

引文格式: 付忠洪, 尹晶, 段可怡, 等. 高黎贡山地区尤犀金龟属昆虫物种分子鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2025, 40(3): 28-35. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202501023](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202501023)

高黎贡山地区尤犀金龟属昆虫物种分子鉴定*

付忠洪¹, 尹晶¹, 段可怡¹, 卢斐¹, 易传辉^{1,2}, 柳青³, 和秋菊^{1,4**}

(1. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学云南生物多样性研究院, 云南昆明 650224;

3. 保山学院高黎贡山研究院, 云南省高校滇西昆虫资源保护与利用重点实验室, 云南保山 678000;

4. 西南林业大学, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要: 【目的】应用线粒体 DNA 条形码技术对尤犀金龟属 (*Eupatorus* Burmeister, 1847) 昆虫物种界定进行探索, 以解决该属物种形态鉴定困难的问题。【方法】基于尤犀金龟属物种线粒体 *cox1* 和 *cox2* 基因序列数据集, 使用 Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) 和 Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) 对 3 个形态种进行分子物种界定, 并与形态学鉴定结果进行比较。【结果】使用 ABGD 方法时, *cox1* 数据集的界定结果与形态学鉴定结果一致, *cox2* 数据集的界定结果与形态学鉴定结果存在差异; 使用 bPTP 方法时, 2 种数据集的界定结果均远高于形态学鉴定结果, 且均存在不同程度的过度划分。【结论】*cox1* 是更适合用于鉴定尤犀金龟属昆虫的 DNA 条形码, 使用 ABGD 方法时, 其数据集界定结果与形态学鉴定结果一致。利用分子界定与形态特征鉴定相结合, 可极大地提高鉴定效率和准确性。

关键词: 尤犀金龟属; 分类; 物种分子鉴定; *cox1*; Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

中图分类号: S718.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2025) 03-0028-08

Molecular Identification of *Eupatorus* spp. (Insecta) in the Gaoligong Mountain Region

FU Zhonghong¹, YIN Jing¹, DUAN Keyi¹, LU Fei¹, YI Chuanhui^{1,2}, LIU Qing³, HE Qiuju^{1,4}

(1. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Yunnan Academy of Biodiversity,

Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 3. Research Institute of Gaoligong Mountain,

Key Laboratory of Conservation and Utilization of Insect Resources in Western Yunnan, Baoshan

University, Baoshan 678000, China; 4. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and

Control of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: [Purpose] To explore the species definition of *Eupatorus* Burmeister, 1847 through the application of mitochondrial DNA barcoding technology, resolving the challenges associated with the morphological identification of species within this genus. [Methods] Employing mitochondrial *cox1* and *cox2* gene sequence datasets, the molecular species of the three morphospecies were defined by the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) and Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) methods. Subsequently, the obtained results were compared with those of morphological identifica-

收稿日期: 2025-01-18 修回日期: 2025-05-21 网络首发日期: 2025-06-30

*基金项目: 云南省科技厅科技计划—农业联合专项重点项目 (202301BD070001-004); 怒江下游山地农业生态系统云南省野外科学观测研究站项目 (202305AM340031)。

作者简介: 付忠洪 (1999—), 男, 云南昭通人, 在读硕士研究生, 主要从事昆虫分类研究。

E-mail: 3152248052@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 和秋菊 (1972—), 女, 云南丽江人, 硕士, 副教授, 主要从事昆虫分类研究。E-mail: 13678797631@163.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20250627.1803.007>



tion. [Results] The definition results of the *cox1* dataset using the ABGD method were congruent with the morphological identification outcomes. However, disparities were observed between the *cox2* dataset and the morphological results. In the bPTP method, the definition results of the two datasets were significantly higher than those of morphological identification, demonstrating varying degrees of over-division. [Conclusion] The *cox1* gene is more suitable for use as a DNA barcode in the identification of *Eupatorus* insects. The results of the *cox1* dataset defined by the ABGD method are consistent with morphological identification. By integrating molecular definition and morphological characterization, the efficiency and accuracy of species identification can be substantially enhanced.

Keywords: *Eupatorus*; classification; species molecular identification; *cox1*; Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

尤犀金龟属 (*Eupatorus* Burmeister, 1847) 隶属鞘翅目 (Coleoptera) 金龟科 (Scarabaeidae) 犀金龟亚科 (Dynastinae), 目前已知 7 种, 分布于中国、印度、缅甸、老挝、越南和泰国^[1-3]。中国记录 5 种, 即粗尤犀金龟 [*E. hardwickei* (Hope, 1831)]、素吉尤犀金龟 (*E. sukkiti* Miyashina & Arnaud, 1997)、细尤犀金龟 (*E. gracilicornis* Arrow, 1908)、火角尤犀金龟 (*E. pyros* Prandi & Grossi, 2021) 和犄尤犀金龟 [*E. siamensis* (Castelnau, 1867)], 以云南高黎贡山地区最为集中, 存在 3 个物种同域分布的情况^[3-7]。尤犀金龟幼虫以腐木和腐殖土为食, 在森林生态系统物质循环中具有重要作用; 因其外形独特, 极具观赏价值, 受到许多昆虫爱好者的喜爱, 是国内外备受关注的观赏昆虫; 因具雄性多型, 也是研究物种进化的理想材料^[8-9]。

由于全球气候变化、人为因素等影响, 尤犀金龟属昆虫种群数量急剧下降, 部分已成为濒危物种^[10]。物种准确鉴定是分类研究和濒危物种保护的基础, 但尤犀金龟属昆虫外部形态特征十分相似, 成虫种间个体形态差异极小, 种内普遍存在雄性多型现象, 导致形态分类极为困难, 严重影响了其研究与保护。DNA 条形码技术的提出和应用, 为解决尤犀金龟属昆虫形态鉴定困难的问题提供了可行方案。近年来, 条形码技术在越来越多的类群中得到广泛应用, 并取得了丰硕成果^[11-14]。目前, 对尤犀金龟属昆虫的研究报道主要集中于传统分类、生物学习性、适生区分析等方面^[15-16]; 部分学者基于线粒体基因对其系统发育进行了研究, 结果显示尤犀金龟属为非单系性起源^[17]。高黎贡山位于横断山系南部, 是具有国际意义的陆地生物多样性关键地区^[18]。本研究选

取高黎贡山地区分布的粗尤犀金龟、素吉尤犀金龟和细尤犀金龟为研究材料, 采用线粒体 DNA 条形码技术与形态特征相结合的综合鉴定方法, 对尤犀金龟属昆虫物种进行了准确界定, 以期为该濒危物种的准确鉴定和保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来自西南林业大学标本馆 2020 年收集的馆藏标本, 均采自云南省保山市腾冲市境内, 以无水乙醇浸泡且置于 -40°C 冰箱中保存。依照形态特征将样本初步鉴定为细尤犀金龟、粗尤犀金龟和素吉尤犀金龟 (表 1), 其中雌性 21 头, 雄性 116 头。

1.2 形态鉴定

利用体视显微镜 (Leica S6E) 对 137 头犀金龟的雌雄个体进行形态特征观察和测量。雄性个体选取色型、体长、体宽、鞘翅颜色、鞘翅刻点、鞘翅细沟、前胸背板刻点、额角、前胸前角、前胸背角、唇基前缘中凹、前足胫节基齿及中后足爪对称性共 13 项特征进行观测; 雌性个体选取体色、体长、体宽、鞘翅颜色和鞘翅背板刻点共 5 项特征进行观测。根据形态特征, 参考相关文献资料^[4], 对高黎贡山地区尤犀金龟属昆虫进行形态学鉴定。使用尼康 D810 相机进行标本拍照, 并用 Adobe Photoshop 2019 进行图片处理及图版制作。

1.3 测序与序列分析

1.3.1 DNA 的提取、PCR 扩增及测序

取中胸处肌肉组织, 置于 1.5 mL 无菌离心管中备用。DNA 提取严格按照 BigDye Terminator

v3.1 Cycle Sequencing Kit 试剂盒 (4336921) 说明书推荐步骤进行。通过 PCR 扩增 *cox1* 和 *cox2* 基因片段, 总反应体系为 5.0 μL , 包括: DNA 模板 2.0 μL , 正、反向引物各 1.0 μL , BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 1.0 μL ; 反应程序为: 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2.0 min; 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10.0 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5.0 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2.5 min, 40 个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$

终延伸 2.0 min。采用珠海长辰生物科技有限公司合成的通用引物^[19](表 2) 扩增目的基因序列, PCR 反应完成后, 使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 随后通过凝胶成像系统观察检测结果。将含有目的基因片段的 PCR 产物置于干冰中保存, 并委托通用生物 (安徽) 股份有限公司进行双向测序。

表 1 样本采集信息

Tab. 1 Information of the collected sample

物种 species	样本数 sample size	采集地点 location of collection	种群代码 population code	采集时间 (yyyy-mm-dd) date of collection
细尤犀金龟 <i>Eupatorus gracilicornis</i>	3	曲石镇红木村 Hongmu Village, Qushi Town	HMX	2020-09-14—2020-09-20
	7	芒棒乡大蒿坪村 Dahaoping Village, Mangbang Township	HPX	2020-09-13—2020-09-18
	12	芒棒乡坪田村 Pingtian Village, Mangbang Township	PTX	2020-09-12—2020-09-14
	23	五合乡整顶村 Zhengding Village, Wuhe Township	ZDX	2020-09-12—2020-09-14
粗尤犀金龟 <i>E. hardwickei</i>	9	芒棒乡横河村 Henghe Village, Mangbang Township	HHC	2020-08-20—2020-08-27
	2	芒棒乡大蒿坪村 Dahaoping Village, Mangbang Township	HPC	2020-08-12—2020-08-15
	2	五合乡整顶村 Zhengding Village, Wuhe Township	ZDC	2020-09-12—2020-09-14
素吉尤犀金龟 <i>E. sukkiti</i>	13	滇滩镇 Diantan Town	DTS	2022-08-02
	2	芒棒乡横河村 Henghe Village, Mangbang Township	HHS	2020-08-20—2020-08-27
	2	曲石镇红木村 Hongmu Village, Qushi Town	HMS	2020-09-14—2020-09-20
	12	芒棒乡大蒿坪村 Dahaoping Village, Mangbang Township	HPS	2020-08-12—2020-08-15
	2	界头镇沙坝村 Shaba Village, Jietou Town	SBS	2020-08-26
	17	明光镇顺龙村 Shunlong Village, Mingguang Town	SLS	2020-08-28—2020-08-29
	2	芒棒乡上营村 Shangying Village, Mangbang Township	SYS	2020-06-25—2020-06-30
	3	五合乡整顶村 Zhengding Village, Wuhe Township	ZDS	2020-09-01—2020-09-09
26	界头镇中塘村 Zhongtang Village, Jietou Town	ZTS	2020-08-26—2020-08-28	

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequence

基因 gene	引物名称 primer name	引物序列 (5'→3') primer sequence
<i>cox1</i>	J-L1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	N-H2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAT
<i>cox2</i>	TL2-J-3033	TCTAATATGGCAGATTAGTGC
	cox2-N	GAGACCAGTACTTGCTTTCAGTCATC

1.3.2 序列检测与拼接

获得序列结果后检查峰图质量, 以确保其准确性。利用 MEGA v11 检查是否存在假基因, 并对序列进行对比剪切和校正。在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中进行 BLAST 比对和同源性分析, 确定所测片段是否为所需要的目的片段。利用 BioEdit 中的 Clustal W 对片段序列进行多重序列比对, 将比对后序列两端不稳定的部分统一修剪, 使序列更加整齐, 同时使结果具有差异性与代表性。

1.3.3 基因序列分析

利用 MEGA v11 对数据的碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、自裔位点、遗传距离、转换数 (transition, Ts)、颠换数 (transversion, Tv) 以及 Ts 与 Tv 的比值 (*R* 值) 进行分析。在 DAMBE v7.0 中进行碱基替换饱和性分析, 检测序列数据是否具有系统发育信号。利用 DnaSP v5.10 对基因序列进行单倍型分析, 相同序列只保留 1 条, 剔除其余相同序列后得到单倍型。在 Seq. Analysis 中检查序列替换是否达到饱和状态, 以及是否适合用于建树。

1.4 物种分子界定

使用基于遗传距离的 Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) 方法和基于树拓扑的 Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) 方法对尤犀金龟属进行界定, 并进行分子分支或分子操作分类单元 (molecular operational taxonomic units, MOTUs)

的划分; 检测样本序列的碱基组成、 R 值、碱基替换和系统发育信号, 以确定 *cox1* 和 *cox2* 基因片段是否适用于尤犀金龟属昆虫的物种界定。为避免重复序列导致物种过度划分, 2 种界定方法均采用基因单倍型序列进行分析。单倍型序列通过 DnaSP v5.10 分析获得。

1.4.1 ABGD 分析

将获得的尤犀金龟属 20 条 *cox1* 单倍型和 25 条 *cox2* 单倍型序列上传到 ABGD 在线网站 (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) 进行分析。设定种内差异先验值 (P 值), 其最大值 (P_{\max}) 为 0.100, 最小值 (P_{\min}) 为 0.001; 迭代次数设置为 10, 相对分歧宽度为 1, Nb bins 为 20, 分别选择 Jukes-Cantor (JC69)、Kimura 2-P (K80) 和 Simple Distance 3 种距离模型进行物种划分。

1.4.2 bPTP 分析

经 PhyloSuite 软件中的 ModelFinder 计算, *cox1* 和 *cox2* 的核苷酸替代最适模型均为 HKY+F+G4, 将模型文件输入到 MrBayes, 设置参数为 200 万代, 每 100 代取样 1 次, 选择龙牙姬姬 (*Xylotrupes beckeri*) 为外群, 构建贝叶斯系统发育树 (Bayesian inference, BI)。将构建的 BI 在 Figtree 中选择 rooted 选项后, 保存为 .nex 文件, 提交至 bPTP 在线网站 (<https://species.h-its.org/ptp/>), My tree 设置为 rooted, No.MCMC generations 为 100000, Burn-in 为 0.1, Outgroup taxa names 位置输入外群名称, 其他设置为默认参数, 输出结果, 红色标注即为同一物种。

2 结果与分析

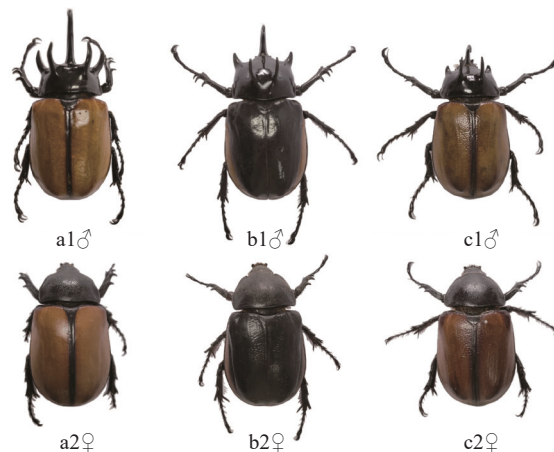
2.1 形态特征

经形态鉴定, 高黎贡山地区尤犀金龟属昆虫可划分为细尤犀金龟 (45 头)、粗尤犀金龟 (13 头) 和素吉尤犀金龟 (79 头) 3 种 (图 1)。3 种尤犀金龟雄性个体可通过比较色型、鞘翅颜色、鞘翅刻点、额角、前胸前角和前胸背角进行鉴定; 雌性个体可通过比较色型、鞘翅颜色和鞘翅背板刻点进行鉴定。在形态鉴定中发现, 雄虫的中型个体和小型个体与雌虫的许多特征不易区分, 极易鉴定错误。

2.2 线粒体基因特征

2.2.1 DNA 序列碱基组成

对尤犀金龟属昆虫进行总 DNA 的提取, 并



注: a1 和 a2 为细尤犀金龟; b1 和 b2 为粗尤犀金龟; c1 和 c2 为素吉尤犀金龟。

Note: a1 and a2 are *E. gracilicornis*; b1 and b2 are *E. hardwickei*; c1 and c2 are *E. sukkiti*.

图 1 3 种尤犀金龟背面照

Fig. 1 Dorsal habitus photographs of three species of *Eupatorus* spp.

对相关基因进行剪切拼接和校正, 获得 *cox1* 和 *cox2* 基因序列各 137 条。*cox1* 基因序列的碱基长度为 604 bp, 保守位点 534 个, 变异位点 70 个, 简约位点 68 个, 自裔位点 2 个; A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 29.35%、36.58%、16.82% 和 17.25%, A+T 碱基的平均含量为 65.93%, 显著高于 G+C 的平均含量 (34.07%), 表现出明显的 A+T 碱基偏倚性。*cox2* 基因序列的碱基长度为 673 bp, 保守位点 614 个, 变异位点 59 个, 简约位点 55 个, 自裔位点 4 个; A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 34.78%、36.70%、12.07% 和 16.44%, A+T 碱基的平均含量为 71.49%, 显著高于 G+C 的平均含量 (28.51%), 表现出明显的 A+T 碱基偏倚性。

2.2.2 R 值及碱基替换分析

cox1 基因序列的 R 值为 9.12, *cox2* 基因序列的 R 值为 13.17。序列中核苷酸替换多为同义替换, 转换多发生在 TT 和 AA 之间, 颠换主要发生于 AT 之间, CG 和 GC 的颠换频率为 0。随着进化时间和遗传距离的不断增加, 转换和颠换也会持续发生, 但颠换掩盖转换, 且随着时间的延长, 颠换的次数达到临界值, 此时序列差异达到最大, R 值最小, 转换趋于饱和, 因此, 观察到的颠换大于转换。HOLMQUIST 等^[20]认为这个临界值约为 0.4, 本研究中, 2 个基因序列数据组的 R 值均大于 0.4, 可以提供系统发育信息。

2.2.3 序列饱和性及遗传距离分析

序列饱和性分析结果显示：*cox1* 和 *cox2* 基因的检测值均低于临界值，且 $P < 0.05$ ，表明序列替换未达到饱和状态，具有显著的系统发育信号，可用于构建系统发育树。*cox1* 基因的平均种间遗传距离为 6.75%，是种内平均遗传距离 (0.52%) 的 12.98 倍；*cox2* 基因的平均种间遗传距离为 4.52%，是种内平均遗传距离 (0.49%) 的 9.22 倍。种内平均遗传距离均小于 1%，而种间平均遗传距离均大于 2%，符合种内与种间遗传距离的“10 倍阈值定律”^[21]，*cox1* 和 *cox2* 均可作为鉴定尤犀金龟属的 DNA 条形码。

2.3 物种分子界定

2.3.1 ABGD 划分结果

对样本进行单倍型分析，剔除其余相同序列后得到 *cox1* 的单倍型 20 个，*cox2* 的单倍型 25 个。*cox1* 单倍型序列的初始划分结果较递归划分结果稳定，选取 $P=0.0077$ 的初始模型作为 ABGD 物种界定结果 (表 3)。ABGD 分析将 20 条 *cox1* 单倍型序列划分为 3 个 OUTs，与形态学划分的物种数相符。OTU-1 由细尤犀金龟组成，OTU-2 由粗尤犀金龟组成，OUT-3 由素吉尤犀金龟组成 (表 4)。对 *cox2* 单倍型序列的初始划分结果较递归划分结果稳定，选取 $P=0.0010\sim 0.0046$ 的初始模型作为 ABGD 物种界定结果 (表 3)。基于不同模型的 2 种划分方式得到的 3 个 OTUs 内基因序列的组成

和数量一致，所以最终将这 3 个 OTUs 作为尤犀金龟属 ABGD 划分结果。ABGD 分析将 25 条 *cox2* 单倍型序列划分为 3 个 OUTs (表 5)，与形态学鉴定以及 *cox1* 单倍型划分结果不同的是：在 *cox2* 单倍型序列划分中，将 5 头雄性素吉尤犀金龟 (ZTS15、ZTS16、ZTS17、ZTS18、ZTS19) 和细尤犀金龟划分为 1 个 OTU。OTU-1 由细尤犀金龟和素吉尤犀金龟组成，OTU-2 由粗尤犀金龟组成，OUT-3 由素吉尤犀金龟组成。

2.3.2 bPTP 分析

基于 bPTP 方法，20 条 *cox1* 单倍型序列被划分为 10 个 OTUs，25 条 *cox2* 单倍型序列被划分为 18 个 OTUs (图 2~3)。基于 *cox1* 序列，细尤犀金龟被划分为 4 个 OTUs (OTU-7、OTU-8、OTU-9、OTU-10)，粗尤犀金龟被划分为 1 个 OTUs (OTU-1)，素吉尤犀金龟被划分为 5 个 OTUs (OTU-2、OTU-3、OTU-4、OTU-5、OTU-6)。基于 *cox2* 序列，细尤犀金龟和 5 头素吉尤犀金龟被划分为 7 个 OTUs (OTU-9、OTU-10、OTU-11、OTU-12、OTU-13、OTU-14、OTU-15)，粗尤犀金龟被划分为 3 个 OTUs (OTU-16、OTU-17、OTU-18)，素吉尤犀金龟被划分为 10 个 OTUs (OTU-1、OTU-2、OTU-3、OTU-4、OTU-5、OTU-6、OTU-7、OTU-8、OTU-9、OTU-13)。bPTP 方法的划分结果远大于形态学划分的物种数，存在明显的过度划分。

表 3 基于线粒体 *cox1* 和 *cox2* 序列 3 种距离模型的 Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) 物种划分结果

Tab. 3 Species delimitation results of ABGD based on three distance models of mitochondrial *cox1* and *cox2* sequences

基因 gene	模型 model	划分 partition	种内差异先验值 (P) prior intraspecific divergence									
			0.0010	0.0017	0.0028	0.0046	0.0077	0.0129	0.0215	0.0359	0.0599	
<i>cox1</i>	JC96	递归 recursive	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		初始 initial	4	4	4	3	3	1	—	—	—	
	K80	递归 recursive	—	—	—	4	—	—	—	—	—	
		初始 initial	6	6	6	3	3	3	3	—	—	
	Simple Distance	递归 recursive	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		初始 initial	3	3	3	3	3	3	1	—	—	
<i>cox2</i>	JC96	递归 recursive	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		初始 initial	3	3	3	3	3	2	—	—	—	
	K80	递归 recursive	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		初始 initial	3	3	3	3	3	2	—	—	—	
	Simple Distance	递归 recursive	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		初始 initial	3	3	3	3	2	2	—	—	—	

注：“—”表示该模型在递归分析中未计算或无法获得有效划分结果。

Note: “—” indicates that the model was not computed or yielded no valid delimitation results in the recursive analysis.

表 4 基于线粒体 *cox1* 序列的尤犀金龟属样本 ABGD 划分详细结果

Tab. 4 Detailed division results of *Eupatorus* specimens by ABGD based on mitochondrial *cox1* sequences

OTU	单倍型数量 number of haplotypes	单倍型 haplotype
1	10	Hap1-10 (ZDX1, ZDX14, ZDX17, ZDX20, HPX2, HPX5, HPX6, HPX7, HMX1, HMX3, PTX3, PTX4, PTX5, PTX6, PTX7, PTX9, PTX11, ZDX2, ZDX3, ZDX4, ZDX6, ZDX10, ZDX12, ZDX21, ZDX5, ZDX11, ZDX16, ZDX18, ZDX19, ZDX7, ZDX8, ZDX9, ZDX13, ZDX15, HPX1, HPX4, ZDX22, ZDX23, HMX2, PTX1, HPX3, PTX10, PTX2, PTX8, PTX12)
2	4	Hap11-14 (ZDC1, ZDC2, HHC3, HPC1, HPC2, HHC1, HHC7, HHC2, HHC4, HHC5, HHC8, HHC9, HHC6)
3	6	Hap15-20 (ZDS1, ZDS3, HPS2, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HPS7, HPS8, HPS9, HPS10, HPS11, HPS12, HMS1, HHS1, HHS2, ZTS4, ZTS5, ZTS6, ZTS7, ZTS8, ZTS9, ZTS11, ZTS13, ZTS14, ZTS16, ZTS17, ZTS18, ZTS19, ZTS20, ZTS21, ZTS23, ZTS24, ZTS25, SLS1, SLS2, SLS3, SLS4, SLS5, SLS6, SLS7, SLS8, SLS9, SLS10, SLS11, SLS12, SLS13, SLS14, SLS15, SLS16, SLS17, SYS1, SYS2, DTS1, DTS2, DTS3, DTS4, DTS5, DTS6, DTS7, DTS8, DTS9, DTS10, DTS11, DTS12, DTS13, SBS1, SBS2, ZDS2, ZTS10, HPS1, HMS2, ZTS1, ZTS2, ZTS3, ZTS15, ZTS22, ZTS26, ZTS12)

表 5 基于线粒体 *cox2* 序列的尤犀金龟属样本 ABGD 划分详细结果

Tab. 5 Detailed division results of *Eupatorus* specimens by ABGD based on mitochondrial *cox2* sequences

OTU	单倍型数量 number of haplotypes	单倍型 haplotype
1	11	Hap1-11 (ZDX1, HPX2, HPX6, HPX7, PTX4, PTX5, PTX7, PTX9, ZTS16, ZTS17, ZTS19, ZDX2, ZDX3, ZDX4, ZDX6, ZDX10, ZDX12, ZDX21, ZDX5, ZDX11, ZDX16, ZDX18, ZDX19, ZDX7, HPX3, ZDX8, ZDX22, ZDX23, HMX2, PTX1, ZDX9, ZDX13, ZDX14, ZDX17, PTX6, ZTS18, ZDX15, HPX1, HPX4, ZDX20, HPX5, HMX1, HMX3, PTX3, PTX11, ZTS15, PTX2, PTX8, PTX10, PTX12)
2	5	Hap12-16 (ZDC1, ZDC2, HPC1, HPC2, HHC1, HHC7, HHC2, HHC4, HHC5, HHC8, HHC9, HHC3, HHC6)
3	9	Hap17-25 (ZDS1, ZDS3, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, HPS7, HPS8, HPS9, HPS10, HPS11, HPS12, HMS1, HMS2, HHS1, ZTS1, ZTS2, ZTS3, ZTS4, ZTS6, ZTS7, ZTS8, ZTS9, ZTS10, ZTS12, ZTS13, ZTS14, ZTS20, ZTS21, ZTS22, ZTS23, ZTS24, ZTS26, SLS2, SLS3, SLS5, SLS6, SLS11, SLS13, SLS14, SLS16, SYS1, SYS2, DTS1, DTS2, DTS3, DTS4, DTS5, DTS6, DTS9, DTS11, DTS12, DTS13, SBS1, SBS2, ZDS2, HPS2, HHS2, ZTS5, ZTS25, ZTS11, SLS1, SLS7, SLS8, SLS9, SLS12, SLS15, SLS17, DTS7, DSJ8, SLS4, SLS10, DTS10)

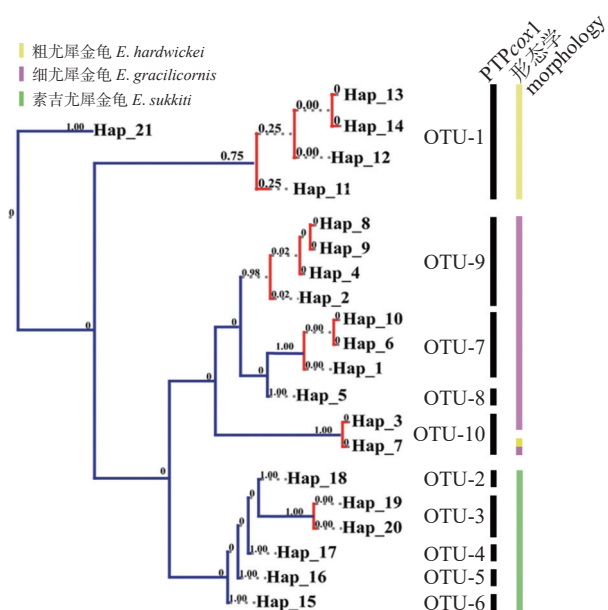


图 2 基于 *cox1* 序列的 bPTP 模型尤犀金龟属物种界定

Fig. 2 Species definition of *Eupatorus* in bPTP model based on *cox1* sequence

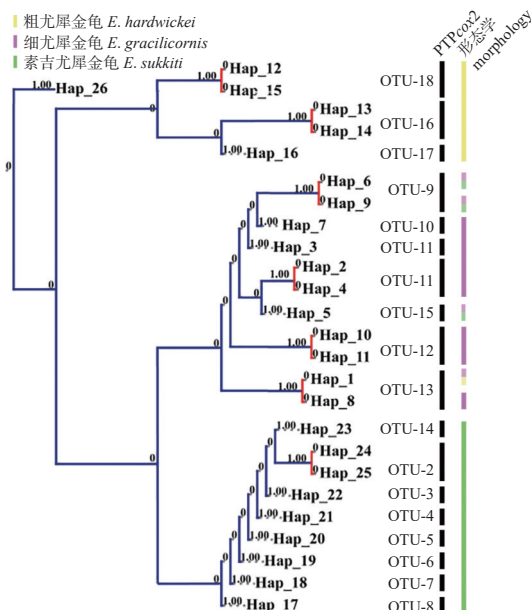


图 3 基于 *cox2* 序列的 bPTP 模型尤犀金龟属物种界定

Fig. 3 Species definition of *Eupatorus* in bPTP model based on *cox2* sequence

3 讨论

物种准确鉴定是濒危物种保护的基础, 由于尤犀金龟属昆虫存在性二型和雄性多型现象, 物种形态鉴定困难, 存在较多错误, 严重影响了该属物种的研究和保护, 因此, 需要结合其他方法对物种进行准确鉴定。分子生物学的发展为现存生物类群的界定及隐存种的发现提供了新的方法和途径^[22]。DNA 条形码 (DNA barcoding) 具有简便、快速、高准确性等优势, 在昆虫界定中得到了广泛应用^[23-26], ABGD、PTP、BIN (barcode index number system)、jMOTU (java molecule operational taxonomic units)、GMYC (generalized mixed Yule coalescent) 等新方法不断出现^[27-29]。昆虫 DNA 条形码研究涉及的基因包括 *cox1*、*cox2*、*nad5*、*rrnL*、*rrnS*、*cytb*、*28SrRNA*、*wg* 等^[30-34]。*cox1* 基因具有种内相对保守而种间存在较高变异的特点, 可用于绝大多数昆虫物种的鉴定。

本研究基于线粒体基因 *cox1* 和 *cox2*, 采用 2 种方法对尤犀金龟属 3 个物种进行分子鉴定。结果显示: 使用 ABGD 方法时, 基于 *cox1* 基因的物种界定结果与形态学鉴定结果一致, 支持了前人的研究结果^[13-14, 35], 但 *cox2* 基因对素吉尤犀金龟的界定结果与形态学鉴定结果略有不同; 使用 bPTP 方法时, 基于 *cox1* 和 *cox2* 基因的划分结果均远大于形态学划分的物种数, 存在明显的过度划分, 前人研究也表明 PTP 法普遍存在高估物种多样性的情况^[13, 36-37]。因此, 基于研究结果可知: *cox1* 基因条形码可用于尤犀金龟属物种界定。本研究还表明: 在基于 *cox2* 基因的物种划分中, 细尤犀金龟和素吉尤犀金龟之间存在个体共享单倍型的现象, 且基于 *cox1* 和 *cox2* 的串联序列构建系统发育树显示两者互为姐妹群关系, 表明 2 个物种的亲缘关系较为密切。此外, 素吉尤犀金龟与细尤犀金龟的形态极为相似, 故推测粗尤犀金龟和细尤犀金龟 2 个物种间的分化时间较短, 这可能是导致 *cox2* 基因在物种划分中出现差异的主要原因。

4 结论

本研究共测得尤犀金龟属 *cox1* 基因和 *cox2* 基因各 137 条。基于 *cox1* 基因进行的物种分子界定结果与形态鉴定结果一致, 而基于 *cox2* 基因进

行的物种分子界定结果与形态鉴定结果有所不同。结果表明: *cox1* 条形码更适合用于尤犀金龟属昆虫分子界定, 结合形态特征, 能准确鉴定该属物种。

[参考文献]

- [1] 云南省林业厅, 中国科学院动物研究所. 云南森林昆虫[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1987.
- [2] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录 第三卷: 无脊椎动物[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [3] 王成斌, 雷朝亮. 中国尤犀金龟属分类研究(鞘翅目, 金龟科, 犀金龟亚科)[J]. 动物分类学报, 2009, 34(2): 346. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0739.2009.02.027.
- [4] MIYASHITA P T, ARNAUD P. Description of a new species of the genus *Eupatorus* Arrow (Col. Scarabeidae Dynastini)[J]. Bulletin de liaison de l'Association Entomologique pour la Connaissance de la Faune Tropicale, 1997, 3(3): 2.
- [5] SHIGETO Y. Description of a new subspecies of *Eupatorus siamensis* (Castelnau) (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae) from Hainan Island, China[J]. Kogane, 2013, 14: 99.
- [6] MOSKALENKO S. A new subspecies of *Eupatorus gracilicornis* Arrow, 1908 from southern Vietnam (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae)[J]. Insecta Mundi, 2017, 580: 1. DOI: 10.5281/zenodo.5169251.
- [7] MASSIMO P, PASCHOAL C G. A new species of *Eupatorus* Burmeister, 1847 related to *Eupatorus birmanicus* Arrow, 1908 from southwestern China (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae)[J]. Zootaxa, 2021, 4966(1): 29. DOI: 10.11646/zootaxa.4966.1.3.
- [8] 易传辉, 和秋菊, 王琳, 等. 粗尤犀金龟生物学特性与人工养殖初步研究[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(1): 116. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7461.2012.01.23.
- [9] 陈焱, 易传辉, 和秋菊, 等. 素吉尤犀金龟生物学特性初步研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(9): 70. DOI: 10.3969/j.issn.1004-874X.2012.09.023.
- [10] 张鸿辉, 舒旭, 余新林, 等. 基于MaxEnt模型的细尤犀金龟在中国的适生分布区预测[J]. 西南农业学报, 2024, 37(7): 1601. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2024.7.023.
- [11] 张媛, 郭晓华, 刘广纯, 等. DNA条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(2): 186. DOI: 10.7679/j.issn.2095-1353.2011.073.
- [12] SOLDATI L, CONDAMINE F L, CLAMENS A, 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. DOI: 10.5852/ejt.2017.282.
- [13] 李秀敏, 戎际达, 刘一右, 等. 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. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0858.2023.04.21.
- [14] 孙星星, 陈永成, 王凡, 等. DNA条形码技术在桃蚜寄

- 生蜂鉴定上的应用[J]. 浙江农业科学, 2024, 65(9): 2147. DOI: [10.16178/j.issn.0528-9017.20240473](https://doi.org/10.16178/j.issn.0528-9017.20240473).
- [15] RAMSIRI P. Biology of *Xylotrupes gideon* Linnaeus, *Eupatorus gracilicornis* Arrow and *Chalcosoma atlas* Linnaeus in upper northern Thailand[D]. Chiang Mai: Chiang Mai University, 2008.
- [16] 王派锋, 吕建兴, 高瑞卿. 台湾及世界甲虫饲养与观察[M]. 台中: 晨星出版社, 2008.
- [17] ROWLAND J M, MILLER K B. Phylogeny and systematics of the giant rhinoceros beetles (Scarabaeidae: Dynastini)[J]. Insecta Mundi, 2012, 263: 1.
- [18] 徐正会, 房华, 赵梦乔, 等. 云南高黎贡山蚂蚁区系及物种多样性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2022, 42(5): 1. DOI: [10.11929/j.swfu.202203039](https://doi.org/10.11929/j.swfu.202203039).
- [19] 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.
- [20] HOLMQUIST R, GOODMAN M, CONROY T, et al. The spatial distribution of fixed mutations within genes coding for proteins[J]. Journal of Molecular Evolution, 1983, 19(6): 437. DOI: [10.1007/BF02102319](https://doi.org/10.1007/BF02102319).
- [21] 沈青, 张东峰, 李凤琴. DNA条形码技术在鱼种鉴定中的应用[J]. 卫生研究, 2014, 43(5): 878. DOI: [10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2014.05.040](https://doi.org/10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2014.05.040).
- [22] KEKKONEN M, HEBERT P D. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(4): 706 DOI: [10.1111/1755-0998.12233](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12233).
- [23] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2003, 270(Sup. 2): 96. DOI: [10.1098/rsbl.2003.0025](https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025).
- [24] MAGNACCA K N, BROWN M J F. DNA barcoding a regional fauna: Irish solitary bees[J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(6): 990. DOI: [10.1111/1755-0998.12001](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12001).
- [25] SCHMID-EGGER C, STRAKA J, LJUBOMIROV T, et al. DNA barcodes identify 99 percent of apoid wasp species (Hymenoptera: Ampulicidae, Crabronidae, Sphecidae) from the Western Palearctic[J]. Molecular Ecology Resources, 2019, 19(2): 476. DOI: [10.1111/1755-0998.12963](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12963).
- [26] MOULIN N. A cryptic new species of *Chlidonoptera* Karsch, 1892 from the south west protected zone of the Central African Republic (Insecta, Mantodea, Hymenopodidae)[J]. ZooKeys, 2020, 917: 63. DOI: [10.3897/zookeys.917.39270](https://doi.org/10.3897/zookeys.917.39270).
- [27] HEBERT P D, GREGORY T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. Systematic Biology, 2005, 54(5): 852. DOI: [10.1080/10635150500354886](https://doi.org/10.1080/10635150500354886).
- [28] FUJISAWA T, BARRACLOUGH T G. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets[J]. Systematic Biology, 2013, 62(5): 707. DOI: [10.1093/sysbio/syt033](https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033).
- [29] ZHANG J J, KAPLI P, PAVLIDIS P, et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements[J]. Bioinformatics, 2013, 29(22): 2869. DOI: [10.1093/bioinformatics/btt499](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499).
- [30] VOGLER A P, WELSH A. Phylogeny of north American *Cicindela* tiger beetles inferred from multiple mitochondrial DNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1997, 8(2): 225. DOI: [10.1006/mpev.1997.0418](https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0418).
- [31] 孙娜. 金龟子 *cytb*、*cox1* 序列比较及在分子系统学研究中的作用[D]. 沈阳: 沈阳大学, 2010.
- [32] 吴卫, 李冠. 新疆十种萤叶甲亚科(鞘翅目, 叶甲科)昆虫的分子系统发育关系及在生活型进化上的应用[J]. 动物分类学报, 2010, 35(3): 523.
- [33] 刘静. 中国新锹甲属(鞘翅目: 锹甲科)分子系统发育研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2019.
- [34] 包明慧. 青藏高原草原毛虫物种界定及谱系地理学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [35] 柴金艳. 中国蝨蠹属分子界定和整合分类研究[D]. 保定: 河北大学, 2019.
- [36] DELLICOUR S, FLOT J F. The hitchhiker's guide to single locus species delimitation[J]. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(6): 1234. DOI: [10.1111/1755-0998.12908](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12908).
- [37] 程海云, 段家充, 张超, 等. 中国北方常见芫菁分子物种界定(鞘翅目: 芫菁科)[J]. 昆虫学报, 2022, 65(9): 1204. DOI: [10.16380/j.kcxb.2022.09.014](https://doi.org/10.16380/j.kcxb.2022.09.014).

责任编辑: 何馨成