using 18S and COI genes. *Molecular Ecology Resources*, 20(5), 1333–1345. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13201>
- Giovani, B., Blümel, S., Lopian, R., Teulon, D., Bloem, S., Galeano Martínez, C., Beltrán Montoya, C., Urias Morales, C. R., Dharmapuri, S., Timote, V., Horn, N., Chouibani, M., Mezui M'Ella, J. G., Herrera, V., Castinel, A., Goletos, C., Moeller, C., Naumann, I., Stancanelli, G., ... Xia, J. (2020). Science diplomacy for plant health. *Nature Plants*, 6(8), 902–905. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0744-x>
- Gippet, J. M., Liebhold, A. M., Fenn-Moltu, G., & Bertelsmeier, C. (2019). Human-mediated dispersal in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.07.005>
- Gleason, J. E., Elbrecht, V., Braukmann, T. W. A., Hanner, R. H., & Cottenie, K. (2021). Assessment of stream macroinvertebrate communities with eDNA is not congruent

- with tissue-based metabarcoding. *Molecular Ecology*, 30(13), 3239–3251. <https://doi.org/10.1111/mec.15597>
- Gollasch, S. (2002). The Importance of Ship Hull Fouling as a Vector of Species Introductions into the North Sea. *Biofouling*, 18(2), 105–121. <https://doi.org/10.1080/08927010290011361>
- Goudet, J. (2005). HIERFSTAT , a package for R to compute and test hierarchical  $F$  - statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- Graham, E. E., Mitchell, R. F., Reagel, P. F., Barbour, J. D., Millar, J. G., & Hanks, L. M. (2010). Treating Panel Traps With a Fluoropolymer Enhances Their Efficiency in Capturing Cerambycid Beetles. *Journal of Economic Entomology*, 103(3), 641–647. <https://doi.org/10.1603/EC10013>
- Graham, E. E., Poland, T. M., McCullough, D. G., & Millar, J. G. (2012). A Comparison of Trap Type and Height for Capturing Cerambycid Beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology*, 105(3), 837–846. <https://doi.org/10.1603/EC12053>
- Haack, R. A. (2001). Intercepted Scolytidae (Coleoptera) at U.S. ports of Entry: 1985–2000. *Integrated Pest Management Reviews*, 6(3), 253–282. <https://doi.org/10.1023/A:1025715200538>
- Haack, R. A. (2006). Exotic bark- and wood-boring Coleoptera in the United States: recent establishments and interceptions. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(2), 269–288. <https://doi.org/10.1139/x05-249>
- Haack, R. A., & Petrice, T. R. (2009). Bark- and Wood-Borer Colonization of Logs and Lumber After Heat Treatment to ISPM 15 Specifications: The Role of Residual Bark. *Journal of Economic Entomology*, 102(3), 1075–1084. <https://doi.org/10.1603/029.102.0328>
- Haack, R. A., & Rabaglia, R. J. (2013). Exotic bark and ambrosia beetles in the USA: potential and current invaders. In J. E. Peña (Ed.), *Potential invasive pests of agricultural crops* (pp. 48–74). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845938291.0048>
- Haack, R. A., Britton, K. O., Brockerhoff, E. G., Cavey, J. F., Garrett, L. J., Kimberley, M., Lowenstein, F., Nuding, A., Olson, L. J., Turner, J., & Vasilaky, K. N. (2014a). Effectiveness of the International Phytosanitary Standard ISPM No. 15 on Reducing Wood Borer Infestation Rates in Wood Packaging Material Entering the United States. *PLoS ONE*, 9(5), e96611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096611>
- Haack, R. A., Britton, K. O., Brockerhoff, E. G., Cavey, J. F., Garrett, L. J., Kimberley, M., Lowenstein, F., Nuding, A., Olson, L. J., Turner, J., & Vasilaky, K. N. (2014b). Effectiveness of the International Phytosanitary Standard ISPM No. 15 on Reducing Wood Borer Infestation Rates in Wood Packaging Material Entering the

- Haack, R. A., Hérard, F., Sun, J., & Turgeon, J. J. (2010). Managing invasive populations of Asian longhorned beetle and citrus longhorned beetle: a worldwide perspective. *Annual Review of Entomology*, 55, 521–546. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085427>
- Haack, R.A. (2017) Feeding biology of cerambycids. *Cerambycidae of the World: Biology and Pest Management* (ed. by Q. Wang), pp. 105–132. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Haddad, S., Shin, S., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Svacha, P., Farrell, B., Ślipiński, A., Windsor, D., & Mckenna, D. D. (2018). Anchored hybrid enrichment provides new insights into the phylogeny and evolution of longhorned beetles (Cerambycidae). *Systematic Entomology*, 43(1), 68–89. <https://doi.org/10.1111/syen.12257>
- Hahn, E. E., Alexander, M., Stiller, J., Grewe, P. M., & Holleley, C. E. (2024). Hot alkaline lysis gDNA extraction from formalin-fixed archival tissues. *PLOS ONE*, 19(1), e0296491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296491>
- Hajibabaei, M., Porter, T. M., Wright, M., & Rudar, J. (2019). COI metabarcoding primer choice affects richness and recovery of indicator taxa in freshwater systems. *PLOS ONE*, 14(9), e0220953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220953>
- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959–964. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x>
- Hajibabaei, M., Spall, J. L., Shokralla, S., & van Konynenburg, S. (2012). Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology*, 12(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-12-28>
- Halloran, S. T., Collignon, R. M., McElfresh, J. S., & Millar, J. G. (2018). Fuscumol and Geranylacetone as Pheromone Components of Californian Longhorn Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in the Subfamily Spondylidinae. *Environmental Entomology*, 47(5), 1300–1305. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy101>
- Hamaoui-Laguel, L., Vautard, R., Liu, L., Solmon, F., Viovy, N., Khvorostyanov, D., Essl, F., Chuine, I., Colette, A., Semenov, M. A., Schaffhauser, A., Storkey, J., Thibaudon, M., & Epstein, M. M. (2015). Effects of climate change and seed dispersal on airborne ragweed pollen loads in Europe. *Nature Climate Change*, 5(8), 766–771. <https://doi.org/10.1038/nclimate2652>
- Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2013). Field bioassays of cerambycid pheromones reveal widespread parsimony of pheromone structures, enhancement by host plant



- volatiles, and antagonism by components from heterospecifics. *Chemoecology*, 23(1), 21–44. <https://doi.org/10.1007/s00049-012-0116-8>
- Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2016). Sex and Aggregation-Sex Pheromones of Cerambycid Beetles: Basic Science and Practical Applications. *Journal of Chemical Ecology*, 42(7), 631–654. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0733-8>
- Hanks, L. M., Millar, J. G., Mongold-Diers, J. A., Wong, J. C. H., Meier, L. R., Reigel, P. F., & Mitchell, R. F. (2012). Using blends of cerambycid beetle pheromones and host plant volatiles to simultaneously attract a diversity of cerambycid species. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(6), 1050–1059. <https://doi.org/10.1139/x2012-062>
- Hanks, L. M., Mongold-Diers, J. A., Atkinson, T. H., Fierke, M. K., Ginzel, M. D., Graham, E. E., Poland, T. M., Richards, A. B., Richardson, M. L., & Millar, J. G. (2018). Blends of Pheromones, With and Without Host Plant Volatiles, Can Attract Multiple Species of Cerambycid Beetles Simultaneously. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 716–724. <https://doi.org/10.1093/jee/tox373>
- Hanks, L. M., Mongold-Diers, J. A., Mitchell, R. F., Zou, Y., Wong, J. C. H., Meier, L. R., Johnson, T. D., & Millar, J. G. (2019). The Role of Minor Pheromone Components in Segregating 14 Species of Longhorned Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) of the Subfamily Cerambycinae. *Journal of Economic Entomology*, 112(5), 2236–2252. <https://doi.org/10.1093/jee/toz141>
- Hanner R (2005) *Proposed Standards for BARCODE Records in INSDC (BRIs)* [http://barcoding.si.edu/PDF/DWG\\_data\\_standards-Final.pdf](http://barcoding.si.edu/PDF/DWG_data_standards-Final.pdf) .
- Haran, J., Koutroumpa, F., Magnoux, E., Roques, A., & Roux, G. (2015). Ghost mtDNA haplotypes generated by fortuitous NUMTs can deeply disturb infra-specific genetic diversity and phylogeographic pattern. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(2), 109–115. <https://doi.org/10.1111/jzs.12095>
- Harris, B. S., Smith, B. J., & Hayer, C.-A. (2018). Development and implementation of an adaptive management approach for monitoring non-indigenous fishes in lower Green Bay, Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 44(5), 960–969. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2018.05.021>
- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1915), 20191409. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>
- Hauck, L. L., Weitemier, K. A., Penaluna, B. E., Garcia, T. S., & Cronn, R. (2019). Casting a broader net: Using microfluidic metagenomics to capture aquatic biodiversity data from diverse taxonomic targets. *Environmental DNA*, 1(3), 251–267. <https://doi.org/10.1002/edn3.26>
- Hayes, R. A., Griffiths, M. W., Nahrung, H. F., Arnold, P. A., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2016). Optimizing Generic Cerambycid Pheromone Lures for Australian

- Biosecurity and Biodiversity Monitoring. *Journal of Economic Entomology*, 109(4), 1741–1749. <https://doi.org/10.1093/jee/tow100>
- Hebert, P. D. N., deWaard, J. R., Zakharov, E. V., Prosser, S. W. J., Sones, J. E., McKeown, J. T. A., Mantle, B., & La Salle, J. (2013). A DNA ‘Barcode Blitz’: Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. *PLoS ONE*, 8(7), e68535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068535>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hendrich, L., Morinière, J., Haszprunar, G., Hebert, P. D. N., Hausmann, A., Köhler, F., & Balke, M. (2015). A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 795–818. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12354>
- Henrie, J. R., Thomson, B. M., Yungfleisch, A. A., Kerr, M., & Leavitt, S. D. (2022). Characterizing Crustose Lichen Communities—DNA Metabarcoding Reveals More than Meets the Eye. *Diversity*, 14(9), 766. <https://doi.org/10.3390/d14090766>
- Hicke, J. A., Allen, C. D., Desai, A. R., Dietze, M. C., Hall, R. J., Ted Hogg, E. H., Kashian, D. M., Moore, D., Raffa, K. F., Sturrock, R. N., & Vogelmann, J. (2012). Effects of biotic disturbances on forest carbon cycling in the United States and Canada. *Global Change Biology*, 18(1), 7–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02543.x>
- Ho, J. K. I., Puniamoorthy, J., Srivathsan, A., & Meier, R. (2020). MinION sequencing of seafood in Singapore reveals creatively labelled flatfishes, confused roe, pig DNA in squid balls, and phantom crustaceans. *Food Control*, 112, 107144. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107144>
- Hoch, G., Connell, J., & Roques, A. (2020). Testing multi-lure traps for surveillance of native and alien longhorn beetles (Coleoptera, Cerambycidae) at ports of entry and in forests in Austria. *Management of Biological Invasions*, 11(4), 677–688. <https://doi.org/10.3391/mbi.2020.11.4.04>
- Hodgetts, J., Ostojá-Starzewski, J. C., Prior, T., Lawson, R., Hall, J., & Boonham, N. (2016). DNA barcoding for biosecurity: case studies from the UK plant protection program. *Genome*, 59(11), 1033–1048. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0010>
- Hoffman, J. C., Kelly, J. R., Trebitz, A. S., Peterson, G. S., & West, C. W. (2011). Effort and potential efficiencies for aquatic non-native species early detection. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68(12), 2064–2079. <https://doi.org/10.1139/f2011-117>
- Hoffman, J. C., Schloesser, J., Trebitz, A. S., Peterson, G. S., Gutsch, M., Quinlan, H., & Kelly, J. R. (2016). Sampling Design for Early Detection of Aquatic Invasive

- Species in Great Lakes Ports. *Fisheries*, 41(1), 26–37. <https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1114926>
- Hoyer-Tomiczek, U., & Hoch, G. (2020). Progress in the use of detection dogs for emerald ash borer monitoring. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 93(2), 326–330. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpaa001>
- Hu, J., Angeli, S., Schuetz, S., Luo, Y., & Hajek, A. E. (2009). Ecology and management of exotic and endemic Asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 11(4), 359–375. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2009.00443.x>
- Hulme, P. E. (2006). Beyond control: wider implications for the management of biological invasions: *Wider implications for managing invasions*. *Journal of Applied Ecology*, 43(5), 835–847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01227.x>
- Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x>
- Hulme, P. E. (2021). Unwelcome exchange: International trade as a direct and indirect driver of biological invasions worldwide. *One Earth*, 4(5), 666–679. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.04.015>
- Hulme, P. E., Bacher, S., Kenis, M., Klotz, S., Kühn, I., Minchin, D., Nentwig, W., Olenin, S., Panov, V., Pergl, J., Pyšek, P., Roques, A., Sol, D., Solarz, W., & Vilà, M. (2008). Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology*, 45(2), 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01442.x>
- Hyde, J., Martin, M. A., Preckel, P. V., & Edwards, C. R. (1999). The Economics of Bt Corn: Valuing Protection from the European Corn Borer. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 21(2), 442–454. <https://doi.org/10.2307/1349890>
- Imrei, Z., Domingue, M. J., Lohonyai, Z., Moreira, J. A., Bálintné Csonka, É., Fail, J., Csóka, G., Hanks, L. M., Tóth, M., & Millar, J. G. (2021). Identification of Pheromone Components of *Plagionotus detritus* (Coleoptera: Cerambycidae), and Attraction of Conspecifics, Competitors, and Natural Enemies to the Pheromone Blend. *Insects*, 12(10), 899. <https://doi.org/10.3390/insects12100899>
- Javal, M., Lombaert, E., Tsykun, T., Courtin, C., Kerdelhué, C., Prospero, S., Roques, A., & Roux, G. (2019). Deciphering the worldwide invasion of the Asian longhorned beetle: A recurrent invasion process from the native area together with a bridgehead effect. *Molecular Ecology*, 28(5), 951–967. <https://doi.org/10.1111/mec.15030>
- Javal, M., Terblanche, J., Conlong, D., Delahaye, N., Grobbelaar, E., Benoit, L., Lopez-Vaamonde, C., & Haran, J. (2021). DNA barcoding for bio-surveillance of emerging pests and species identification in Afrotropical Prioninae (Coleoptera,

Cerambycidae). *Biodiversity Data Journal*, 9, e64499.  
<https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e64499>

- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Jaques Miret, J. A., MacLeod, A., Navajas Navarro, M., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., West, J., ... Grégoire, J. (2017). Pest categorisation of *Ips typographus*. *EFSA Journal*, 15(7), e04881. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4881>
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P. M., Woodcock, P., Edwards, F. A., Larsen, T. H., Hsu, W. W., Benedick, S., Hamer, K. C., Wilcove, D. S., Bruce, C., Wang, X., Levi, T., Lott, M., ... Yu, D. W. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 16(10), 1245–1257. <https://doi.org/10.1111/ele.12162>
- Jinbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology: DNA barcoding for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107–124. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>
- Johansson, A., Birgersson, G., & Schlyter, F. (2019). Using synthetic semiochemicals to train canines to detect bark beetle–infested trees. *Annals of Forest Science*, 76(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0841-z>
- Jordal, B. H., & Kambestad, M. (2014). DNA barcoding of bark and ambrosia beetles reveals excessive NUMTs and consistent east-west divergence across Palearctic forests. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 7–17. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12150>
- Jucker, C., & Lupi, D. (2011). Exotic Insects in Italy: An Overview on Their Environmental Impact. In J. Lopez-Pujol (Ed.), *The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity*. InTech. <https://doi.org/10.5772/24263>
- Kariyanna B, Mohan M, Gupta R. 2017. Biology, ecology and significance of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5:1207–1212
- Kasai, A., Takada, S., Yamazaki, A., Masuda, R., & Yamanaka, H. (2020). The effect of temperature on environmental DNA degradation of Japanese eel. *FISHERIES SCIENCE*, 86(3), 465–471. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01409-1>
- Kelly, J. (2006). *The Great Mortality: An Intimate History of the Black Death*. Eweb:292070. <https://repository.library.georgetown.edu/handle/10822/976017>
- Kelnarova, I., Jendek, E., Grebennikov, V. V., & Bocak, L. (2019). First molecular phylogeny of *Agrilus* (Coleoptera: Buprestidae), the largest genus on Earth, with DNA barcode database for forestry pest diagnostics. *Bulletin of Entomological Research*, 109(2), 200–211. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000330>

- Kelsey, R. G., & Joseph, G. (2001). Attraction of *Scolytus unispinosus* bark beetles to ethanol in water-stressed Douglas-fir branches. *Forest Ecology and Management*, 144(1–3), 229–238. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00387-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00387-X)
- Kenis, M., Auger-Rozenberg, M.-A., Roques, A., Timms, L., Péré, C., Cock, M. J. W., Settele, J., Augustin, S., & Lopez-Vaamonde, C. (2009). Ecological effects of invasive alien insects. *Biological Invasions*, 11(1), 21–45. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9318-y>
- Kirichenko, N., Triberti, P., Ohshima, I., Haran, J., Byun, B.-K., Li, H., Augustin, S., Roques, A., & Lopez-Vaamonde, C. (2017). From east to west across the Palearctic: Phylogeography of the invasive lime leaf miner *Phyllonorycter issikii* (Lepidoptera: Gracillariidae) and discovery of a putative new cryptic species in East Asia. *PLoS ONE*, 12(2), e0171104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171104>
- Kirkendall, L., & Faccoli, M. (2010). Bark beetles and pinhole borers (Curculionidae, Scolytinae, Platypodinae) alien to Europe. *ZooKeys*, 56, 227–251. <https://doi.org/10.3897/zookeys.56.529>
- Kirse, A., Bourlat, S. J., Langen, K., & Fonseca, V. G. (2021). Unearthing the Potential of Soil eDNA Metabarcoding—Towards Best Practice Advice for Invertebrate Biodiversity Assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 630560. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630560>
- Kitson, J. J. N., Hahn, C., Sands, R. J., Straw, N. A., Evans, D. M., & Lunt, D. H. (2019). Detecting host–parasitoid interactions in an invasive Lepidopteran using nested tagging DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 28(2), 471–483. <https://doi.org/10.1111/mec.14518>
- Kopecký, O., Kalous, L., & Patoka, J. (2013). Establishment risk from pet-trade freshwater turtles in the European Union. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 410, 02. <https://doi.org/10.1051/kmae/2013057>
- Kopf, R. K., Nimmo, D. G., Humphries, P., Baumgartner, L. J., Bode, M., Bond, N. R., Byrom, A. E., Cucherousset, J., Keller, R. P., King, A. J., McGinness, H. M., Moyle, P. B., & Olden, J. D. (2017). Confronting the risks of large-scale invasive species control. *Nature Ecology & Evolution*, 1(6), 0172. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0172>
- Kopylova, E., Navas-Molina, J. A., Mercier, C., Xu, Z. Z., Mahé, F., He, Y., Zhou, H.-W., Rognes, T., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2016). Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art. *MSystems*, 1(1), e00003-15. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00003-15>
- Koutroumpa, F. A., Lieutier, F., & Roux-Morabito, G. (2009). Incorporation of mitochondrial fragments in the nuclear genome ( *Numts* ) of the longhorned beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae). *Journal of Zoological*

*Systematics and Evolutionary Research*, 47(2), 141–148.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00492.x>

- Koziol, A., Stat, M., Simpson, T., Jarman, S., DiBattista, J. D., Harvey, E. S., Marnane, M., McDonald, J., & Bunce, M. (2019). Environmental DNA metabarcoding studies are critically affected by substrate selection. *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 366–376. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12971>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kozlov, A. M., Zhang, J., Yilmaz, P., Glöckner, F. O., & Stamatakis, A. (2016). Phylogeny-aware identification and correction of taxonomically mislabeled sequences. *Nucleic Acids Research*, 44(11), 5022–5033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw396>
- Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., & Prost, S. (2019). Genetic Biomonitoring and Biodiversity Assessment Using Portable Sequencing Technologies: Current Uses and Future Directions. *Genes*, 10(11), 858. <https://doi.org/10.3390/genes10110858>
- Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., Henderson, J. B., Kennedy, S. R., Lim, J. Y., Swamy, V., Shoobridge, J. D., Graham, N., Patel, N. H., Gillespie, R. G., & Prost, S. (2019). Nanopore sequencing of long ribosomal DNA amplicons enables portable and simple biodiversity assessments with high phylogenetic resolution across broad taxonomic scale. *GigaScience*, 8(5), giz006. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz006>
- Krehenwinkel, H., Wolf, M., Lim, J. Y., Rominger, A. J., Simison, W. B., & Gillespie, R. G. (2017). Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding. *Scientific Reports*, 7(1), 17668. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17333-x>
- Kuebbing, S. E., McCary, M. A., Lieurance, D., Nuñez, M. A., Chiuffo, M. C., Zhang, B., Seebens, H., Simberloff, D., & Meyerson, L. A. (2022). A self-study of editorial board diversity at Biological Invasions. *Biological Invasions*, 24(2), 321–332. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02664-8>
- Lamb, P. D., Hunter, E., Pinnegar, J. K., Creer, S., Davies, R. G., & Taylor, M. I. (2019). How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*, 28(2), 420–430. <https://doi.org/10.1111/mec.14920>
- Lee, H.-R., Lee, S.-C., Lee, D. H., Jung, M., Kwon, J.-H., Huh, M.-J., Kim, D.-S., Lee, J.-E., & Park, I.-K. (2018). Identification of Aggregation-Sex Pheromone of the Korean *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) Population, the Main Vector of Pine Wood Nematode. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1768–1774. <https://doi.org/10.1093/jee/toy137>

- Lee, S., & Lee, S. (2020). Multigene phylogeny uncovers oviposition-related evolutionary history of Cerambycinae (Coleoptera: Cerambycidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *145*, 106707. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106707>
- Le-Qing, Z., & Zhen, Z. (2012). Automatic insect classification based on local mean colour feature and Supported Vector Machines. *Oriental Insects*, *46*(3–4), 260–269. <https://doi.org/10.1080/00305316.2012.738142>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Liang, J., Crowther, T. W., Picard, N., Wiser, S., Zhou, M., Alberti, G., Schulze, E.-D., McGuire, A. D., Bozzato, F., Pretzsch, H., de-Miguel, S., Paquette, A., Hérault, B., Scherer-Lorenzen, M., Barrett, C. B., Glick, H. B., Hengeveld, G. M., Nabuurs, G.-J., Pfautsch, S., ... Reich, P. B. (2016). Positive biodiversity-productivity relationship predominant in global forests. *Science*, *354*(6309), aaf8957. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8957>
- Liebholt, A. M., Brockerhoff, E. G., Garrett, L. J., Parke, J. L., & Britton, K. O. (2012). Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *10*(3), 135–143. <https://doi.org/10.1890/110198>
- Liebholt, A. M., Yamanaka, T., Roques, A., Augustin, S., Chown, S. L., Brockerhoff, E. G., & Pyšek, P. (2016). Global compositional variation among native and non-native regional insect assemblages emphasizes the importance of pathways. *Biological Invasions*, *18*(4), 893–905. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1079-4>
- Lingafelter, S. W. and E. R. Hoebeke. 2002. Revision of Anoplophora (Coleoptera: Cerambycidae). Entomological Society of Washington, Washington, D.C., U.S.A. 236 pp. 41 color plates.
- Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., & Burridge, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology*, *45*(3), 373–385. <https://doi.org/10.1111/een.12831>
- Liu, X., Zhang, H., Jiang, Q., Ren, L., Chen, Z., Luo, Y., & Li, J. (2022). Acoustic Denoising Using Artificial Intelligence for Wood-Boring Pests *Semanotus bifasciatus* Larvae Early Monitoring. *Sensors*, *22*(10), 3861. <https://doi.org/10.3390/s22103861>
- Lockwood, J. L., Welbourne, D. J., Romagosa, C. M., Cassey, P., Mandrak, N. E., Strecker, A., Leung, B., Stringham, O. C., Udell, B., Episcopio-Sturgeon, D. J., Tlusty, M. F., Sinclair, J., Springborn, M. R., Pienaar, E. F., Rhyne, A. L., & Keller, R. (2019). When pets become pests: the role of the exotic pet trade in producing invasive vertebrate animals. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *17*(6), 323–330. <https://doi.org/10.1002/fee.2059>

- Lodge, D. M., Williams, S., Maclsaac, H. J., Hayes, K. R., Leung, B., Reichard, S., Mack, R. N., Moyle, P. B., Smith, M., Andow, D. A., Carlton, J. T., & McMichael, A. (2006). Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management. *Ecological Applications: A Publication of the Ecological Society of America*, *16*(6), 2035–2054. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[2035:birfup\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2035:birfup]2.0.co;2)
- Lombaert, E., Guillemaud, T., Cornuet, J.-M., Malausa, T., Facon, B., & Estoup, A. (2010). Bridgehead Effect in the Worldwide Invasion of the Biocontrol Harlequin Ladybird. *PLoS ONE*, *5*(3), e9743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009743>
- Lovett, G. M., Weiss, M., Liebhold, A. M., Holmes, T. P., Leung, B., Lambert, K. F., Orwig, D. A., Campbell, F. T., Rosenthal, J., McCullough, D. G., Wildova, R., Ayres, M. P., Canham, C. D., Foster, D. R., LaDeau, S. L., & Weldy, T. (2016). Nonnative forest insects and pathogens in the United States: Impacts and policy options. *Ecological Applications*, *26*(5), 1437–1455. <https://doi.org/10.1890/15-1176>
- Luo, Y., Huang, H., & Roques, A. (2023). Early Monitoring of Forest Wood-Boring Pests with Remote Sensing. *Annual Review of Entomology*, *68*(1), 277–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-125410>
- Lyal, C. H. C., & Miller, S. E. (2020). Capacity of United States federal government and its partners to rapidly and accurately report the identity (taxonomy) of non-native organisms intercepted in early detection programs. *Biological Invasions*, *22*(1), 101–127. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02147-x>
- Mächler, E., Deiner, K., Steinmann, P., & Altermatt, F. (2014). Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*, *33*(4), 1174–1183. <https://doi.org/10.1086/678128>
- Mackey, B., DellaSala, D. A., Kormos, C., Lindenmayer, D., Kumpel, N., Zimmerman, B., Hugh, S., Young, V., Foley, S., Arsenis, K., & Watson, J. E. M. (2015). Policy Options for the World's Primary Forests in Multilateral Environmental Agreements. *Conservation Letters*, *8*(2), 139–147. <https://doi.org/10.1111/conl.12120>
- Madden, M. J. L., Young, R. G., Brown, J. W., Miller, S. E., Frewin, A. J., & Hanner, R. H. (2019). Using DNA barcoding to improve invasive pest identification at U.S. ports-of-entry. *PLoS ONE*, *14*(9), e0222291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222291>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, *2*, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Majaneva, M., Diserud, O. H., Eagle, S. H. C., Hajibabaei, M., & Ekrem, T. (2018). Choice of DNA extraction method affects DNA metabarcoding of unsorted invertebrate bulk samples. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, e26664. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.26664>
- Mankin, R. W., Smith, M. T., Tropp, J. M., Atkinson, E. B., & Jong, D. Y. (2008). Detection of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae in different host



- trees and tissues by automated analyses of sound-impulse frequency and temporal patterns. *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 838–849. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[838:doagcc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[838:doagcc]2.0.co;2)
- Marchioro, M., Rassati, D., Faccoli, M., Van Rooyen, K., Kostanowicz, C., Webster, V., Mayo, P., & Sweeney, J. (2020). Maximizing Bark and Ambrosia Beetle (Coleoptera: Curculionidae) Catches in Trapping Surveys for Longhorn and Jewel Beetles. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2745–2757. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa181>
- Marquina, D., Andersson, A. F., & Ronquist, F. (2019). New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 90–104. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12942>
- Marquina, D., Esparza-Salas, R., Roslin, T., & Ronquist, F. (2019). Establishing arthropod community composition using metabarcoding: Surprising inconsistencies between soil samples and preservative ethanol and homogenate from Malaise trap catches. *Molecular Ecology Resources*, 19(6), 1516–1530. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13071>
- Marselle, M. R., Hartig, T., Cox, D. T. C., de Bell, S., Knapp, S., Lindley, S., Triguero-Mas, M., Böhning-Gaese, K., Braubach, M., Cook, P. A., de Vries, S., Heintz-Buschart, A., Hofmann, M., Irvine, K. N., Kabisch, N., Kolek, F., Kraemer, R., Markevych, I., Martens, D., ... Bonn, A. (2021). Pathways linking biodiversity to human health: A conceptual framework. *Environment International*, 150, 106420. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106420>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martins, F. M. S., Galhardo, M., Filipe, A. F., Teixeira, A., Pinheiro, P., Paupério, J., Alves, P. C., & Beja, P. (2019). Have the cake and eat it: Optimizing nondestructive DNA metabarcoding of macroinvertebrate samples for freshwater biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 19(4), 863–876. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13012>
- Martoni, F., Valenzuela, I., & Blacket, M. J. (2019). Non-destructive DNA extractions from fly larvae (Diptera: Muscidae) enable molecular identification of species and enhance morphological features. *Austral Entomology*, 58(4), 848–856. <https://doi.org/10.1111/aen.12419>
- Mas, H., Santoiemma, G., Lencina, J. L., Gallego, D., Pérez-Laorga, E., Ruzzier, E., & Rassati, D. (2023). Investigating beetle communities in and around entry points can improve surveillance at national and international scale. *NeoBiota*, 85, 145–165. <https://doi.org/10.3897/neobiota.85.103904>

- Mazza, G., Tricarico, E., Genovesi, P., & Gherardi, F. (2014). Biological invaders are threats to human health: an overview. *Ethology Ecology & Evolution*, 26(2–3), 112–129. <https://doi.org/10.1080/03949370.2013.863225>
- McCullough, D. G., Work, T. T., Cavey, J. F., Liebhold, A. M., & Marshall, D. (2006). Interceptions of Nonindigenous Plant Pests at US Ports of Entry and Border Crossings Over a 17-year Period. *Biological Invasions*, 8(4), 611–630. <https://doi.org/10.1007/s10530-005-1798-4>
- Meier, L. R., Millar, J. G., Mongold-Diers, J. A., & Hanks, L. M. (2019). (S)-Sulcatol Is a Pheromone Component for Two Species of Cerambycid Beetles in the Subfamily Lamiinae. *Journal of Chemical Ecology*, 45(5–6), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01071-7>
- Meier, L. R., Zou, Y., Millar, J. G., Mongold-Diers, J. A., & Hanks, L. M. (2016). Synergism between Enantiomers Creates Species-Specific Pheromone Blends and Minimizes Cross-Attraction for Two Species of Cerambycid Beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 42(11), 1181–1192. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0782-z>
- Meng, P. S., Hoover, K., & Keena, M. A. (2015). Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae), an Introduced Pest of Maple and Other Hardwood Trees in North America and Europe. *Journal of Integrated Pest Management*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv003>
- Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J.-F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9(1), 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-214>
- Micas, L (2023). L'entomologie forestière en Méditerranée Les enjeux de la connaissance à travers quelques exemples. Forêt méditerranéenne t. XLIV, n°1, mars 2023.
- Milián-García, Y., Young, R., Madden, M., Bullas-Appleton, E., & Hanner, R. H. (2021). Optimization and validation of a cost-effective protocol for biosurveillance of invasive alien species. *Ecology and Evolution*, 11(5), 1999–2014. <https://doi.org/10.1002/ece3.7139>
- Millar JG, Hanks LM (2017) Chemical ecology of cerambycids In: Wang Q (Ed.) Cerambycidae of the world: biology and pest management. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, 161–208.
- Millar, J. G., Mitchell, R. F., Mongold-Diers, J. A., Zou, Y., Bográn, C. E., Fierke, M. K., Ginzl, M. D., Johnson, C. W., Meeker, J. R., Poland, T. M., Ragenovich, I., & Hanks, L. M. (2018). Identifying Possible Pheromones of Cerambycid Beetles by Field Testing Known Pheromone Components in Four Widely Separated Regions of the United States. *Journal of Economic Entomology*, 111(1), 252–259. <https://doi.org/10.1093/jee/tox312>

- Millar, J. G., Richards, A. B., Halloran, S., Zou, Y., Boyd, E. A., Quigley, K. N., & Hanks, L. M. (2019). Pheromone identification by proxy: identification of aggregation-sex pheromones of North American cerambycid beetles as a strategy to identify pheromones of invasive Asian congeners. *Journal of Pest Science*, *92*(1), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0962-4>
- Millar, J. G., Zou, Y., Barringer, L., & Hanks, L. M. (2021). Field Trials With Blends of Pheromones of Native and Invasive Cerambycid Beetle Species. *Environmental Entomology*, *50*(6), 1294–1298. <https://doi.org/10.1093/ee/nvab085>
- Miller, D. R., Allison, J. D., Crowe, C. M., Dickinson, D. M., Eglitis, A., Hofstetter, R. W., Munson, A. S., Poland, T. M., Reid, L. S., Steed, B. E., & Sweeney, J. D. (2016). Pine Sawyers (Coleoptera: Cerambycidae) Attracted to  $\alpha$ -Pinene, Monochamol, and Ipsenol in North America. *Journal of Economic Entomology*, *109*(3), 1205–1214. <https://doi.org/10.1093/jee/tow071>
- Miller, D. R., Crowe, C. M., & Sweeney, J. D. (2019). Trap Height Affects Catches of Bark and Woodboring Beetles (Coleoptera: Curculionidae, Cerambycidae) in Baited Multiple-Funnel Traps in Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, *toz271*. <https://doi.org/10.1093/jee/toz271>
- Miller, D. R., Crowe, C. M., Mayo, P. D., Reid, L. S., Silk, P. J., & Sweeney, J. D. (2017). Interactions between Ethanol, *syn*-2,3-Hexanediol, 3-Hydroxyhexan-2-one, and 3-Hydroxyoctan-2-one Lures on Trap Catches of Hardwood Longhorn Beetles in Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, *110*(5), 2119–2128. <https://doi.org/10.1093/jee/tox188>
- Miller, D. R., Crowe, C. M., Mayo, P. D., Silk, P. J., & Sweeney, J. D. (2022). Interactions Between *syn* - and *anti* -2,3-Hexanediol Lures on Trap Catches of Woodboring Beetles and Associates in Southeastern United States. *Environmental Entomology*, *51*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1093/ee/nvab111>
- Milošević, D., Milosavljević, A., Predić, B., Medeiros, A. S., Savić-Zdravković, D., Stojković Piperac, M., Kostić, T., Spasić, F., & Leese, F. (2020). Application of deep learning in aquatic bioassessment: Towards automated identification of non-biting midges. *Science of The Total Environment*, *711*, 135160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135160>
- Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., & Maruyama, A. (2016). Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, *17*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10201-015-0457-4>
- Mitchell, R. F., Graham, E. E., Wong, J. C. H., Reagel, P. F., Striman, B. L., Hughes, G. P., Paschen, M. A., Ginzel, M. D., Millar, J. G., & Hanks, L. M. (2011). Fuscumol and fuscumol acetate are general attractants for many species of cerambycid beetles in the subfamily Lamiinae: Fuscumol and its acetate are attractants for cerambycids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *141*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01167.x>

- Moreau, C. S., Wray, B. D., Czekanski-Moir, J. E., & Rubin, B. E. R. (2013). DNA preservation: a test of commonly used preservatives for insects. *Invertebrate Systematics*, 27(1), 81–86. <https://doi.org/10.1071/IS12067>
- Mori, A. S., Lertzman, K. P., & Gustafsson, L. (2017). Biodiversity and ecosystem services in forest ecosystems: a research agenda for applied forest ecology. *Journal of Applied Ecology*, 54(1), 12–27. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12669>
- Moses, M. J. (1961). SPERMIOGENESIS IN THE CRAYFISH (PROCAMBARUS CLARKII). *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10(3), 301–333. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.3.301>
- Murugan, K., Vadivalagan, C., Karthika, P., Panneerselvam, C., Paulpandi, M., Subramaniam, J., Wei, H., Aziz, A. T., Alsalhi, M. S., Devanesan, S., Nicoletti, M., Paramasivan, R., Parajulee, M. N., & Benelli, G. (2016). DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. *Parasitology Research*, 115(1), 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4726-2>
- Musso, A. E., Fortier, C., Huber, D. P. W., Carroll, A. L., & Evenden, M. L. (2023). Naïve Pine Terpene Response to the Mountain Pine Beetle (*Dendroctonus ponderosae*) through the Seasons. *Journal of Chemical Ecology*, 49(5), 299–312. <https://doi.org/10.1007/s10886-023-01418-1>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nacambo, S., Leuthardt, F. L. G., Wan, H., Li, H., Haye, T., Baur, B., Weiss, R. M., & Kenis, M. (2014). Development characteristics of the box-tree moth *C ydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *Journal of Applied Entomology*, 138(1–2), 14–26. <https://doi.org/10.1111/jen.12078>
- Nagy, Z. T. (2010). A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(1), 91–105. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0012-4>
- Nahrung, H. F., & Carnegie, A. J. (2021). Border interceptions of forest insects established in Australia: intercepted invaders travel early and often. *NeoBiota*, 64, 69–86. <https://doi.org/10.3897/neobiota.64.60424>
- Nahrung, H. F., Liebhold, A. M., Brockerhoff, E. G., & Rassati, D. (2023). Forest Insect Biosecurity: Processes, Patterns, Predictions, Pitfalls. *Annual Review of Entomology*, 68(1), 211–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-010854>
- Nakahama, N., Uchida, K., Ushimaru, A., & Isagi, Y. (2018). Historical changes in grassland area determined the demography of semi-natural grassland butterflies in Japan. *Heredity*, 121(2), 155–168. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0057-2>

- Navajas, M., & Fenton, B. (2000). The Application of Molecular Markers in the Study of Diversity in Acarology: a Review. *Experimental and Applied Acarology*, 24(10/11), 751–774. <https://doi.org/10.1023/A:1006497906793>
- Naves, P., Mota, M., Pires, J., Penas, A. C., Sousa, E., Bonifácio, L., & Bravo, M. A. (2001). *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1), 89–91. <https://doi.org/10.1163/156854101300106937>
- Nie, R., Vogler, A. P., Yang, X., & Lin, M. (2021). Higher-level phylogeny of longhorn beetles (Coleoptera: Chrysomeloidea) inferred from mitochondrial genomes. *Systematic Entomology*, 46(1), 56–70. <https://doi.org/10.1111/syen.12447>
- Nielsen, M., Gilbert, M. T. P., Pape, T., & Bohmann, K. (2019). A simplified DNA extraction protocol for unsorted bulk arthropod samples that maintains exoskeletal integrity. *Environmental DNA*, 1(2), 144–154. <https://doi.org/10.1002/edn3.16>
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.-H., & Kõljalg, U. (2006). Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE*, 1(1), e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000059>
- Nolte O, Krieger D (2008) *Nachweis von Saperda candida Fabricius 1787 auf Fehma.* (n.d.).
- O'Dowd, D. J., Green, P. T., & Lake, P. S. (2003). Invasional 'meltdown' on an oceanic island. *Ecology Letters*, 6(9), 812–817. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00512.x>
- OEPP/EPPO, 2018a. – First report of *Xylotrechus chinensis* in Spain. EPPO Reporting Service – Pests 2018-155, 2018 (8) : 5.
- OEPP/EPPO, 2018b. – First report of *Xylotrechus chinensis* in Crete, Greece. EPPO Reporting Service – Pests 2018-156, 2018 (8) : 6.
- OEPP/EPPO, 2018c. – *Xylotrechus chinensis* (Coleoptera: Cerambycidae): addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service – Pests 2018-157, 2018 (8) : 7-9.
- Pajares, J. A., Álvarez, G., Hall, D. R., Douglas, P., Centeno, F., Ibarra, N., Schroeder, M., Teale, S. A., Wang, Z., Yan, S., Millar, J. G., & Hanks, L. M. (2013). 2-(Undecyloxy)-ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149(2), 118–127. <https://doi.org/10.1111/eea.12113>
- Pajares, J. A., Álvarez, G., Ibeas, F., Gallego, D., Hall, D. R., & Farman, D. I. (2010). Identification and Field Activity of a Male-Produced Aggregation Pheromone in the Pine Sawyer Beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 570–583. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9791-5>
- Pan, Y., Birdsey, R. A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P. E., Kurz, W. A., Phillips, O. L., Shvidenko, A., Lewis, S. L., Canadell, J. G., Ciais, P., Jackson, R. B., Pacala,

- S. W., McGuire, A. D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., & Hayes, D. (2011). A Large and Persistent Carbon Sink in the World's Forests. *Science*, 333(6045), 988–993. <https://doi.org/10.1126/science.1201609>
- Papadopoulos, N. G., Agache, I., Bavbek, S., Bilo, B. M., Braido, F., Cardona, V., Custovic, A., Demonchy, J., Demoly, P., Eigenmann, P., Gayraud, J., Grattan, C., Heffler, E., Hellings, P. W., Jutel, M., Knol, E., Lötvall, J., Muraro, A., Poulsen, L. K., ... Akdis, C. A. (2012). Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clinical and Translational Allergy*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-2-21>
- Pergl, J., Pyšek, P., Bacher, S., Essl, F., Genovesi, P., Harrower, C. A., Hulme, P. E., Jeschke, J. E., Kenis, M., Kühn, I., Perglová, I., Rabitsch, W., Roques, A., Roy, D. B., Roy, H. E., Vilà, M., Winter, M., & Nentwig, W. (2017). Troubling travellers: are ecologically harmful alien species associated with particular introduction pathways? *NeoBiota*, 32, 1–20. <https://doi.org/10.3897/neobiota.32.10199>
- Perre, P., Faria, F. A., Jorge, L. R., Rocha, A., Torres, R. S., Souza-Filho, M. F., Lewinsohn, T. M., & Zucchi, R. A. (2016). Toward an Automated Identification of Anastrepha Fruit Flies in the fraterculus group (Diptera, Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 45(5), 554–558. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0403-0>
- Perrings, C., Dehnen-Schmutz, K., Touza, J., & Williamson, M. (2005). How to manage biological invasions under globalization. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.011>
- Persaud, S. F., Cottenie, K., & Gleason, J. E. (2021). Ethanol eDNA Reveals Unique Community Composition of Aquatic Macroinvertebrates Compared to Bulk Tissue Metabarcoding in a Biomonitoring Sampling Scheme. *Diversity*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.3390/d13010034>
- Phillips, J. D., Gillis, D. J., & Hanner, R. H. (2019). Incomplete estimates of genetic diversity within species: Implications for DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, 9(5), 2996–3010. <https://doi.org/10.1002/ece3.4757>
- Piemontese, L., Giovannini, I., Guidetti, R., Pellegrini, G., Dioli, P., Maistrello, L., Rebecchi, L., & Cesari, M. (2020). The species identification problem in mirids (Hemiptera: Heteroptera) highlighted by DNA barcoding and species delimitation studies. *The European Zoological Journal*, 87(1), 310–324. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1773948>
- Piñol, J., Senar, M. A., & Symondson, W. O. C. (2019). The choice of universal primers and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Molecular Ecology*, 28(2), 407–419. <https://doi.org/10.1111/mec.14776>
- Piper, A. M., Batovska, J., Cogan, N. O. I., Weiss, J., Cunningham, J. P., Rodoni, B. C., & Blacket, M. J. (2019). Prospects and challenges of implementing DNA

- metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience*, 8(8), giz092. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>
- Poland, T. M., & Rassati, D. (2019). Improved biosecurity surveillance of non-native forest insects: a review of current methods. *Journal of Pest Science*, 92(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1004-y>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27(2), 313–338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Porter, T. M., Morris, D. M., Basiliko, N., Hajibabaei, M., Doucet, D., Bowman, S., Emilson, E. J. S., Emilson, C. E., Chartrand, D., Wainio-Keizer, K., Séguin, A., & Venier, L. (2019). Variations in terrestrial arthropod DNA metabarcoding methods recovers robust beta diversity but variable richness and site indicators. *Scientific Reports*, 9(1), 18218. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54532-0>
- Powell, J. R. (2016). New contender for most lethal animal. *Nature*, 540(7634), 525–525. <https://doi.org/10.1038/540525c>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Pyšek, P., Hulme, P. E., Simberloff, D., Bacher, S., Blackburn, T. M., Carlton, J. T., Dawson, W., Essl, F., Foxcroft, L. C., Genovesi, P., Jeschke, J. M., Kühn, I., Liebhold, A. M., Mandrak, N. E., Meyerson, L. A., Pauchard, A., Pergl, J., Roy, H. E., Seebens, H., ... Richardson, D. M. (2020). Scientists' warning on invasive alien species. *Biological Reviews*, 95(6), 1511–1534. <https://doi.org/10.1111/brv.12627>
- Rabaglia, R. J., Cognato, A. I., Hoebeke, E. R., Johnson, C. W., LaBonte, J. R., Carter, M. E., & Vlach, J. J. (2019). Early Detection and Rapid Response: A 10-Year Summary of the USDA Forest Service Program of Surveillance for Non-Native Bark and Ambrosia Beetles. *American Entomologist*, 65(1), 29–42. <https://doi.org/10.1093/ae/tmz015>
- Raffa, K. F., Aukema, B. H., Bentz, B. J., Carroll, A. L., Hicke, J. A., Turner, M. G., & Romme, W. H. (2008). Cross-scale Drivers of Natural Disturbances Prone to Anthropogenic Amplification: The Dynamics of Bark Beetle Eruptions. *BioScience*, 58(6), 501–517. <https://doi.org/10.1641/B580607>
- Rassati, D., Faccoli, M., Marini, L., Haack, R. A., Battisti, A., & Petrucco Toffolo, E. (2015). Exploring the role of wood waste landfills in early detection of non-native wood-boring beetles. *Journal of Pest Science*, 88(3), 563–572. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0639-6>
- Rassati, D., Faccoli, M., Petrucco Toffolo, E., Battisti, A., & Marini, L. (2015). Improving the early detection of alien wood-boring beetles in ports and surrounding forests. *Journal of Applied Ecology*, 52(1), 50–58. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12347>

- Rassati, D., Lieutier, F., & Faccoli, M. (2016). Alien Wood-Boring Beetles in Mediterranean Regions. In T. D. Paine & F. Lieutier (Eds.), *Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems* (pp. 293–327). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24744-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24744-1_11)
- Rassati, D., Marchioro, M., Flaherty, L., Poloni, R., Edwards, S., Faccoli, M., & Sweeney, J. (2021). Response of native and exotic longhorn beetles to common pheromone components provides partial support for the pheromone-free space hypothesis. *Insect Science*, *28*(3), 793–810. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12790>
- Rassati, D., Marini, L., Marchioro, M., Rapuzzi, P., Magnani, G., Poloni, R., Di Giovanni, F., Mayo, P., & Sweeney, J. (2019). Developing trapping protocols for wood-boring beetles associated with broadleaf trees. *Journal of Pest Science*, *92*(1), 267–279. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0984-y>
- Rassati, D., Petrucco Toffolo, E., Roques, A., Battisti, A., & Faccoli, M. (2014). Trapping wood boring beetles in Italian ports: a pilot study. *Journal of Pest Science*, *87*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0499-5>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>): BARCODING. *Molecular Ecology Notes*, *7*(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, *8*(7), e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Ray, A. M., Francese, J. A., Zou, Y., Watson, K., Crook, D. J., & Millar, J. G. (2019). Isolation and identification of a male-produced aggregation-sex pheromone for the velvet longhorned beetle, *Trichoferus campestris*. *Scientific Reports*, *9*(1), 4459. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41047-x>
- Ray, A. M., Žunič, A., Alten, R. L., McElfresh, J. S., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2011). cis-Vaccenyl Acetate, A Female-Produced Sex Pheromone Component of *Ortholeptura valida*, A Longhorned Beetle in the Subfamily Lepturinae. *Journal of Chemical Ecology*, *37*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9908-5>
- Reddy, G. V., Fettköther, R., Noldt, U., & Dettner, K. (2005). Enhancement of attraction and trap catches of the old-house borer, *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera: Cerambycidae), by combination of male sex pheromone and monoterpenes. *Pest Management Science*, *61*(7), 699–704. <https://doi.org/10.1002/ps.1044>
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, *51*(5), 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>
- Ricciardi, A., Hoopes, M. F., Marchetti, M. P., & Lockwood, J. L. (2013). Progress toward understanding the ecological impacts of nonnative species. *Ecological Monographs*, *83*(3), 263–282. <https://doi.org/10.1890/13-0183.1>



- Richardson, D. M., Pyšek, P., Rejmanek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity & Distributions*, 6(2), 93–107. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x>
- Richly, E. (2004). NUMTs in Sequenced Eukaryotic Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1081–1084. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh110>
- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 7–20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Robertson, P. A., Mill, A., Novoa, A., Jeschke, J. M., Essl, F., Gallardo, B., Geist, J., Jarić, I., Lambin, X., Musseau, C., Pergl, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., Von Schmalensee, M., Shirley, M., Strayer, D. L., Stefansson, R. A., Smith, K., & Booy, O. (2020). A proposed unified framework to describe the management of biological invasions. *Biological Invasions*, 22(9), 2633–2645. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02298-2>
- Rodstein, J., McElfresh, J. S., Barbour, J. D., Ray, A. M., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2009). Identification and synthesis of a female-produced sex pheromone for the cerambycid beetle *Prionus californicus*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(5), 590–600. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9623-7>
- Roques A (2010) Alien forest insects in a warmer world and a globalized economy: Impacts of changes in trade, tourism and climate on forest biosecurity. *New Zealand Journal of Forestry* 40: 77–94.
- Roques, A., & Auger-Rozenberg, M.-A. (2006). Tentative analysis of the interceptions of non-indigenous organisms in Europe during 1995–2004<sup>1</sup>. *EPPO Bulletin*, 36(3), 490–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.01049.x>
- Roques, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Blackburn, T. M., Garnas, J., Pyšek, P., Rabitsch, W., Richardson, D. M., Wingfield, M. J., Liebhold, A. M., & Duncan, R. P. (2016). Temporal and interspecific variation in rates of spread for insect species invading Europe during the last 200 years. *Biological Invasions*, 18(4), 907–920. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1080-y>
- Roques, A., Fan, J., Courtial, B., Zhang, Y., Yart, A., Auger-Rozenberg, M.-A., Denux, O., Kenis, M., Baker, R., & Sun, J. (2015). Planting Sentinel European Trees in Eastern Asia as a Novel Method to Identify Potential Insect Pest Invaders. *PLoS ONE*, 10(5), e0120864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120864>
- Roques, A., Ren, L., Rassati, D., Shi, J., Akulov, E., Audsley, N., Auger-Rozenberg, M.-A., Avtzis, D., Battisti, A., Bellanger, R., Bernard, A., Bernadinelli, I., Branco, M., Cavaletto, G., Cocquempot, C., Contarini, M., Courtial, B., Courtin, C., Denux, O., ... Millar, J. G. (2023). Worldwide tests of generic attractants, a promising tool for early detection of non-native cerambycid species. *NeoBiota*, 84, 169–209. <https://doi.org/10.3897/neobiota.84.91096>

- Roques, A., Shi, J., Auger-Rozenberg, M.-A., Ren, L., Augustin, S., & Luo, Y. (2020). Are Invasive Patterns of Non-native Insects Related to Woody Plants Differing Between Europe and China? *Frontiers in Forests and Global Change*, 2, 91. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00091>
- Rossa, R., & Goczał, J. (2021). Global diversity and distribution of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *The European Zoological Journal*, 88(1), 289–302. <https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1883129>
- Rougerie, R., Lopez-Vaamonde, C., Barnouin, T., Delnatte, J., Moulin, N., Noblecourt, T., Nusillard, B., Parmain, G., Soldati, F., & Bouget, C. (2015). PASSIFOR: A reference library of DNA barcodes for French saproxylic beetles (Insecta, Coleoptera). *Biodiversity Data Journal*, 3, e4078. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e4078>
- Roy, H. E., Pauchard, A., Stoett, P., Renard Truong, T., Bacher, S., Galil, B. S., Hulme, P. E., Ikeda, T., Sankaran, K. V., McGeoch, M. A., Meyerson, L. A., Nuñez, M. A., Ordonez, A., Rahlao, S. J., Schwindt, E., Seebens, H., Sheppard, A. W., & Vandvik, V. (2023). *IPBES Invasive Alien Species Assessment: Summary for Policymakers*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7430692>
- Rubink, W. L., Murray, K. D., Baum, K. A., & Pinto, M. A. (2003). Long term preservation of DNA from honey bees (*Apis mellifera*) collected in aerial pitfall traps. *Texas Journal of Science*, 159–168. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/2909>
- Rugman-Jones, P. F., Hoddle, M. S., & Stouthamer, R. (2010). Nuclear-Mitochondrial Barcoding Exposes the Global Pest Western Flower Thrips (Thysanoptera: Thripidae) as Two Sympatric Cryptic Species in Its Native California. *Journal of Economic Entomology*, 103(3), 877–886. <https://doi.org/10.1603/EC09300>
- Russo, E., Nugnes, F., Vicinanza, F., Garonna, A. P., & Bernardo, U. (2020). Biological and molecular characterization of *Aromia bungii* (Faldermann, 1835) (Coleoptera: Cerambycidae), an emerging pest of stone fruits in Europe. *Scientific Reports*, 10(1), 7112. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63959-9>
- Ryall, K., Silk, P., Webster, R. P., Gutowski, J. M., Meng, Q., Li, Y., Gao, W., Fidgen, J., Kimoto, T., Scarr, T., Mastro, V., & Sweeney, J. D. (2015). Further evidence that monochamol is attractive to *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) species, with attraction synergised by host plant volatiles and bark beetle (Coleoptera: Curculionidae) pheromones. *The Canadian Entomologist*, 147(5), 564–579. <https://doi.org/10.4039/tce.2014.67>
- Sahlin, K., & Medvedev, P. (2020). De Novo Clustering of Long-Read Transcriptome Data Using a Greedy, Quality Value-Based Algorithm. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 27(4), 472–484. <https://doi.org/10.1089/cmb.2019.0299>
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C., McCauley, D. E., O'Neil,

- P., Parker, I. M., Thompson, J. N., & Weller, S. G. (2001). The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 305–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037>
- Sales, N. G., Wangensteen, O. S., Carvalho, D. C., & Mariani, S. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environmental DNA*, 1(2), edn3.14. <https://doi.org/10.1002/edn3.14>
- Sarto I Monteys, V., & Torras I Tutusaus, G. (2018). A New Alien Invasive Longhorn Beetle, *Xylotrechus chinensis* (Cerambycidae), Is Infesting Mulberries in Catalonia (Spain). *Insects*, 9(2), 52. <https://doi.org/10.3390/insects9020052>
- Saul, W.-C., Roy, H. E., Booy, O., Carnevali, L., Chen, H.-J., Genovesi, P., Harrower, C. A., Hulme, P. E., Pagad, S., Pergl, J., & Jeschke, J. M. (2017). Assessing patterns in introduction pathways of alien species by linking major invasion data bases. *Journal of Applied Ecology*, 54(2), 657–669. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12819>
- Schelhaas, M.-J., Nabuurs, G.-J., & Schuck, A. (2003). Natural disturbances in the European forests in the 19th and 20th centuries: NATURAL DISTURBANCES IN THE EUROPEAN FORESTS. *Global Change Biology*, 9(11), 1620–1633. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00684.x>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schroeder, M., Cokoş, D., Johansson, H., & Sweeney, J. (2021). Attraction of the cerambycid beetles *TETROPIUM GABRIELI*, *T. CASTANEUM* and *T. FUSCUM* to pheromones and host tree volatiles. *Agricultural and Forest Entomology*, 23(2), 203–211. <https://doi.org/10.1111/afe.12422>
- Seebens, H., Bacher, S., Blackburn, T. M., Capinha, C., Dawson, W., Dullinger, S., Genovesi, P., Hulme, P. E., Van Kleunen, M., Kühn, I., Jeschke, J. M., Lenzner, B., Liebhold, A. M., Pattison, Z., Pergl, J., Pyšek, P., Winter, M., & Essl, F. (2021). Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology*, 27(5), 970–982. <https://doi.org/10.1111/gcb.15333>
- Seebens, H., Blackburn, T. M., Dyer, E. E., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Pagad, S., Pyšek, P., van Kleunen, M., Winter, M., Ansong, M., Arianoutsou, M., Bacher, S., Blasius, B., Brockerhoff, E. G., Brundu, G., Capinha, C., Causton, C. E., Celesti-Grapow, L., ... Essl, F. (2018). Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2264–E2273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719429115>
- Seebens, H., Blackburn, T. M., Dyer, E. E., Genovesi, P., Hulme, P. E., Jeschke, J. M., Pagad, S., Pyšek, P., Winter, M., Arianoutsou, M., Bacher, S., Blasius, B., Brundu,

- G., Capinha, C., Celesti-Gradow, L., Dawson, W., Dullinger, S., Fuentes, N., Jäger, H., ... Essl, F. (2017). No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications*, 8(1), 14435. <https://doi.org/10.1038/ncomms14435>
- Seebens, H., Essl, F., Dawson, W., Fuentes, N., Moser, D., Pergl, J., Pyšek, P., Van Kleunen, M., Weber, E., Winter, M., & Blasius, B. (2015). Global trade will accelerate plant invasions in emerging economies under climate change. *Global Change Biology*, 21(11), 4128–4140. <https://doi.org/10.1111/gcb.13021>
- Senf, C., Buras, A., Zang, C. S., Rammig, A., & Seidl, R. (2020). Excess forest mortality is consistently linked to drought across Europe. *Nature Communications*, 11(1), 6200. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19924-1>
- Shackleton, R. T., Shackleton, C. M., & Kull, C. A. (2019). The role of invasive alien species in shaping local livelihoods and human well-being: A review. *Journal of Environmental Management*, 229, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.007>
- Shen, Y.-Y., Chen, X., & Murphy, R. W. (2013). Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. *PLoS ONE*, 8(2), e57125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057125>
- Shepard, D. S., Coudeville, L., Halasa, Y. A., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2011). Economic impact of dengue illness in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 200–207. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
- Shinya, R., Morisaka, H., Kikuchi, T., Takeuchi, Y., Ueda, M., & Futai, K. (2013). Secretome Analysis of the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Reveals the Tangled Roots of Parasitism and Its Potential for Molecular Mimicry. *PLoS ONE*, 8(6), e67377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067377>
- Silva, W. D., Hanks, L. M., Alvarez, J. C. S., Madalon, F. Z., Bento, J. M. S., Bello, J. E., & Millar, J. G. (2020). Variations on a Theme: Two Structural Motifs Create Species-Specific Pheromone Channels for Multiple Species of South American Cerambycid Beetles. *Insects*, 11(4), 222. <https://doi.org/10.3390/insects11040222>
- Silva, W. D., Zou, Y., Bento, J. M. S., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2017). Aggregation-Sex Pheromones and Likely Pheromones of 11 South American Cerambycid Beetles, and Partitioning of Pheromone Channels. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2017.00101>
- Silvestre-Ryan, J., & Holmes, I. (2021). Pair consensus decoding improves accuracy of neural network basecallers for nanopore sequencing. *Genome Biology*, 22(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02255-1>
- Simmons, R. B., & Weller, S. J. (2001). Utility and Evolution of Cytochrome b in Insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(2), 196–210. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0958>

- Simonsen, T. J., Brown, R. L., & Sperling, F. A. H. (2008). Tracing an Invasion: Phylogeography of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in the United States Based on Mitochondrial DNA. *Annals of the Entomological Society of America*, 101(5), 899–905. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[899:TAIPOC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[899:TAIPOC]2.0.CO;2)
- Sire, L., Gey, D., Debruyne, R., Noblecourt, T., Soldati, F., Barnouin, T., Parmain, G., Bouget, C., Lopez-Vaamonde, C., & Rougerie, R. (2019). The Challenge of DNA Barcoding Saproxyllic Beetles in Natural History Collections—Exploring the Potential of Parallel Multiplex Sequencing With Illumina MiSeq. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2019.00495>
- Sire, L., Schmidt Yáñez, P., Bézier, A., Courtial, B., Mbedi, S., Sparmann, S., Larrieu, L., Rougerie, R., Bouget, C., Monaghan, M. T., Herniou, E. A., & Lopez-Vaamonde, C. (2023). *Non-destructive DNA metabarcoding of arthropods using collection medium from passive traps* [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.07.527242>
- Skjøth, C. A., Smith, M., Šikoparija, B., Stach, A., Myszkowska, D., Kasprzyk, I., Radišić, P., Stjepanović, B., Hrga, I., Apatini, D., Magyar, D., Páldy, A., & Ianovici, N. (2010). A method for producing airborne pollen source inventories: An example of *Ambrosia* (ragweed) on the Pannonian Plain. *Agricultural and Forest Meteorology*, 150(9), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2010.05.002>
- Slipinski, A., & Escalona, H. (2016). *Australian Longhorn Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) Volume 2: Subfamily Cerambycinae*. CSIRO Publishing. <https://doi.org/10.1071/9781486304592>
- Soliman, T., Mourits, M. C. M., van der Werf, W., Hengeveld, G. M., Robinet, C., & Lansink, A. G. J. M. O. (2012). Framework for modelling economic impacts of invasive species, applied to pine wood nematode in Europe. *PloS One*, 7(9), e45505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045505>
- Solomon, J. D. 1995. Guide to insect borers in North American broadleaf trees and shrubs. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Agriculture Handbook AH-706
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486–13491. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>
- Springborn, M. R., Keller, R. P., Elwood, S., Romagosa, C. M., Zambrana-Torrelío, C., & Daszak, P. (2015). Integrating invasion and disease in the risk assessment of live bird trade. *Diversity & Distributions*, 21(1), 101–110. <https://doi.org/10.1111/ddi.12281>

- Srivathsan, A., Lee, L., Katoh, K., Hartop, E., Kutty, S. N., Wong, J., Yeo, D., & Meier, R. (2021). ONTbarcode and MinION barcodes aid biodiversity discovery and identification by everyone, for everyone. *BMC Biology*, *19*(1), 217. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01141-x>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stanaway, M. A., Zalucki, M. P., Gillespie, P. S., Rodriguez, C. M., & Maynard, G. V. (2001). Pest risk assessment of insects in sea cargo containers. *Australian Journal of Entomology*, *40*(2), 180–192. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2001.00215.x>
- Steininger, S., Storer, C., Hulcr, J., & Lucky, A. (2015). Alternative preservatives of insect DNA for citizen science and other low-cost applications. *Invertebrate Systematics*, *29*(5), 468–472. <https://doi.org/10.1071/IS15003>
- Stenlid, J., & Oliva, J. (2016). Phenotypic interactions between tree hosts and invasive forest pathogens in the light of globalization and climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1709), 20150455. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0455>
- Stoeckle, M. Y., & Hebert, P. D. N. (2008). Barcode of Life. *Scientific American*, *299*(4), 82–89. <https://www.jstor.org/stable/26000849>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, *183*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Suaste-Dzul, A. P., Rodríguez-Vélez, J. M., Rodríguez-Vélez, B., Arredondo-Bernal, H. C., & Gallou, A. (2019). Non-destructive DNA extraction methods for entomophagous insects with emphasis on biological control. *Genome*, *62*(4), 287–293. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0045>
- Suma, P., La Pergola, A., Longo, S., & Soroker, V. (2014). The use of sniffing dogs for the detection of *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, *42*(2), 269–274. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0330-0>
- Suvorov, A., Scornavacca, C., Fujimoto, M. S., Bodily, P., Clement, M., Crandall, K. A., Whiting, M. F., Schrider, D. R., & Bybee, S. M. (2020). *Deep ancestral introgression shapes evolutionary history of dragonflies and damselflies* [Preprint]. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.25.172619>
- Svenningsen, C. S., Frøslev, T. G., Bladt, J., Pedersen, L. B., Larsen, J. C., Ejrnæs, R., Fløjgaard, C., Hansen, A. J., Heilmann-Clausen, J., Dunn, R. R., & Tøttrup, A. P. (2021). Detecting flying insects using car nets and DNA metabarcoding. *Biology Letters*, *17*(3), rsbl.2020.0833, 20200833. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0833>
- Sweeney, B. W., Battle, J. M., Jackson, J. K., & Dapkey, T. (2011). Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and

- water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1), 195–216. <https://doi.org/10.1899/10-016.1>
- Sweeney, J. D., Silk, P. J., & Grebennikov, V. (2014). Efficacy of semiochemical-baited traps for detection of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in the Russian Far East. *European Journal of Entomology*, 111(3), 397–406. <https://doi.org/10.14411/eje.2014.049>
- Sweeney, J., Hughes, C., Webster, V., Kostanowicz, C., Webster, R., Mayo, P., & Allison, J. D. (2020). Impact of Horizontal Edge–Interior and Vertical Canopy–Understory Gradients on the Abundance and Diversity of Bark and Woodboring Beetles in Survey Traps. *Insects*, 11(9), 573. <https://doi.org/10.3390/insects11090573>
- Syromyatnikov, M. Y., Golub, V. B., Kokina, A. V., Soboleva, V. A., & Popov, V. N. (2017). DNA barcoding and morphological analysis for rapid identification of most economically important crop-infesting Sunn pests belonging to Eurygaster Laporte, 1833 (Hemiptera, Scutelleridae). *ZooKeys*, 706, 51–71. <https://doi.org/10.3897/zookeys.706.13888>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA: ENVIRONMENTAL DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding: NEXT-GENERATION DNA METABARCODING. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Tang, M., Hardman, C. J., Ji, Y., Meng, G., Liu, S., Tan, M., Yang, S., Moss, E. D., Wang, J., Yang, C., Bruce, C., Nevard, T., Potts, S. G., Zhou, X., & Yu, D. W. (2015). High-throughput monitoring of wild bee diversity and abundance via mitogenomics. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1034–1043. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12416>
- Tavakilian GL, Chevillotte H (2022) Titan: base de données internationales sur les Cerambycidae ou Longicornes.
- Tavakilian, G., Berkov, A., Meurer-Grimes, B., & Mori, S. (1997). Neotropical tree species and their faunas of xylophagous longicorns (Coleoptera: Cerambycidae) in French Guiana. *The Botanical Review*, 63(4), 303–355. <https://doi.org/10.1007/BF02856596>
- Tedersoo, L., Drenkhan, R., Anslan, S., Morales-Rodriguez, C., & Cleary, M. (2019). High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: Overview and practical recommendations. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 47–76. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12959>
- Thompson, I. D., Okabe, K., Tylianakis, J. M., Kumar, P., Brockerhoff, E. G., Schellhorn, N. A., Parrotta, J. A., & Nasi, R. (2011). Forest Biodiversity and the Delivery of

- Ecosystem Goods and Services: Translating Science into Policy. *BioScience*, 61(12), 972–981. <https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.12.7>
- Tobin, P. C. (2018). Managing invasive species. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1686. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15414.1>
- Touroult, J., & Poirier, E. (2021). Nouvelles espèces et nouveaux signalements de longicornes des Petites Antilles (Coleoptera, Cerambycidae). *Bulletin de La Société Entomologique de France*, 126(1), 15–24. [https://doi.org/10.32475/bsef\\_2161](https://doi.org/10.32475/bsef_2161)
- Touroult, J., Cima, V., Bouyon, H., Hanot, C., Horellou, A. & Brustel, H. 2019. Longicornes de France – Atlas préliminaire (Coleoptera : Cerambycidae & Vesperidae). Supplément au bulletin d'ACOREP-France, Paris. 176 p.
- Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PloS One*, 12(4), e0176608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>
- Turbelin, A. J., Malamud, B. D., & Francis, R. A. (2017). Mapping the global state of invasive alien species: patterns of invasion and policy responses: Mapping the global state of invasive alien species. *Global Ecology and Biogeography*, 26(1), 78–92. <https://doi.org/10.1111/geb.12517>
- Tyagi, K., Kumar, V., Singha, D., Chandra, K., Laskar, B. A., Kundu, S., Chakraborty, R., & Chatterjee, S. (2017). DNA Barcoding studies on Thrips in India: Cryptic species and Species complexes. *Scientific Reports*, 7(1), 4898. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05112-7>
- Urvois, T., Perrier, C., Roques, A., Sauné, L., Courtin, C., Li, Y., Johnson, A. J., Hulcr, J., Auger-Rozenberg, M.-A., & Kerdelhué, C. (2022). A first inference of the phylogeography of the worldwide invader *Xylosandrus compactus*. *Journal of Pest Science*, 95(3), 1217–1231. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01443-7>
- Valan, M., Makonyi, K., Maki, A., Vondráček, D., & Ronquist, F. (2019). Automated Taxonomic Identification of Insects with Expert-Level Accuracy Using Effective Feature Transfer from Convolutional Networks. *Systematic Biology*, 68(6), 876–895. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syz014>
- Vallardes L. & Réglade M. 2019. Poursuite de l'expansion de *Xylotrechus stebbingi* Gahan, 1906 en France (Coleoptera Cerambycidae). *L'Entomologiste*, 75(1) : 9-12.
- Vamos, E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>



- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>
- Venette, R. C., & Hutchison, W. D. (2021). Invasive Insect Species: Global Challenges, Strategies & Opportunities. *Frontiers in Insect Science*, 1, 650520. <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.650520>
- Vink, C. J., Thomas, S. M., Paquin, P., Hayashi, C. Y., & Hedin, M. (2005). The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics*, 19(2), 99–104. <https://doi.org/10.1071/IS04039>
- Vitali, F., & Schmitt, T. (2017). Ecological patterns strongly impact the biogeography of western Palaearctic longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycoidea). *Organisms Diversity & Evolution*, 17(1), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s13127-016-0290-6>
- Walsh, J. R., Pedersen, E. J., & Vander Zanden, M. J. (2018). Detecting species at low densities: a new theoretical framework and an empirical test on an invasive zooplankton. *Ecosphere*, 9(11), e02475. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2475>
- Walther, G.-R., Roques, A., Hulme, P. E., Sykes, M. T., Pyšek, P., Kühn, I., Zobel, M., Bacher, S., Botta-Dukát, Z., Bugmann, H., Czúcz, B., Dauber, J., Hickler, T., Jarošík, V., Kenis, M., Klotz, S., Minchin, D., Moora, M., Nentwig, W., ... Settele, J. (2009). Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(12), 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.008>
- Wandeler, P., Hoeck, P. E. A., & Keller, L. F. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(12), 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.017>
- Wang, L., Li, C., Luo, Y., Wang, G., Dou, Z., Haq, I. U., Shang, S., & Cui, M. (2023). Current and future control of the wood-boring pest *Anoplophora glabripennis*. *Insect Science*, 1744-7917.13187. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13187>
- Wang, Q. (2017). *Cerambycidae of the World: Biology and Pest Management*. CRC Press.
- Weigand, H., Beermann, A. J., Čiampor, F., Costa, F. O., Csabai, Z., Duarte, S., Geiger, M. F., Grabowski, M., Rimet, F., Rulik, B., Strand, M., Szucsich, N., Weigand, A. M., Willassen, E., Wyler, S. A., Bouchez, A., Borja, A., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Ferreira, S., ... Ekrem, T. (2019). DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of The Total Environment*, 678, 499–524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>
- Wermelinger, B., Flückiger, P. F., Obrist, M. K., & Duelli, P. (2007). Horizontal and vertical distribution of saproxylic beetles (Col., Buprestidae, Cerambycidae, Scolytinae) across sections of forest edges. *Journal of Applied Entomology*, 131(2), 104–114. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01128.x>

- White, D. J., Wolff, J. N., Pierson, M., & Gemmell, N. J. (2008). Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*, *17*(23), 4925–4942. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03982.x>
- Wickham, J. D., Harrison, R. D., Lu, W., Chen, Y., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2021). Rapid Assessment of Cerambycid Beetle Biodiversity in a Tropical Rainforest in Yunnan Province, China, Using a Multicomponent Pheromone Lure. *Insects*, *12*(4), 277. <https://doi.org/10.3390/insects12040277>
- Wickham, J. D., Harrison, R. D., Lu, W., Guo, Z., Millar, J. G., Hanks, L. M., & Chen, Y. (2014). Generic Lures Attract Cerambycid Beetles in a Tropical Montane Rain Forest in Southern China. *Journal of Economic Entomology*, *107*(1), 259–267. <https://doi.org/10.1603/EC13333>
- Wickham, J. D., Lu, W., Jin, T., Peng, Z., Guo, D., Millar, J. G., Hanks, L. M., & Chen, Y. (2016). Prionic Acid: An Effective Sex Attractant for an Important Pest of Sugarcane, *Dorysthenes granulosus* (Coleoptera: Cerambycidae: Prioninae). *Journal of Economic Entomology*, *109*(1), 484–486. <https://doi.org/10.1093/jee/tov266>
- Wickham, J. D., Lu, W., Zhang, L.-W., Chen, Y., Zou, Y., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2016). Likely Aggregation-Sex Pheromones of the Invasive Beetle *Callidiellum villosulum*, and the Related Asian Species *Allotraeus asiaticus*, *Semanotus bifasciatus*, and *Xylotrechus buqueti* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Economic Entomology*, *109*(5), 2243–2246. <https://doi.org/10.1093/jee/tow187>
- Williams, K. E., Huyvaert, K. P., & Piaggio, A. J. (2016). No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis. *BMC Research Notes*, *9*, 298. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2104-5>
- Williamson, M. H., & Fitter, A. (1996). The characters of successful invaders. *Biological Conservation*, *78*(1–2), 163–170. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00025-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00025-0)
- Worner, S. P., & Gevrey, M. (2006). Modelling global insect pest species assemblages to determine risk of invasion: *Modelling risk of pest invasion using ANN*. *Journal of Applied Ecology*, *43*(5), 858–867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01202.x>
- Wu, Y., Trepanowski, N. F., Molongoski, J. J., Reagel, P. F., Lingafelter, S. W., Nadel, H., Myers, S. W., & Ray, A. M. (2017). Identification of wood-boring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade-associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. *Scientific Reports*, *7*(1), 40316. <https://doi.org/10.1038/srep40316>
- Xu, T., Yasui, H., Teale, S. A., Fujiwara-Tsujii, N., Wickham, J. D., Fukaya, M., Hansen, L., Kiriya, S., Hao, D., Nakano, A., Zhang, L., Watanabe, T., Tokoro, M., & Millar, J. G. (2017). Identification of a male-produced sex-aggregation pheromone for a highly invasive cerambycid beetle, *Aromia bungii*. *Scientific Reports*, *7*(1), 7330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07520-1>

- Yotkham, S., Suttiprapan, P., Likhitrakarn, N., Sulin, C., & Srisuka, W. (2021). Biodiversity and Spatiotemporal Variation of Longhorn Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) in Tropical Forest of Thailand. *Insects*, 12(1), 45. <https://doi.org/10.3390/insects12010045>
- Young, R. G., Milián-García, Y., Yu, J., Bullas-Appleton, E., & Hanner, R. H. (2021). Biosurveillance for invasive insect pest species using an environmental DNA metabarcoding approach and a high salt trap collection fluid. *Ecology and Evolution*, 11(4), 1558–1569. <https://doi.org/10.1002/ece3.7113>
- Zenker, M. M., Rougerie, R., Teston, J. A., Laguerre, M., Pie, M. R., & Freitas, A. V. L. (2016). Fast Census of Moth Diversity in the Neotropics: A Comparison of Field-Assigned Morphospecies and DNA Barcoding in Tiger Moths. *PLOS ONE*, 11(2), e0148423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148423>
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00082.x>
- Zhang, G. K., Chain, F. J. J., Abbott, C. L., & Cristescu, M. E. (2018). Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 11(10), 1901–1914. <https://doi.org/10.1111/eva.12694>
- Zinger, L., Taberlet, P., Schimann, H., Bonin, A., Boyer, F., De Barba, M., Gaucher, P., Gielly, L., Giguët-Covex, C., Iribar, A., Réjou-Méchain, M., Rayé, G., Rioux, D., Schilling, V., Tymen, B., Viers, J., Zouiten, C., Thuiller, W., Coissac, E., & Chave, J. (2019). Body size determines soil community assembly in a tropical forest. *Molecular Ecology*, 28(3), 528–543. <https://doi.org/10.1111/mec.14919>
- Ziska, L., Knowlton, K., Rogers, C., Dalan, D., Tierney, N., Elder, M. A., Filley, W., Shropshire, J., Ford, L. B., Hedberg, C., Fleetwood, P., Hovanky, K. T., Kavanaugh, T., Fulford, G., Vrtis, R. F., Patz, J. A., Portnoy, J., Coates, F., Bielory, L., & Frenz, D. (2011). Recent warming by latitude associated with increased length of ragweed pollen season in central North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4248–4251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014107108>
- Zizka, V. M. A., Leese, F., Peinert, B., & Geiger, M. F. (2019). DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher-preserving biodiversity assessment method. *Genome*, 62(3), 122–136. <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0048>
- Zorović, M., & Čokl, A. (2015). Laser vibrometry as a diagnostic tool for detecting wood-boring beetle larvae. *Journal of Pest Science*, 88(1), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0567-5>
- Žunič Kosi, A., Zou, Y., Hoskovec, M., Vrezec, A., Stritih, N., & Millar, J. G. (2017). Novel, male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia alpina*,

a priority species of European conservation concern. *PLOS ONE*, 12(8), e0183279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183279>

Žunič-Kosi, A., Stritih-Peljhan, N., Zou, Y., McElfresh, J. S., & Millar, J. G. (2019). A male-produced aggregation-sex pheromone of the beetle *Arhopalus rusticus* (Coleoptera: Cerambycidae, Spondyliinae) may be useful in managing this invasive species. *Scientific Reports*, 9(1), 19570. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56094-7>

Loïs VEILLAT

## Approches génomiques pour la biodétection d'insectes invasifs forestiers

Les invasions biologiques, en particulier celles d'insectes xylophages comme les cérambycides, sont en constante augmentation, principalement en raison du changement climatique et de l'intensification des échanges commerciaux. Ces insectes, transportés principalement par le commerce international du bois, s'établissent dans de nouveaux écosystèmes dans lesquels ils n'ont pas forcément d'ennemis naturels. Une fois établis, ils peuvent causer des dégâts considérables aux forêts et aux zones urbanisées, menaçant ainsi la biodiversité, l'économie et la santé des écosystèmes. Ces invasions nécessitent donc une surveillance et une gestion rigoureuses pour prévenir et atténuer leurs impacts dévastateurs. Dans ce contexte, cette thèse a pour objectifs principaux : (i) évaluer l'efficacité du métabarcoding, une méthode permettant d'identifier simultanément et rapidement plusieurs espèces d'insectes collectées dans un même piège, en utilisant le séquenceur MinION d'Oxford Nanopore®. Ce séquenceur présente l'avantage d'être portable et peu coûteux, le rendant ainsi plus accessible que les technologies concurrentes. (ii) Créer une librairie de référence de codes-barres moléculaires pour les cérambycides capturés en Europe afin de fournir à la communauté scientifique une base de données pour effectuer des analyses fiables d'identification basées sur l'ADN. (iii) Étudier la structure génétique des populations invasives d'une espèce exotique introduit dans le bassin méditerranéen (*Xylotrechus stebbingi*) afin de mieux comprendre sa dynamique d'invasion de cet insecte originaire d'Asie. Concernant le premier objectif de cette thèse, nos résultats ont montré que le séquenceur MinION d'Oxford Nanopore® était performant pour la détection et l'identification rapide d'espèces invasives, par comparaison aux technologies de séquençage Illumina® et IonTorrent. Nos résultats montrent également que la méthode de piégeage et de préservation des échantillons dans les pièges est un prérequis essentiel qui conditionne la détection fiable des espèces présentes dans les échantillons. En ce qui concerne le deuxième chapitre, nous avons pu assembler 2,928 séquences de codes-barres ADN pour 147 espèces de cérambycides, soit plus de 79% des 185 espèces capturées en Europe à l'aide de pièges multi-phéromonaux. Cette nouvelle base de données pourrait être utilisée pour identifier avec précision le contenu des pièges multi-phéromonaux déployés en Europe lors d'analyses de codes-barres ou de métabarcodes. Enfin, dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons mis en évidence que l'invasion du xylophage *Xylotrechus stebbingi* dans le bassin méditerranéen résultait d'une série d'introductions multiples, probablement en lien avec les échanges commerciaux maritimes plutôt qu'à une unique introduction qui se serait propagée au fil du temps. Ces résultats impliquent que cette espèce, hautement polyphage et à fort potentiel invasif, risque d'envahir de nouvelles régions du monde (en dehors du bassin méditerranéen) dans les prochaines années via le transport maritime. Par conséquent, il est nécessaire de rester vigilant dans les zones portuaires afin de limiter au maximum la propagation de cet insecte.

Mots clés : Biosurveillance, Biologie de l'invasion, Bioinformatique, Cerambycidae, Barcoding, Métabarcoding.

## Genomic approaches for detecting invasive forest insects

Biological invasions, particularly those of xylophagous insects such as cerambycids, are constantly increasing, mainly due to climate change and the intensification of trade exchanges. These insects, primarily transported through international wood trade, establish themselves in new ecosystems where they may not have natural enemies. Once established, they can cause considerable damage to forests and urban areas, thus threatening biodiversity, the economy, and the health of ecosystems. Therefore, these invasions require rigorous monitoring and management to prevent and mitigate their devastating impacts. In this context, this thesis has the following main objectives : (i) to assess the effectiveness of metabarcoding, a method that allows for the simultaneous and rapid identification of multiple insect species collected in the same trap, using the MinION sequencer from Oxford Nanopore®. This sequencer has the advantage of being portable and inexpensive, making it more accessible than competing technologies. (ii) To create a reference library of molecular barcodes for Cerambycids trapped in Europe to provide the scientific community with a database for reliable DNA-based identification analyses. (iii) To study the genetic structure of invasive populations of an exotic species introduced from Asia to the Mediterranean basin (*Xylotrechus stebbingi*) to better understand the invasion dynamics of this insect native to Asia. Regarding the first objective of this thesis, our results showed that the MinION sequencer from Oxford Nanopore® was efficient for the rapid detection and identification of invasive species, in comparison to Illumina® and IonTorrent sequencing technologies. Our results also show that the trapping method and sample preservation in the traps are essential prerequisites for the reliable detection of species present in the samples. For the second chapter, we assembled 2,928 DNA barcode sequences from 147 species of cerambycids, representing over 79% of the 185 species captured in Europe using multi-pheromone traps. This new database could be used to accurately identify the contents of multi-pheromone traps deployed in Europe during barcode or metabarcoding analyses. Finally, in the third chapter of this thesis, we demonstrated that the invasion of the xylophagous *Xylotrechus stebbingi* in the Mediterranean basin resulted from a series of multiple introductions, probably linked to maritime trade exchanges rather than a single introduction that would have spread over time. These results imply that this highly polyphagous species has a strong invasive potential and is likely to invade new regions of the world (outside the Mediterranean basin) in the coming years through maritime transport. Consequently, it is necessary to remain vigilant in port areas to limit the spread of this insect as much as possible.

Keywords: Biomonitoring, Invasion biology, Bioinformatics, Cerambycidae, Barcoding, Metabarcoding.



UR0633 Zoologie Forestière (URZF)  
INRAE CENTRE-VAL DE LOIRE  
2163 Avenue de la pomme de pin  
CS 40001 Ardon  
45075 Orléans cedex 2

