



李秀敏, 戎际达, 刘一右, 范娇娇, 任国栋. 基于 DNA 序列信息的贞琵甲属物种界定分析 (鞘翅目: 拟步甲科: 琵甲亚科) [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 1038–1045.

基于 DNA 序列信息的贞琵甲属物种界定分析 (鞘翅目: 拟步甲科: 琵甲亚科)

李秀敏, 戎际达, 刘一右, 范娇娇, 任国栋*

(河北大学生命科学学院, 河北大学生命科学与绿色发展研究院, 河北省动物系统学与应用重点实验室, 河北保定 071002)

摘要: 贞琵甲属 *Agnaptoria* 是小琵甲亚族 Gnaptorinina 中第三大属和青藏高原特有类群, 已知 36 种/亚种。本文选取 3 个线粒体基因 (COI; Cytb; 16S rDNA) 和 1 个核基因 (28S rDNA-D2) 片段, 采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建了该属的系统发育树; 运用 ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning)、GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) 和 PTP (Poisson Tree Processes) 3 种方法对该属进行了分子物种界定分析。结果表明: 综合运用 3 种分子物种界定方法的界定结果与形态鉴定结果基本吻合。依据形态特征与分子物种界定技术相结合的综合鉴定方法, 大大提高了该类群的物种鉴定效率, 为该类群未来在系统发育、地理分布格局演化等方面的研究提供了可靠的分子数据。

关键词: 贞琵甲属; 系统发育; 物种界定; DNA

中图分类号: Q968.1; Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-1038-08

Molecular species delimitation of the genus *Agnaptoria* Reitter, 1887 based on DNA sequence (Coleoptera, Tenebrionidae, Blaptinae)

LI Xiu-Min, Rong Ji-Da, Liu Yi-You, FAN Jiao-Jiao, REN Guo-Dong* (Key Laboratory of Zoological Systematics and Application of Hebei Province, College of Life Sciences, Institute of Life Science and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China)

Abstract: With 36 described species or subspecies, *Agnaptoria* Reitter is the third-most species-rich genus and endemic taxa of the Qinghai-Tibet Plateau in the darkling beetle subtribe Gnaptorinina (Tenebrionidae: Tenebrionina). In this study, phylogenetic analyses were reconstructed based on the concatenated dataset of one nuclear (28S rDNA-D2) and three mitochondrial genes (COI, Cytb, and 16S rDNA) under maximum likelihood (ML). We implemented multiple molecular species delimitation approaches (Assemble Species by Automatic Partitioning, ASAP; Generalized Mixed Yule Coalescent, GMYC; and Poisson Tree Processes, PTP) to reassess the status of *Agnaptoria* species. The results showed that three molecular species identification methods were consistent with those of morphological defined. The method of comprehensive identification of species based on morphological characteristics and molecular species delimitation technology has greatly improved the efficiency of species identification, this study provides valuable molecular data for phylogenetic and evolution of geographical distribution pattern studies.

Key words: *Agnaptoria*; phylogenetics; species delimitation; DNA

基金项目: 河北省自然科学基金 (面上项目) (C2021201020); 国家自然科学基金项目 (面上项目) (32170477)

作者简介: 李秀敏, 女, 博士, 实验师, 研究方向为昆虫系统学和生物地理学, E-mail: lixiumin@hbu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 任国栋, 博士, 教授, 研究方向为昆虫系统学和生物地理学, E-mail: gdren@hbu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-03-27; 接受日期 Accepted: 2022-08-04

青藏高原是全球生物多样性热点地区之一, 以拥有大量的特有物种而闻名 (Mittermeier *et al.*, 2005)。贞琵甲属 *Agnaptoria* Reitter 是青藏高原的特有属, 隶属于鞘翅目 Coleoptera 拟步甲科 Tenebrionidae 琵甲亚科 Blaptinae 琵甲族 Blaptini, 主要分布在 3 000 m 以上的高海拔地区, 是琵甲族小琵甲亚族中的第三大属, 模式种为 *Agnaptoria rubripes* Reitter, 1887。目前该属已知 36 种/亚种, 分布于中国西藏、青海、四川和甘肃 4 省 (Reitter, 1887, 1893; Medvedev, 1998, 1999, 2002, 2006, 2008; 石爱民等, 2005, 2007; Ren and Liu 2009; Ren *et al.* 2016)。该属的主要形态及生物学特征如下: 体中小型, 黑至红棕色; 第 1~2 节触角红色/棕色; 前胸背板横宽; 鞘翅中部两侧平行; 足细长, 胫节自基部向端部强烈变宽, 基部通常为红色或红褐色, 跗节黑色, 跗节短于胫节; 后翅愈合, 不能飞行, 主要栖息于石块或腐殖质下, 夜出性活动, 遇到惊扰时, 能从腹部特殊的腺体内散发出强烈的刺鼻性气味。

随着全球气候变化等环境因子的改变, 物种正在以惊人的速度消失, 而越来越多的研究表明生物多样性丧失对生态系统的功能有着巨大影响 (Cardinale *et al.*, 2012)。鉴于高海拔地区的物种分化强烈, 以及基于传统的形态特征进行分类的局限性, 加快物种发现和认知尤为重要, 特别是生物多样性热点地区的物种多样性。近年来, DNA 序列信息也被广泛应用于无先验物种信息的物种界定, 在越来越多的类群中得到广泛应用, 确立了许多物种的分类地位和新种地位 (Yeates *et al.*, 2011; Carstens *et al.*, 2013; Toussaint *et al.*, 2015; Soldati *et al.*, 2017)。尤其是在形态上相近的物种间利用 DNA 序列信息来划定物种边界, 验证形态物种的有效性, 已成为快速识别和描述物种、加速发现和认识种类繁多的昆虫世界的一种有效手段。分子物种界定方法结合形态证据进行准确的物种界定, 以揭示某一类群的系统发育关系, 从新的视角理解生物多样性时空演变格局的形成过程。因此, 本研究选取贞琵甲属 15 个种的 30 个样品, 选择 4 个基因片段 (COI; Cytb; 16S rDNA; 28S rDNA-D2) 作为分子标记, 构建该属部分物种的系统发育关系, 运用分子证据对以形态特征建立的已知物种分类地位进行验证, 为该属未知种类的认知以及其物种多样性分布格局的形成和演变奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究选取贞琵甲属 15 个物种的 30 个样本作为研究对象, 主要来自于近几年野外采集的酒精浸泡标本及部分馆藏干制标本。首先在 Nikon SMZ800 立体显微镜下观察其形态特征, 根据已出版的《中国动物志》拟步甲科 (一) 及相关分类文献依据其形态特征进行分类鉴定 (任国栋等, 2016)。所有样本的采集信息见表 1。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

选取中、后足肌肉组织, 使用 EZNA[®] 昆虫 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-tek, USA), 参照说明书中的操作步骤提取 DNA, 获得的 DNA 存放于 -20℃ 冰箱中保存用于 PCR 扩增。本文选取了 4 对线粒体和核基因进行扩增, 引物由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成 (Simon, 1994; Folmer *et al.*, 1994; Belshaw *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 2001)。COI 基因的引物序列为 2183: 5' - CAACA TTTATTTTGATTTTTTGG - 3'; 3014: 5' - TCCAA TGCCTAATCTGCCATATTA - 3'。Cytb 基因的引物序列为 revcb2: 5' - TGAGGACAAATATCATTTTGA GGW - 3'; rebcbj: 5' - TCAGGTCGAGCTCCAATTC ATGT - 3'。16S 基因的引物序列为 13398: 5' - CG CCTGTTTATCAAAAACAT - 3'; 12887: 5' - CCG GTCTGAACTCAGATCAT - 3'。28S 基因的引物序列为 3665: 5' - AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG - 3'; 4068: 5' - TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG - 3'。PCR 采用 TaKaRa Ex Taq 进行 PCR 扩增 (TaKaRa, 中国大连), 反应体系均为 25 μ L, PCR Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, DNA 模板 1.5~5 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 30 个循环包含 94℃ 变性 1 min 30 s, 50~58℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统拍照。确定为目标条带的 PCR 产物由通用生物系统 (安徽) 有限公司完成双向测序, 获得 DNA 序列信息。

1.3 序列数据处理

测序得到的 DNA 序列首先使用 DNASTAR SeqMan v7.1.0 软件查看测序峰图并进行拼接, 为了确保序列的准确性, 对照双向测序峰图, 逐一对所有碱基进行人工校对剪切, 确保读取正确, 然

表 1 所用贞琵甲属样本信息
Table 1 Samples of the genus *Agnaptorina* used in this study

序号 No.	物种名称 Species	采集地信息 Locality	采集日期 Date (yy-mm-dd)	采集人 Collectors
1	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏左贡县鲁巴乡 Luba , Zogang , Tibet	2015-08-09	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
2	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏边坝县马秀乡 Marxog , Banbar , Tibet	2019-07-31	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
3	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏边坝县嘎丁拉山 Gadingla shan , Banbar , Tibet	2015-07-12	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
4	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏左贡县东达山 Dongda shan , Zogang , Tibet	2016-08-11	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
5	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏类乌齐县扎庆孜山 Zhaqingzi shan , Riwoqê , Tibet	2019-07-28	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
6	芒康贞琵甲 <i>Agnaptoria markana</i>	西藏比如县比如镇 Biru , Biru , Tibet	2019-08-01	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
7	粗贞琵甲 <i>Agnaptoria ruida</i>	四川巴塘县海子山 Haizi shan , Sichuan	2016-08-13	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
8	粗贞琵甲 <i>Agnaptoria ruida</i>	四川巴塘县海子山 Haizi shan , Sichuan	2016-08-13	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
9	粗贞琵甲 <i>Agnaptoria ruida</i>	四川巴城县上德达乡 Shangdeda , Batang , Sichuan	2014-08-15	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
10	科氏贞琵甲 <i>Agnaptoria kozlovi</i>	四川甘孜县卓达拉山 Zhuodala shan , Garzê , Sichuan	2016-08-05	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
11	方胸贞琵甲 <i>Agnaptoria grummi</i>	四川甘孜县四通达乡 Sitongda , Garzê , Sichuan	2016-08-04	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
12	黑贞琵甲指名亚种 <i>Agnaptoria anthracina anthracina</i>	四川德格县雀儿山 Que er shan , Dêgê , Sichuan	2016-06-18	郭向博 Guo XB
13	小型贞琵甲 <i>Agnaptoria minuta</i>	青海班玛县玛可河 Makehe , Qinghai	2013-06-26	石福明 Shi FM
14	<i>Agnaptoria</i> sp. 1	四川白玉县纳塔乡 Nata , Baiyü , Sichuan	2016-08-05	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
15	科氏贞琵甲 <i>Agnaptoria kozlovi</i>	四川德格县错阿乡 Chowa Dêgê , Sichuan	2018-08-24	白兴龙等 Bai XL <i>et al.</i>
16	米洛贞琵甲 <i>Agnaptoria miroshnikovi</i>	四川理塘县卡子拉山 Kazila shan , Litang , Sichuan	2016-08-15	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
17	米洛贞琵甲 <i>Agnaptoria miroshnikovi</i>	四川雅江县 Yajiang , Sichuan	2012-07-09	黄灏 Huang H

续表 1 Continued table 1

序号 No.	物种名称 Species	采集地信息 Locality	采集日期 Date (yy-mm-dd)	采集人 Collectors
18	米洛贞琵甲 <i>Agnaptoria miroshnikovi</i>	四川理塘县村戈乡 Cunge , Litang , Sichuan	2016-08-14	李秀敏等 Li XM <i>et al.</i>
19	<i>Agnaptoria</i> sp. 2	四川稻城县桑堆镇 Sangdui , Daocheng , Sichuan	2020-07-26	马明敏 Ma MM
20	甘肃贞琵甲 <i>Agnaptoria gansuensis</i>	青海门源县皇城 Huangcheng , Menyuan , Qinghai	2019-08-13	周志军 Zhou ZJ
21	甘肃贞琵甲 <i>Agnaptoria gansuensis</i>	青海门源县老虎沟 Laohu ditch , Menyuan , Qinghai	2021-07-27	白兴龙 Bai XL
22	甘肃贞琵甲 <i>Agnaptoria gansuensis</i>	青海祁连县青羊沟 Qingyang ditch , Qilian , Qinghai	2021-08-01	白兴龙 Bai XL
23	贝氏贞琵甲 <i>Agnaptoria belousovi</i>	青海班玛县玛可河 Makehe , Banma , Qinghai	2013-06-27	石福明 Shi FM
24	亮洁贞琵甲 <i>Agnaptoria lauta</i>	四川平武县王朗国家自然保护区 Wanglang National Nature Reserve , Pingwu , Sichuan	2021-07-29	秦雨瑶 Qin YY
25	黑头贞琵甲 <i>Agnaptoria nigriceps</i>	西藏察隅县竹瓦根镇 Zhuwagen , Zayü , Tibet	2017-07-29	白兴龙等 Bai XL <i>et al.</i>
26	黑头贞琵甲 <i>Agnaptoria nigriceps</i>	西藏察隅县察瓦龙乡 Cawarong , Zayü , Tibet	2021-07-19	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
27	黑头贞琵甲 <i>Agnaptoria nigriceps</i>	西藏察隅县竹瓦根镇 Zhuwagen , Zayü , Tibet	2017-07-29	白兴龙等 Bai XL <i>et al.</i>
28	黑头贞琵甲 <i>Agnaptoria nigriceps</i>	西藏察隅县竹瓦根镇 Zhuwagen , Zayü , Tibet	2021-07-20	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>
29	林芝贞琵甲 <i>Agnaptoria nyingcha</i>	西藏波密县扎木镇 Zhamog , Bome , Zayu , Tibet	2017-08-01	白兴龙等 Bai XL <i>et al.</i>
30	林芝贞琵甲 <i>Agnaptoria nyingcha</i>	西藏波密县扎木镇 Zhamog , Bome , Tibet	2021-07-25	任国栋等 Ren GD <i>et al.</i>

后将得到的序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中 BLAST 搜索进行同源性分析, 确定所得到的序列是否为目标序列, 并保证序列方向一致。同一基因的目标序列按照分析需要通过 BioEdit v7. 0. 9. 0 (Hall , 1999) 软件导入到一个 . fas 文件中, 然后将 . fas 文件导入软件 PhyloSuite 中, 用 MAFFT 进行序列比对; 然后用 Concatenate Sequence 将 4 个基因片段串联起来; 用 PartitionFinder2 (unlinked) 进行分区, 选择最适合的分区方案; 用 ModelFinder 对优化的数据进

行最优模型选择用于系统发育分析研究 (Lanfear *et al* , 2017; Kalyaanamoorthy *et al* , 2017) 。

1. 4 系统发育树构建

系统发育树的构建采用目前公认的最大似然法 (ML) , 选用与贞琵甲属关系较近的小琵甲属的 9 个物种作为外群。ML 分析使用了 IQ-TREE v1. 6. 6 (Nguyen *et al.* , 2015) 在线软件, 4 个基因片段的联合数据集在 Auto + R6 替代模型下进行运算, bootstrap 分析选用 Ultrafast, 重复抽样次数设为默认值为 1 000, 启用 SH-aLRT, 设置为默认

值 1 000, 快速自举值 (uBV) 大于或等于 95% 被认为是强有力的支持。

1.5 分子物种界定分析

对于分子物种界定分析, 最近研究显示有些方法可能会低估或高估物种的数量 (Dellicour *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018)。因此, 综合使用多种分子物种界定方法, 以更准确地评估物种的分类地位。本研究使用如下 3 种方法的 8 种方案分析物种界限:

(1) ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) 在线分析软件 (Puillandre *et al.*, 2012; <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>)。为了避免与缺失数据相关的距离估计偏差, 本文仅对 COI 和 Cytb 的单基因进行了 ASAP 物种界定分析。将比对好的 .fas 文件导入程序, 基于 K2P 模型计算遗传距离, 其余参数使用缺省值, 即种内差异先验值 P (prior intraspecific divergence) 为 0.001~0.1, 将最小相对间隙宽度 (relative gap width) X 值设置为 0.5, 其余参数为系统默认设置。

(2) GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) 物种界定方法 (Pons *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2012)。先利用 BEAST v2.4.7 (<http://www.beast2.org/>) 获得超度量 (ultrametric) 二叉分支树, 使用 jModelTest 选择最佳核苷酸替代模型。首先, 运行了 1 个联合基因数据集的 BEAST 分析 (去掉所有外群), 然后又对 COI 和 Cytb 数据集进行了单基因的 BEAST 分析 (设置相同)。利用 BEAUti 打开 FAS 格式文件, 依次约束内群为单系群、设置核苷酸替代模型、分子钟、系统树、MCMC 链等, 并生成 xml 文件; BEAST 下运行 xml 文件; Tracer v1.6 对 BEAST 运算结果进行分析, Burn-In 默认为链长 10%, 全部 ESS > 200 表示数据运行很好; 再利用 TreeAnnotator v1.8.2 生成所需系统树; 转换的系统发育树在 R 语言包 “splits” 读取并计算得到物种界定结果, 以与其它分子界定方法、形态鉴定结果对照分析。

(3) PTP (Poisson Tree Processes) 物种界定方法 (Zhang *et al.*, 2013)。本研究使用 PTP 在线程序运行 (<https://species.h-its.org/ptp/>), 共分为 3 组数据进行 PTP 分析: 去掉所有外群后的联合基因的系统发育树、COI 基因系统发育树和 Cytb 基因系统发育树。运行时将 MCMC 代数设置为 100 000 代, 其它参数使用默认值。

2 结果与分析

2.1 系统发育关系

基于贞琵甲 15 个物种的 30 个样本的 4 个基因片段: COI, Cytb, 16S rDNA 和 28S rDNA 的 DNA 序列数据集在 IQ-TREE 软件下构建了 ML 系统发育树 (图 1)。总的来说, 贞琵甲属 15 个物种中的 13 个物种的种间关系得到了较高的支持 (80% 的节点 $uBV \geq 95\%$), 与外群小琵甲属部分物种构成了 2 个分支, 内群分支的单系性也得到了很好的支持 ($uBV = 100$)。

2.2 物种界定结果

利用 3 种分子物种界定分析方法 (ASAP、GMYC 和 PTP) 对单基因片段 (COI 和 Cytb) 和联合基因数据集 (COI, Cytb, 16S rDNA 和 28S rDNA) 片段的数据集对 30 个贞琵甲样品进行了物种界定, 其中 GMYC 和 PTP 两种物种界定方法既使用了联合基因数据集, 也使用了单基因数据集, 而 ASAP 方法只使用了单基因数据集。3 种分子物种界定结果 (共 8 种方案) 推断出的 MOTUs 的数基本一致, PTP 方法的 3 种方案界定出的 MOTU 数以及与其它两种方法在部分 MOTUs 上显示出不同的结果, 且界定的物种数略多。通过形态学鉴定, 30 个样本为 13 个已知物种和 2 个待定种, 其中 13 个物种的形态鉴定结果与分子界定结果完全吻合 (图 1)。

ASAP 方法对单基因 COI 和 Cytb 的界定结果一致, 为确定最终物种的数量, 本研究倾向于先验值在 0.01~0.02 之间, 30 个样品界定为 17 个物种; GMYC 方法使用单基因与联合基因界定的结果基本一致, 为 17~18 个物种 (COI 基因界定出 17 个, Cytb 基因界定出 17 个, 一个物种基因缺失; 联合基因界定出 18 个), 不同的是 COI 基因将 MOTU19 与 MOTU20 界定为 1 个物种, 而 Cytb 基因和联合基因数据集界定为 2 个物种。

PTP 方法的 3 种方案界定出的 MOTU 数以及与其它两种方法的在部分 MOTU 上显示出不同的结果, 且界定的物种数略多于上述两种方法 (COI 基因界定出 19 个物种; Cytb 基因界定出 19 个物种, 一个物种基因缺失; 联合基因界定出 18 个物种)。Cytb 基因将 MOTU1、MOTU2 和 MOTU3 界定为 3 个物种, 而 Cytb 基因和联合基因数据集将其界定为 1 个物种; Cytb 基因将 MOTU17、MOTU18、

MOTU19 和 MOTU20 界定为一个物种, COI 基因与其它 7 种方案结果不同, 将 MOTU17 和 MOTU18 界定为 2 个物种, 而将 MOTU19 和 MOTU20 界定为 1 个物种。

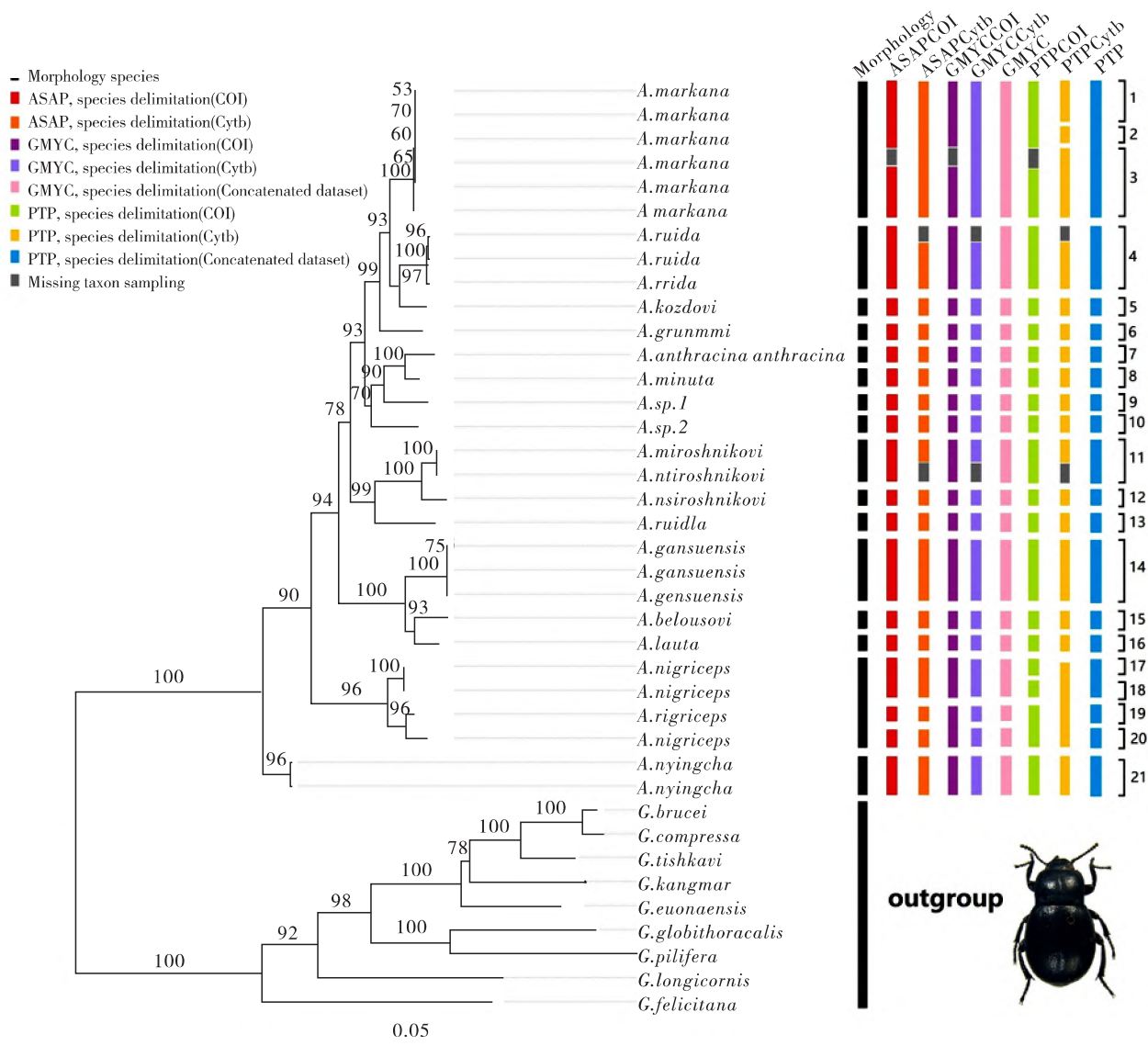


图 1 基于 30 - taxa 的 3 个线粒体基因和 1 个核基因序列 (COI, Cytb, 16S rDNA, 28S rDNA), 2 327 bp 的串联数据集获得的贞琵甲属 *Agnaptoria* 的系统发育树和物种界定结果

Fig. 1 Phylogenetic relationships within the genus *Agnaptoria* and species boundaries. Phylogenetic tree based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. A similar topology was recovered under a maximum likelihood approach.

注: 树的每个节点的支持度由大似然法推断得到的超快 bootstrap 值 (uBV) 表示。彩色柱形条带表示形态物种数 (黑色), 以及 8 种物种划分方案的分子物种界定分析结果 (红色、橙色、紫色、蓝紫色、粉色、绿色、橘黄色和蓝色); 对于单基因 COI/Cytb 的界定结果中, 灰色柱形条带表示缺失的序列信息; 21 个 MOTUs 为 ASAP、GMYC 和 PTP 分子物种界定分析得出的结果。Note: Support for each node was represented by ultrafast bootstrap values (uBV) obtained for the maximum likelihood tree. Vertical coloured bars delineate extant morphospecies (black colour), and the results of the eight separated molecular analyses delimiting species (red, orange, purple, bluish - purple, pink, green, yellow, blue). For the analyses using COI or Cytb genes only, we used grey colour to delineate specimens for which sequencing failed. Numbers on the right represented codes for 21 putative MOTUs delineated using ASAP, GMYC and PTP analyses.

3 结论与讨论

不同的分子物种界定方法界定物种的结果并不完全一致,但是无论使用单基因还是联合基因,分子种界定结果与形态分类结果是大致吻合的,对已知物种分类地位的验证以及提高物种鉴定效率有很大帮助。29 个样品的 CO I 基因序列通过 ASAP 物种界定方法得到了 18 个 MOTUs,通过 GMYC 方法得到了 17 个 MOTUs,通过 PTP 方法得到了 17 个 MOTUs; 28 个样品的 Cytb 基因序列通过 ASAP 和 GMYC 分子物种界定方法均得到了 18 个 MOTUs,通过 PTP 方法得到了 17 个 MOTUs。除 PTP 方法中的 Cytb 基因外,其它 7 种方案都将 *A. markana* 的 5 个样品界定为一个 MOTU; 这一结果与已有研究认为的 GMYC 和 PTP 方法会高估 MOTUs 的数量较为一致 (Lecocq *et al.*, 2015; Dellicour & Flot, 2018; Luo *et al.*, 2018)。除 PTP 方法中的 Cytb 基因的界定结果与形态鉴定结果一致外,其它 7 种方案均将 *A. nigriceps* 的 4 个样品界定为 2~3 个 MOTUs。通过检视不同采样地点的黑头贞琵甲 *A. nigriceps*, 确认其形态特征并无差异。综合考虑,本研究将来自不同采样地点的样品暂时作为一个物种处理。总的来说,ASAP、GMYC 和 PTP 方法的 8 种方案界定结果与形态鉴定结果均呈现较高的吻合度,证明了这 3 种方法综合运用对贞琵甲属进行分子物种界定的有效性。

青藏高原是印度板块与欧亚板块两大陆地板块的剧烈碰撞形成的地球上海拔最高、最年轻的高原。随着青藏高原隆升过程中的地质变化,受到山脉、河流的阻隔,形成“岛屿”化的地理格局,某一种群被限制于特定高度分布并在特定的小尺度生境内繁衍,并以小种群形式存在,从而限制了种群间的基因交流,为遗传物质的分化——新物种的快速形成创造了机会 (Li *et al.*, 2021)。青藏高原这种极端环境下物种形成时间较短,种间识别特征差异不显著,仅依据传统的形态特征很难将其区分开,分子界定结果通常也会出现多于形态物种的现象 (Li *et al.*, 2021)。物种的形成是一个十分复杂的过程,其形成模式一直受到广泛关注 (Futuyma and Mayer, 1980; Taylor and Friesen, 2017)。对分化期较短的物种,个体或种群间因生殖隔离而产生的遗传距离上的差异,因其极小的形态差异,从而可能导致基于进化树

和遗传距离的分子物种界定结果与传统的形态鉴定不完全吻合。青藏高原特异性环境下产生的一些“疑难种”在很多类群中都普遍存在,对于这些物种的界定边界在哪里,还需继续积累更多不同采样地点样本的数量,检视大量标本找出其形态变化规律,并通过增加基因数量或者通过基因组数据来进行其遗传距离的分析,使研究结果尽可能符合客观事实,反应物种真实的分类地位。

运用 DNA 序列与传统的形态学方法相结合鉴定物种,是准确确定物种分类地位的科学方法,脱离传统分类学而单纯开展分子物种鉴定得出的结果并不完全可靠,因此,传统的形态分类学方法与分子鉴定必须结合,才能准确确定物种的分类地位,提高物种鉴定的效率和准确性。本文初步构建了贞琵甲属部分物种的 DNA 序列信息数据库,为贞琵甲的快速、准确鉴定提出了可行方法,对贞琵甲的物种演化和地理分布格局研究也具有重要意义。

参考文献 (References)

- Belshaw R, Quicke DL. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997, 7 (3): 281–293.
- Cardinale BJ, Duffy JE, Gonzalez A, *et al.* Biodiversity loss and its impact on humanity [J]. *Nature*, 2012, 489 (7401): 59–67.
- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, *et al.* How to fail at species delimitation [J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22 (17): 4369–4383.
- Dellicour S, Flot JF. The hitchhiker's guide to single – locus species delimitation [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18 (6): 1234–1246.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3 (5): 294–299.
- Futuyma DJ, Mayer GC. Non – allopatric speciation in animals [J]. *Systematic Biology*, 1980, 29 (3): 254–271.
- Hall TA. BioEdit: A user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1999, 41: 95–98.
- Kalyaanamoorthy S, Minh B, Wong T, *et al.* ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 587–589.
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, *et al.* Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34 (3): 772–773.
- Lecocq T, Dellicour S, Michez D, *et al.* Methods for species delimitation

- in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, Bombus): Towards an integrative approach [J]. *Zoologica Scripta*, 2015, 44 (3): 281 – 297.
- Li JJ, Li Q, Wu YX, et al. Mountains act as museums and cradles for hemipteran insects in China: Evidence from patterns of richness and phylogenetic structure [J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2021, 30 (5): 1070 – 1085.
- Li XM, Bai XL, Kergoat GJ, et al. Phylogenetics, historical biogeography and molecular species delimitation of *Gnaptorina* Reitter (Coleoptera: Tenebrionidae: Blaptini) [J]. *Systematic Entomology*, 2021, 46 (1): 239 – 251.
- Luo A, Ling C, Ho SYW, et al. Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios [J]. *Systematic Biology*, 2018, 67 (5): 830 – 846.
- Medvedev GS. New species of tenebrionid beetles of the tribe Blaptini (Coleoptera, Tenebrionidae) from Hissaro – Darvaz mountains and the Plateau of Tibet [J]. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 1998, 77 (3): 555 – 586.
- Medvedev GS. Taxonomic significance of the structure of genital tubes in tenebrionid beetles of the tribe Blaptini (Coleoptera, Tenebrionidae) and description of a new subgenus and a new species [J]. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 1999, 78 (2): 391 – 405.
- Medvedev GS, Merkl O. *Viettagona vietnamensis* gen. et sp. n. from Vietnam (Coleoptera, Tenebrionidae: Blaptini) [J]. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2002, 48 (4): 317 – 332.
- Medvedev GS. New data on the fauna of the tenebrionid beetle genus *Agnaptoria* Rtt (Coleoptera, Tenebrionidae) of China [J]. *Entomol. Obozrenie*, 2006, 85 (1): 176 – 205.
- Medvedev GS. New species of the Tenebrionid – beetle genera *Tagonoides* Fairm., *Gnaptorina* Rtt. and *Agnaptoria* Rtt. (Coleoptera, Tenebrionidae) from China [J]. *Entomologicheskoe Obozrenie*, 2008, 87: 808 – 830.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, et al. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions [M]. Washington: Conservation International (CI), 2005.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32 (1): 268 – 274.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez – Zurita J, et al. Sequence – based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects [J]. *Systematic Biology*, 2006, 55 (4): 595 – 609.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21 (8): 1864 – 1877.
- Reid NM, Carstens BC. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: A Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12 (1): 196.
- Reitter E. Ueber die Genus-Charaktere der Gattungen *Blaps* Fabr., *Prosodes* Eschsch. und Verwandten [J]. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 1893, 2: 313 – 316.
- Reitter E. Insecta in itinere Cl. N. Przewalsky in Asia Centrali novissime lecta. IX. Tenebrionidae [J]. *Horae Societatis Entomologicae Rossicae*, 1887, 21: 355 – 389.
- Ren GD, Liu HY. A new species of the genus *Agnaptoria* Reitter from Xizang, China (Coleoptera, Tenebrionidae: Blaptini) [J]. *Zootaxa*, 2009, 2169 (1): 55 – 62.
- Ren GD, Ba YB, Liu HY, et al. Fauna Sinica Insecta Vol. 63 Coleoptera: Tenebrionidae (I) [M]. Beijing: Science Press, 2016: 532. [任国栋, 巴义彬, 刘浩宇, 等. 中国动物志 昆虫纲 第六十三卷 鞘翅目: 拟步甲科 (一) [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 532]
- Shi AM, Ren GD. A description of the insects of the genus *Agnaptoria* in China and a new species (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *Entomotaxonomia*, 2005, 27 (4): 277 – 282. [石爱民, 任国栋. 中国贞琵甲属昆虫及 1 新种记述 (鞘翅目: 拟步甲科) [J]. 昆虫分类学报, 2005, 27 (4): 277 – 282]
- Shi AM, Ren GD, Merkl O. Six new species of *Gnaptorina* Reitter, 1887 (Coleoptera, Tenebrionidae: Blaptini) from the Tibet Plateau [J]. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2007, 53 (3): 219 – 238.
- Simmons RB, Weller SJ. Utility and evolution of cytochrome b in insects [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20 (2): 196 – 210.
- Simon C, Frati F, Bekenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87 (6): 651 – 701.
- Soldati L, Condamine FL, Clamens AL, et al. Documenting tenebrionid diversity: Progress on *Blaps* Fabricius (Coleoptera, Tenebrionidae, Tenebrioninae, Blaptini) systematics, with the description of five new species [J]. *European Journal of Taxonomy*, 2017, 282: 1 – 29.
- Taylor RS, Friesen VL. The role of allochrony in speciation [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26 (13): 3330 – 3342.
- Toussaint EFA, Moriniere J, Muller CJ, et al. Comparative molecular species delimitation in the charismatic Nawab butterflies (Nymphalidae, Charaxinae, Polyura) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2015, 91: 194 – 209.
- Yeates DK, Seago A, Nelson L, et al. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? [J]. *Systematic Entomology*, 2011, 36 (2): 209 – 217.
- Zhang JJ, Kapli P, Pavlidis P, et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29 (22): 2869 – 2876.