

基于 COI 基因对三种大黑鳃金龟分类地位的研究^{*}

刘春琴^{1**} 田雷雷^{2, 3**} 李克斌^{2***} 王庆雷¹ 席景会³

冯晓洁¹ 席国成¹ 尹姣² 曹雅忠²

(1. 沧州市农林科学院 沧州 061001; 2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害国家重点实验室 北京 100193;
3. 吉林大学植物科学学院 长春 130062)

摘要 本试验将江南大黑鳃金龟 *Holotrichia gebleri* Faldermann 分别与东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* Bates、华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblitera* Faldermann 进行了杂交试验,得到了 F₁ 代成虫,自交得到了 F₂ 代,表明 F₁ 代的雌雄虫具有正常的生殖力,3 种金龟子之间不存在生殖隔离。对这 3 种大黑鳃金龟的 COI 基因进行了扩增与测序并构建了系统进化树,结果显示:江南大黑、华北大黑和东北大黑 3 种鳃金龟的遗传距离相近,分类地差别不显著,与外类群的暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* Motschulsky 在遗传距离和分类地位上差异显著。以上结果表明,江南大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟应为同一个物种的不同地理类群。

关键词 大黑鳃金龟, 杂交, 分类, COI 基因

Research into the taxonomic status of three kinds of scarabs

LIU Chun-Qin^{1**} TIAN Lei-Lei^{2, 3**} LI Ke-Bin^{2***} WANG Qing-Lei¹ XI Jing-Hui³

FENG Xiao-Jie¹ XI Guo-Cheng¹ YIN Jiao² CAO Ya-Zhong²

(1. Cangzhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Cangzhou 061001, China;
2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
3. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract *Holotrichia gebleri* Faldermann was experimentally hybridized, with *Holotrichia diomphalia* Bates and *Holotrichia oblitera* Faldermann. An F₂ generation was then obtained from each F₁ generation, demonstrating that males and females of each hybrid population were fertile. Mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) gene fragments of three parent scarab species were cloned and sequenced and the genetic distance of these sequences analysed. These sequences were used to produce four kinds of phylogenetic trees. The results show that the genetic distance between the three species is similar and that each is distinct from *H. parallela* Motschulsky. We conclude that *H. gebleri*, *H. diomphalia* and *H. oblitera* are three geographic populations of the same species.

Key words carab, hybridization, COI gene

大黑鳃金龟是齿爪金龟亚属 *Holotrichia* *olotrichia* (s. str) Reitter 中的一个类群,包含 12 个近缘种,其中分布较广的有东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* Bates、华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblitera* Faldermann、江南大黑鳃金龟 *Holotrichia gebleri* Faldermann。江南大黑鳃金龟与

东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟形态相似,仅臀板隆凸及末前端腹板处有略微差异(章有为, 1965; 魏鸿钧, 1985),不易识别。在地理分布上,江南大黑鳃金龟广泛分布于黑龙江(哈尔滨)、吉林(长春、公主岭)、内蒙古、河北(抚宁、昌黎)、北京、甘肃(贺兰山)、山东(济南、胶南)、山西(长

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201003025);国家自然科学基金(31000853)。

** 为同等贡献作者, E-mail: Wqlie02@163.com, tianleileide@163.com

*** 通讯作者, E-mail: likebin54@163.com

收稿日期: 2012-12-07, 接受日期: 2012-12-28

治)、河南(许昌、林县)、江苏(徐州、盐城、宝应、南京、横角、望亭)、上海、安徽(宿城、安庆)、浙江(湖州、莫干山、杭州、舟山、牌头)(章有为,1965),与华北大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟分布区域有多处重叠,难以界定。作者多年于东北、华北、江南多地采集大黑鳃金龟成虫,并观察到每一个大黑鳃金龟成虫的臀板隆凸宽钝凹陷及臀板隆凸圆尖者均同时存在,而末前端腹板为弧形凹陷或三角形凹陷虫体在各地更是随处可采集到。

由于3种大黑鳃金龟的分布区域存在重叠,形态相近,而且生活周期及发生规律基本相同,为了明确3种大黑鳃金龟之间的分类地位,现对江南大黑鳃金龟与华北大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟分别进行了杂交及 F_1 自交试验,验证3种大黑鳃金龟之间是否存在生殖隔离。在杂交试验的同时,还利用现在常用的分子分类手段对3种大黑鳃金龟分类进位进行进一步确定。分子分类技术由于能够很好的辅助形态学分类而被作为物种鉴定的有效方法。其中快速兴起的DNA条形码技术将基于分子数据的物种快速鉴定推动到了高速发展的阶段(Hebert *et al.*, 2003)。在DNA条形码的备选标记中,线粒体COI序列因为能够保证物种间具有足够变异,且又很容易被扩增,而被作为大部分动物类群的候选基因。本试验采用已经筛选出的对金龟子分类有效的特异引物序列(另文报道),应用COI基因对江南大黑鳃金龟与东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟的2个地理种群分别进行了分析,并利用与这3种金龟子亲缘关系较近的暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* Motschulsky 为外类群,以期确定3种大黑鳃金龟的分类地位。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试虫源 本次试验中选取大黑金龟子3龄末期健壮幼虫和成虫。形态观察用虫为2008年5—6月分别采自东北、华北、江南三地的哈尔滨、公主岭、沧州、包头、济南、合肥、安庆的大黑鳃金龟成虫,每地于5—7月大黑鳃金龟发生期采虫3次,每次采集100只。分子分类技术所用的华北大黑鳃金龟(CZ1~CZ3),东北大黑鳃金龟(CC1~CC3),江南大黑鳃金龟(JN1~JN3)是从形态学观察鉴定无误的个体中挑选出来的。杂交试验虫为2008年9月下旬分别采自哈尔滨、公主岭、沧州、包头、济南、

合肥、安庆7地的大黑鳃金龟3龄健壮幼虫,在沧州市农林科学院养虫室采用牙签盒单虫单饲,羽化、出土后按形态特征选定的杂交亲代。

1.1.2 供试药品 本实验用到的引物由上海生工公司合成。基因组DNA提取试剂盒为QiaGen公司的DNeasy blood & Tissue Kit(Ahrens *et al.*, 2007)。PCR所用药品为博迈德公司生产的2×Taq PCR Master Mix。DNA Marker为全式金公司的Trans DNA Marker II。DNA回收所用药品为TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver 3.0。之后的连接转化所用药品为全式金公司的pEASY-T₁ Cloning Kit试剂盒感受态细胞为全式金公司提供的Trans1-T₁。

1.2 试验方法

1.2.1 形态学观察 将采集到的用于形态学鉴定的3种大黑鳃金龟成虫于OLYMPUS/奥林巴斯解剖镜下进行形态观察,主要观察3种大黑鳃金龟臀板与腹板之间的差别。

1.2.2 杂交试验 试验在沧州市农林科学院养虫室进行。9月下旬在各地采集大黑鳃金龟3龄末健壮幼虫,用牙签盒单头饲养,饲养土壤湿度为17.5%,温度为27℃,放入土豆供幼虫取食。成虫羽化、出土后选取具有典型形态特征者进行亲代杂交和子代自交。

1.2.2.1 亲代杂交 杂交个体的选择主要根据臀板的形态进行,东北大黑鳃金龟选择臀板隆凸顶端宽钝、中央凹陷呈股沟状的典型个体(图1);华北大黑鳃金龟选择其中臀板隆凸圆尖的典型个体(图2);江南大黑鳃金龟选择其中臀板隆凸宽钝,中间凹陷呈股沟状的典型体(图3)。每处理试虫为20对,雌雄比例为1:1。试验设正反交两个处理,正交为东北大黑鳃金龟或华北大黑鳃金龟雄虫与江南大黑鳃金龟雌虫杂交,反交为东北大黑鳃金龟或华北大黑鳃金龟雌虫与江南大黑鳃金龟雄虫杂交。

1.2.2.2 子代(F_1)自交 对亲代杂交所得子代分别饲养、化蛹和羽化,出土后的 F_1 代成虫分组自交饲养繁育,每组选用健壮成虫10对,雌雄比例为1:1,得 F_2 代。

1.2.3 COI 基因测序分析

(1)基因组DNA的提取 各个金龟子个体基因组DNA的提取完全按照QiaGen公司的DNeasy

Blood & Tissue Kit 试剂盒中的步骤进行 (Ahrens, 2004)。

(2) COI 基因的克隆 COI 序列片段用引物 (Pat 与 Jerry) 进行扩增。20 μ L PCR 体系中包括 2 μ L DNA, 引物 Pat 与 Jerry 各 1 μ L, PCR Master Mix 10 μ L 以及无菌水 6 μ L。PCR 循环参数为: ① 94℃ 变性 1 min, ② 94℃ 变性 40 s, ③ 45℃ 退火 40 s, ④ 72℃ 延伸 1 min, ⑤ 重复 5 次 ② ~ ④, ⑥ 94℃ 变性 40 s, ⑦ 51℃ 退火 40 s, ⑧ 82℃ 延伸 1 min, ⑨ 重复 35 次步骤 ⑥ ~ ⑧, ⑩ 72℃ 孵育 5 min, 在 4℃ 条件下保存 (赖小平等, 2010)。

扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳分离后, 在紫外灯下进行切胶, 用凝胶回收试剂盒回收纯化。以 4:1 的比例将回收产物与 pEASY-T₁ 载体于 25℃ 下连接 15 min (Will *et al.*, 2005), 连接产物转入 Trans-T₁ 感受态细胞中, 将转化完的菌液涂布在含有氨苄青霉素 (10^{-4} g/mL) 的 LB/IPTG/X-gal 琼脂糖平板上。倒置与 37℃ 恒温培养箱中过夜培养, 筛选转化子。经蓝白斑筛选挑取转化平板上的单个白色菌落, 接种于 LB 液体中, 37℃ 于恒温摇床上过夜振荡培养。分装取后送至北京中科希林生物技术有限责任公司进行测序。

(3) 序列分析 应用 BLAST 同源比对工具将测序结果与 GenBank 中的核酸数据库进行同源性比较, 验证所测序列是否确实为 COI 序列 (Cognato, 2006)。将所得到的 COI 序列分别利用

MEGA4.0 软件计算序列平均的碱基组成, 变异位点与各个样本间的遗传距离 (p-distance) (Dalebout *et al.*, 2004)。并对测序结果利用 MEGA4.0 软件进行 NJ (邻接树)、ME (最小进化树)、MP (最大简约树) 及 UPMGA 4 种系统进化树的构建。并利用软件对东北大黑鳃金龟, 华北大黑鳃金龟, 江南大黑鳃金龟, 暗黑鳃金龟 4 种金龟子的 COI 序列进行分子钟假设的检验 (Min and Park, 2009)。

2 结果与分析

2.1 形态观察结果

表 1 结果表明, 哈尔滨、公主岭、沧州、包头、济南、合肥、安庆 7 地采集的大黑鳃金龟成虫中, 臀板隆凸顶端宽钝、中央凹陷呈股沟状的成虫个体和臀板隆凸顶端圆尖的成虫个体在各采样点均同时存在, 不同采样点 2 种形态的成虫所占比例有差异。哈尔滨、包头、合肥、安庆样品中臀板隆凸宽钝凹陷的成虫较多, 均超过 60%, 而河北沧州、山东济南的样品中臀板隆凸宽钝凹陷的成虫较少, 臀板隆凸圆尖的成虫较多。在 7 组样品中, 末前腹板后中部有弧形深凹坑和末前腹板后中部三角形较宽凹坑的个体在各组样品中所占比例均在 40% ~ 45% 之间, 差异不大。7 组样品中均有少量个体末前腹板后中部凹坑形状不太明显 (图 1 ~ 图 3)。

表 1 7 个地区成虫样本的形态观察结果 (头)
Table 1 Morphological observation results of sample from 7 area

	臀板隆凸 Protuberantia pygidium		末前端腹板 Front of end of sternum	
	宽钝凹陷	圆尖	三角形凹陷	弧形凹陷
	Broadly obtuse dimple	Round and cuspidal	Triangular dimple	Cambered dimple
哈尔滨 Haerbin	62	38	42	43
公主岭 Gongzhuling	48	52	40	45
沧州 Cangzhou	13	87	44	45
包头 Baotou	65	35	43	42
济南 Ji'nan	21	79	43	43
合肥 Henfei	67	33	45	41
安庆 Anqing	75	25	42	45

2.2 杂交结果

2.2.1 亲代杂交结果 表 2 结果表明, 江南大黑鳃金龟与东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟无论

是正交或反交, 均可得到多个 F₁ 代个体, F₁ 代卵可正常孵化, 幼虫在 3 个龄期均生长正常, 并可正常化蛹和羽化成成虫。

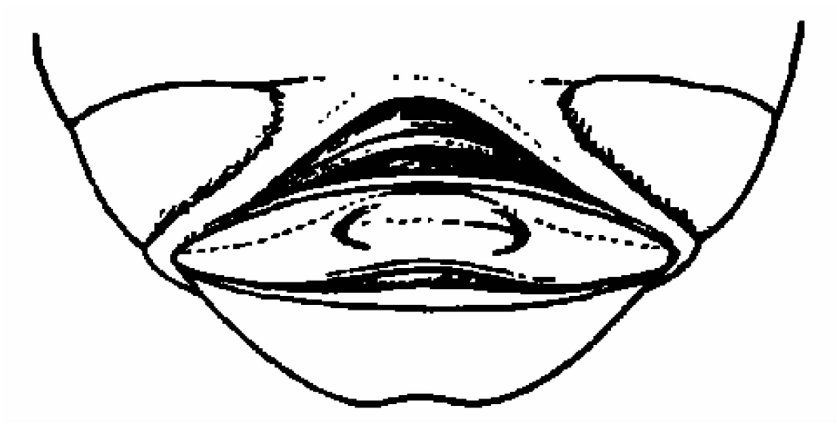


图 1 东北大黑鳃金龟雄虫腹部末端腹面观 (仿章有为,1965)

Fig.1 The abdominal apex of *Holotrichia diomphalia*, ventral view (following Zhang, 1965)

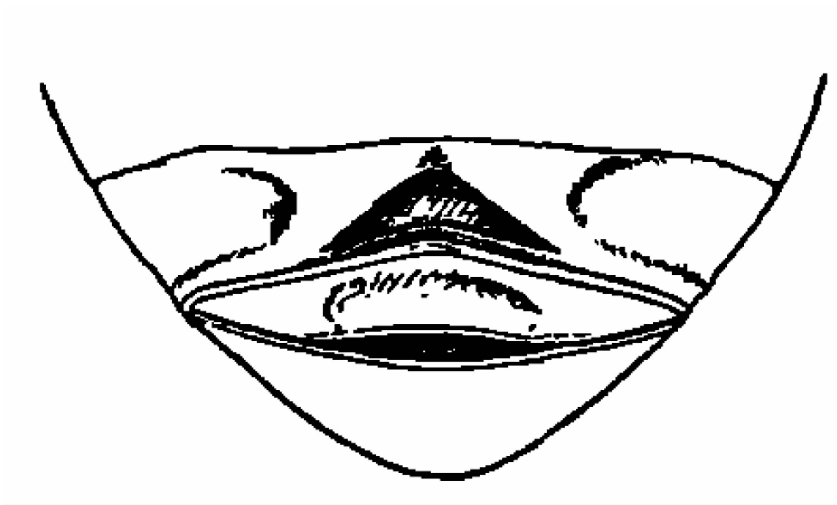


图 2 华北大黑鳃金龟雄虫腹部末端腹面 (仿章有为,1965)

Fig.2 The abdominal apex of *Holotrichia oblita*, ventral view (following Zhang, 1965)

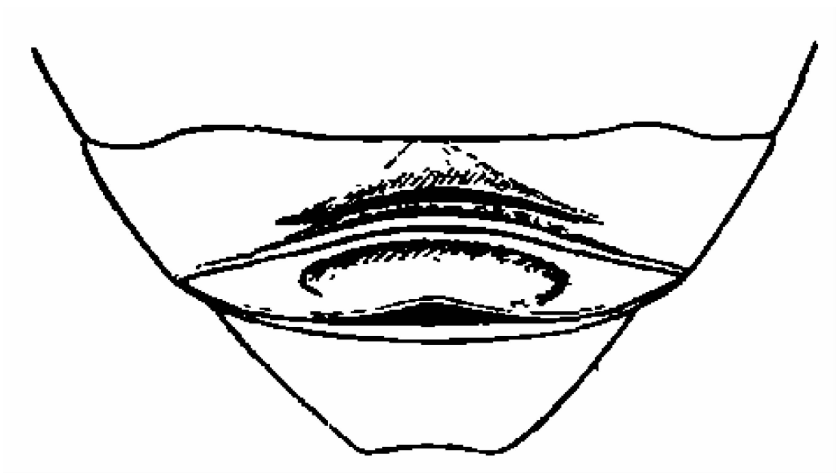


图 3 江南大黑鳃金龟雄虫腹部末端腹面 (仿章有为,1965)

Fig.3 The abdominal apex of *Holotrichia gebleri*, ventral view (following Zhang, 1965)

表 2 东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟和江南大黑鳃金龟杂交试验结果

Table 2 The test of hybridization in *Holotrichia diomphalia*, *Holotrichia oblita* and *Holotrichia gebleri*

	正交 Orthogonality		反交 Reciprocal cross	
	江南♀×东北♂ (<i>H. gebleri</i> ♀ × <i>H. diomphalia</i> ♂)	江南♀×华北♂ (<i>H. gebleri</i> ♀ × <i>H. oblita</i> ♂)	东北♀×江南♂ (<i>H. diomphalia</i> ♀ × <i>H. gebleri</i> ♂)	华北♀×江南♂ (<i>H. oblita</i> ♀ × <i>H. gebleri</i> ♂)
卵粒数 Number of egg	420	382	396	415
幼虫数 Number of larvae	273	251	260	286
蛹数 Number of pupa	87	69	51	48
成虫数 Number of adult	58	42	30	37

2.2.2 子代(F₁)自交结果 表 3 结果表明,将江南大黑鳃金龟与东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟正交、反交所得 4 组 F₁ 代分别自交后均可得到多个 F₂ 代个体, F₂ 代卵、幼虫、蛹、成虫生长正常。

可见杂交后代可正常繁殖,雌雄 F₁ 成虫均具有正常的生殖力,江南大黑鳃金龟与华北大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟之间不存在生殖隔离。

表 3 子代(F₁)自交结果
Table 3 Selfing result of the F₁

	华北♀×东北♂ (<i>H. oblita</i> ♀ × <i>H. diomphalia</i> ♂)	华北♀×江南♂ (<i>H. oblita</i> ♀ × <i>H. gebleri</i> ♂)	东北♀×华北♂ (<i>H. diomphalia</i> ♀ × <i>H. oblita</i> ♂)	江南♀×华北♂ (<i>H. gebleri</i> ♀ × <i>H. oblita</i> ♂)
卵粒数 Number of egg	98	102	90	87
幼虫数 Number of larvae	72	81	82	76

2.2.3 COI 基因序列碱基组成 测序结果得出,本实验中选用的金龟子 COI 基因片段长度为 775 bp,由 MEGA4.0 软件的分析结果中碱基组成方面,T、A、G、C 的平均含量分别为 32.3%、35.3%、17.9%、14.4%,其中 A + T 含量较高,为 67.6%。变异位点为 22.9%。

2.2.4 个体间遗传距离 利用 MEGA4.0 软件对这 4 种金龟子的 12 个个体的遗传距离进行计算,具体个体间的遗传距离如表 4 所示。由表 4 中数据可以看出。华北大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟与江南大黑鳃金龟各自种内遗传距离都小于或约等于 3%,而各个金龟子种内遗传距离与 3 种大黑鳃金龟的种内遗传距离基本相同,可见这 3 种种金龟子的 COI 基因之间基本无差异。而与暗黑鳃金龟基因之间的遗传距离都为 20% 左右,遗传距离较大(表 4)。

2.2.5 分子钟假设的检验 假设 CC1 序列、JN1 序列与 CZ1 序列以相同速率进化,AH1 为外类群利用 MEGA4.0 软件进行分子钟假说的检验。统

计结果中发现 4 条序列共有位点 817 个,而序列中 CC1、JN1 和 CZ1 中的唯一差异位点数目分别是 13、12 和 8,卡方测验值为 1.19(自由度为 1, $P = 0.27523$)由于 P 值大于 0.05,则接受原统计假设,表明 CC1 序列 JN1 序列与 CZ1 序列以相同速率进化。

2.2.6 系统进化树 对这 4 种金龟子 12 个个体的 COI 序列利用 4 种不同的进行系统进化树的构建方法构建得到 NJ 树、ME 树、MP 树、UPGMA 树 4 种进化树图(图 4),由于 4 种系统进化树的构建采用不同的计算方法来划分各个样本间的系统进化关系,可以使所得的结果更加准确。

由图 4 可以得出:由多种方法构建的系统进化树中可以得到,东北大黑鳃金龟与华北大黑鳃金龟在系统进化树中无明显的界限,江南大黑鳃金龟 3 个样本在 4 种系统进化树中都被划分为了一组,与东北大黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟存在较小差别。作为外种群对照的暗黑鳃金龟与 3 种大黑鳃金龟表现出了明显的系统进化差异性。江

南大黑鳃金龟与另外 2 种大黑鳃金龟的区别较暗小。
黑鳃金龟与 3 种大黑鳃金龟之间的差距显的微

表 4 各个样本之间的遗传距离
Table 4 The gene distance of each example

	AH1	AH2	AH3	JN1	JN2	JN3	CC1	CC2	CC3	CZ1	CZ2	CZ3
AH1												
AH2	0.010											
AH3	0.002	0.012										
JN1	0.202	0.210	0.206									
JN2	0.194	0.205		0.017								
JN3	0.205	0.217	0.209	0.016	0.021							
CC1	0.213	0.225	0.217	0.038	0.037	0.032						
CC2	0.204	0.216	0.208	0.028	0.027	0.024	0.030					
CC3	0.203	0.215	0.207	0.032	0.030	0.028	0.009	0.026				
CZ1	0.204	0.216	0.208	0.028	0.027	0.024	0.030	0.000	0.026			
CZ2	0.200	0.212	0.204	0.032	0.030	0.033	0.042	0.030	0.038	0.030		
CZ3	0.206	0.221	0.211	0.032	0.030	0.028	0.029	0.011	0.025	0.011	0.034	

注: AH1 ~ AH3 表示华北大黑鳃金龟, CC1 ~ CC3 表示东北大黑鳃金龟, JN1 ~ JN3 表示江南大黑鳃金龟。

AH1-AH3 mean *Holotrichia diomphalia*, CC1-CC3 mean *Holotrichia oblita*, JN1-JN3 mean *Holotrichia gebleri*.

3 结论与讨论

大黑鳃金龟为齿爪金龟亚属中的一个昆虫类群,在魏鸿钧(1985)列出的 12 种大黑鳃金龟近似种中,江南大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟的分类地位很近;在体型、体色等大的外表形态上相同;在触角、足、前胸背板、小盾片这些细微特征上也无差异;形态上区分江南大黑鳃金龟与华北大黑鳃金龟主要在臀板隆凸顶端为宽钝和圆尖这一细小的外部特征;区分江南大黑鳃金龟与东北大黑鳃金龟是在末前腹板后中部凹陷形状略有不同(章有为,1965;罗益镇和崔景岳,1995)。江南大黑鳃金龟的分布区域也有不同描述,章有为(1965)所列江南大黑鳃金龟的分布区域覆盖东北、华北、华东及华中的河南、西北的甘肃。魏鸿钧(1985)列出的江南大黑鳃金龟仅分布于江苏、安徽、浙江、上海等地;顾耘等(2002)通过杂交方法和 RAPD 技术确定东北大黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟为同一物种的不同地理种群。由于 RAPD 技术存有在种间的变异水平很高,取样代表性是一个较大的问题,即利用某一个体代表一个种可能造成结果的偏差。需要找到群体特异或种特异性的条带等问题。所以需要一种更加好的分子分类方法对几种大黑鳃金龟的分类地位进行分类。作者将江南大黑鳃金龟分别与东北大黑鳃金

龟、华北大黑鳃金龟进行正交、反交及子一代自交试验,结果显示江南大黑鳃金龟与华北大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟之间均无生殖隔离,应为同一物种。COI 基因研究结果表明 3 种大黑鳃金龟的种内遗传距离基本相同,这 3 种金龟子的 COI 基因之间基本无差异,进一步佐证了杂交结果。可见江南大黑鳃金龟与东北大黑鳃金龟一样,与华北大黑鳃金龟为同一物种,是同一物种内的不同地理种群。

2008 年 5—7 月采集于哈尔滨、公主岭、沧州、包头、济南、合肥、安庆 7 地的大黑鳃金龟成虫中,末前腹板后中部有弧形深凹坑和末前腹板后中部三角形较宽凹坑的个体在各组样品中的比例差异不大。各组均有少量成虫末前腹板后中部凹坑的形状特征不明显。杂交、自交试验中确定成虫雌、雄时发现,末前腹板后中部有弧形深凹坑的个体多为雌虫,而末前腹板后中部三角形较宽凹坑的个体中雄虫占比大。末前腹板后中部凹坑的形态特征是否与个体性别有关有待进一步确定。

同时我们调查发现四川大黑鳃金龟 *Holotrichia szechuanensis* Chang 在大黑鳃金龟近似种中亦与江南大黑鳃金龟、东北大黑鳃金龟、华北大黑鳃金龟形态近似,分布区域亦有重叠。作者采集试验虫源时也发现了四川大黑鳃金龟典型特征的个体。四川大黑鳃金龟是否与江南大黑鳃金

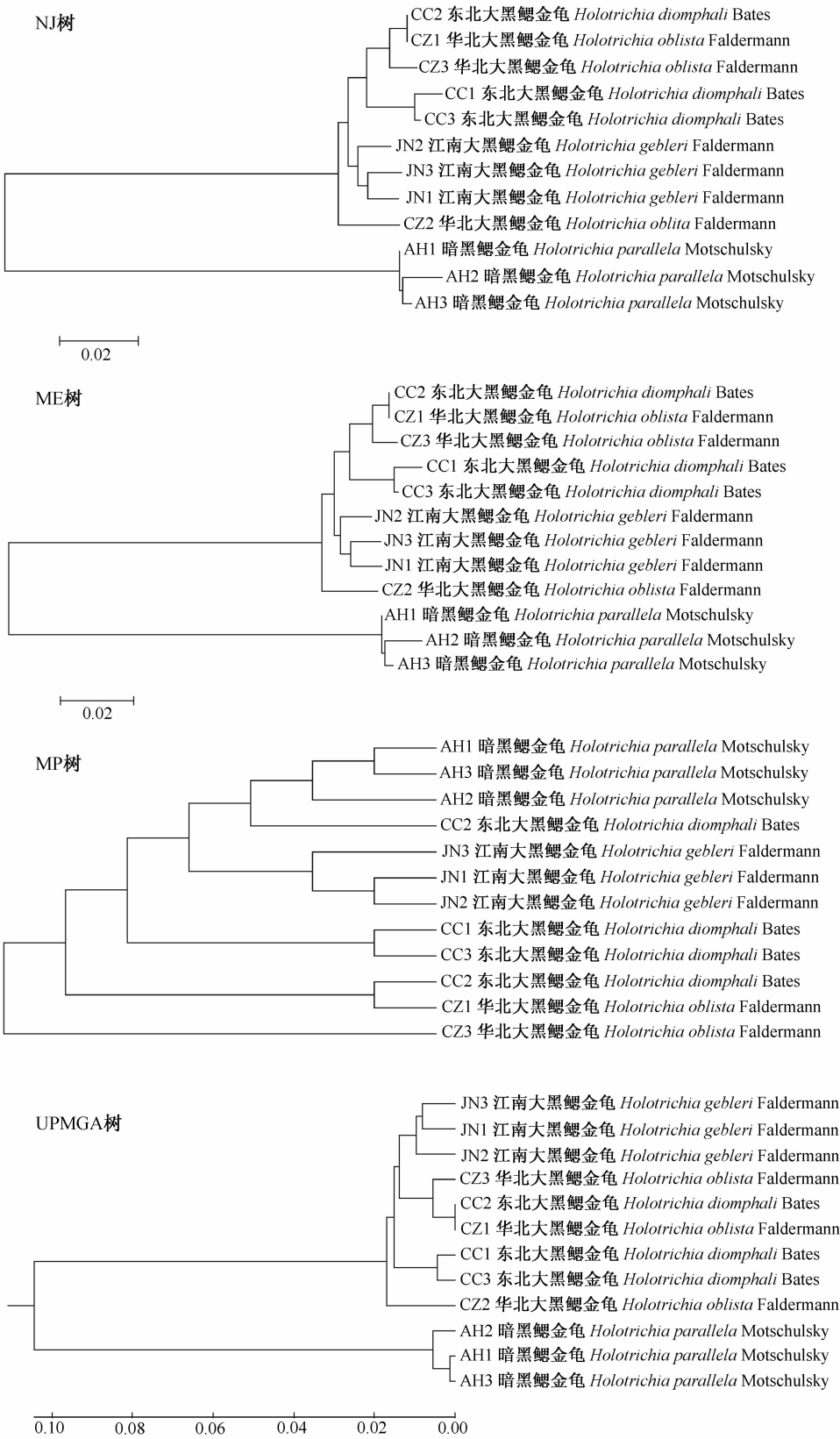


图 4 4 种系统进化树

Fig. 4 Four kinds of system evolutionary trees