

喻蜚螂属 *Onthophagus* 十二种蜚螂线粒体 COI 基因的 DNA 条形码研究*

李 蓓¹ 郭晓华^{1**} 刘广纯¹ 刘新民²

(1. 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室 沈阳大学生物与环境工程学院 沈阳 110044;

2. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院 呼和浩特 010022)

摘 要 对喻蜚螂属 *Onthophagus* 12 种蜚螂的线粒体 COI 基因 3' 端部分序列 (731 bp) 进行了比较, 结果显示, COI 序列的变异位点 213 个, 简约信息位点 167 个。碱基替代主要发生在第 3 位点 (64 次), 占替代总数的 83.12%。除掘喻蜚螂 *O. fodiens* 与婪喻蜚螂 *O. lenzi* 小于 2% 外, 其余种间遗传距离在 8.1% ~ 15.8% 之间, 种内遗传距离为 0 ~ 0.2%。单倍型多样性 (Hd) 和核苷酸序列多样性 (Pi) 分别为 0.944 ± 0.030 和 0.10518 ± 0.0045 。滑动窗口分析表明, 可变位点频率在 240 ~ 290 bp/675 bp 附近较高。NJ 树聚类结果与传统形态学分类相吻合: 外群代表种分化最早, 种间聚成一支, 种内个体优先聚集种下。本文认为 COI 基因适合作为喻蜚螂属物种鉴定的 DNA 条形码。

关键词 DNA 条形码, 喻蜚螂属, COI 基因, 分类鉴定

Application of DNA barcoding to mtDNA COI genes in 12 dung beetle (*Onthophagus*) species

LI Bei¹ GUO Xiao-Hua^{1**} LIU Guang-Chun¹ LIU Xin-Min²

(1. Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Biological and Environmental Engineering Shenyang University, Shenyang 110044, China;

2. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China)

Abstract The DNA sequences of 12 dung beetle species from the genus *Onthophagus* were compared using a molecular marker of the 3' end fragment (731 bp) of the mitochondrial DNA COI gene. 213 variable sites and 167 parsimony information sites were identified. Base substitution mainly occurred on the third codon (64 times), accounting for 83.12% of all substitutions. Interspecific divergence spanned from 8.1% to 15.8%, with the exception of the genetic distance between *O. fodiens* and *O. lenzi* which was below 2%, and intraspecific variation varied from 0 to 0.2%. Haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (Pi) were 0.944 ± 0.030 and 0.10518 ± 0.0045 , respectively. Two sliding windows analyses demonstrated that the frequency of variable sites for all sequences located within 240–290 bp and approximately 675 bp was high. NJ phylogenetic tree revealed that molecular clusters was consistent with the traditional taxonomy based on morphological characteristics. The outgroup lineages separate first from the phylogenetic tree. Interspecific specimens clustered in one branch with intraspecific specimens clustered according to species and that branch. These results indicate that COI gene barcoding can reliably identify species of the genus *Onthophagus*.

Key words DNA barcodes, *Onthophagus*, COI gene, taxonomy

喻蜚螂属 (*Onthophagus* Latreille, 1802) 隶属鞘翅目 (Coleoptera) 金龟总科 (Scarabaeoidea) 金龟科 (Scarabaeidae) 金龟亚科 (Scarabaeinae) (Lawrence and Newton, 1995)。目前, 世界记录的喻蜚螂属有 2 000 多种 (Emlen *et al.*, 2005), 我国记录有 280 种 (刘广瑞等, 1997)。该属虽起源于

* 资助项目: 辽宁省科技厅攻关计划项目 (2008214001); 辽宁省自然科学基金 (201102157)。

** 通讯作者, E-mail: zikexi@163.com

收稿日期: 2012-11-28, 接受日期: 2012-12-15

非洲,但除南极洲外,各州均有分布(Davis and Sutton,1997),是地球上甲虫种类分布最广的属之一,也是甲虫中最大的属(Howden and Cartwright,1963;Howden and Gill,1993)。蛭螂(dung beetle)俗称屎壳郎,取食腐蚀性动物粪便和动植物残骸(白明和杨星科,2008),对保护生境、维持自然生态平衡具有重要意义。某些种类是衡量草场退化和森林片段化的重要生态指标(张彩霞等,2008)。

DNA 条形码(DNA barcodes)是依据 DNA 片段的序列差异作为物种鉴定标准的分子鉴定方法(Hebert *et al.*,2003b),在鱼、鸟类、昆虫等生物研究中得到广泛应用(www.barcodeoflife.org)。线粒体细胞色素氧化酶 C 亚基 I (cytochrome C oxidase subunit I, COI) (或 *cox1*) 基因 5'端序列(648 bp)的进化速率较慢,且包含足够的序列变异位点(肖金花等,2004);3'端序列同样具有丰富的核苷酸变异信息(Ahrens *et al.*,2007)。该基因在分类鉴定(Grebennikov *et al.*,2004),发现隐存种和近缘种(siblings species)(van Velzen *et al.*,2007),探讨系统发育关系(Janzen *et al.*,2009)等方面具有独特优势(张媛等,2011)。

传统的喻蛭螂属分类研究主要以形态学为依据。但由于该类群形态复杂且极为相似(Emlen *et al.*,2005),同种不同个体的外部形态常常呈现不稳定变化(Tarasov and Solodovnikov,2011),给准确鉴定物种带来许多困难(Matthews,1972)。小驼喻蛭螂 *O. gibbulus* 是北方草原家畜粪便中较古老的种,具有明显的种内分化特点(张彩霞等,2008);独行喻蛭螂 *O. solivagus* 和寡居喻蛭螂 *O. viduus* 也是北方粪食性金龟常见种类,前者存在不同的鞘翅斑纹变异类型;掘喻蛭螂 *O. fodiens* 和婪喻蛭螂 *O. lenzi* 具有较为相似形态特征(刘广瑞等,1997)。针对此类研究,基于形态学则存在许多局限性(Monaghan *et al.*,2007)。

Monaghan 等(2005)曾对 *Canthon* 属蛭螂 DNA 条形码进行了探讨。Macagno 等(2011)基于 COI 基因 5'端序列对喻蛭螂属 *Onthophagus* 复合种的系统发育关系进行了研究。Monaghan 等(2007)应用 COI 3'端序列构建了金龟亚科(蛭螂)下族和属的系统发育关系。但是,应用 COI 基因对喻蛭螂属 *Onthophagus* 的分类鉴定研究还十分有限;COI 基因 3'端序列的 DNA 条形码应用尚需深入探讨;基于 COI 3'端序列对国内 5 种喻蛭螂的分

类及与相关种类的系统发育关系研究未见报道。

本研究测定了喻蛭螂属 *Onthophagus* 5 个种及外群的 23 个个体的线粒体 COI 基因 3'端序列,从 GenBank 下载 7 个种的同源片段,分析了 12 种喻蛭螂 COI 3'端序列的碱基替代频率、遗传距离、核苷酸和单倍型多样性,构建了分子系统树,重点分析了掘喻蛭螂和婪喻蛭螂的种间关系以及小驼喻蛭螂等种类的种内分化,探讨了代表种间的系统发育关系,为喻蛭螂属 DNA 条形码构建提供了支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用样本(表 1)采自 2010—2012 年 7—8 月。在牛、人粪便中捕捉采集,清水冲洗擦干,浸泡于无水乙醇,2 h 后更换无水乙醇并于 -20℃ 保存。依据形态分类特征进行分类鉴定(刘广瑞,1997)。表 1 中序列号 JX0641XX 和 KC1382 XX 为自测序列,AY1319XX (Monaghan *et al.*,2007)来自 GenBank 数据库。

1.2 总 DNA 提取

样本总 DNA 提取采用酚-氯仿抽提法。将乙醇保存的样本经无菌水清洗后,取胸部或腿部肌肉放置 1.5 mL 离心管,加 TE 缓冲液,用玻璃棒研碎肌肉组织,加入 SDS 1% 和蛋白酶 K (2 mg/mL),55℃ 消化过夜,溶于无菌水中,-20℃ 保存备用。

1.3 PCR 扩增与测序

采用 PCR 技术,扩增 mtDNA COI 基因 3'端部分区域。引物为 Jerry (C1-J-2183: 5'-caacatttattttgatttttgg) 和 Pat (L2-N-3014: 5'-tccaatgcactaatctgccatatta) (Simon *et al.*,1994)。PCR 扩增反应体系为:总体积 50 μ L,其中 10 $\times$ buffer 5.0 μ L,10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 dNTPs 1 μ L,10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的 1 对引物各 1 μ L,模板 DNA 3.0 μ L,1.5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,加去离子水至 50 μ L。扩增反应程序为:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,49℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。循环结束后,72℃ 延伸 4 min,4℃ 保存 10 min,之后放入 -20℃ 冰箱保存待测序。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统检测,DL2000 标记扩增片段长度。将条带明亮、背景干

净的扩增产物委托上海生工有限公司正反链双向 测序。测序仪为 ABI-PRISM 3730。

表 1 样本来源及 GenBank 登录号
Table 1 The sampling localities and their COI GenBank accession no.

科 Family	亚科及属 Subfamily and genus	种 Species	样品产地 Collection location	GenBank 登陆号 GenBank accession no.
金龟科 Scarabaeidae	金龟亚科 Scarabaeinae	Onthophagus	独行喲蜋螂 1 <i>O. solivagus</i> Harold, 山东菏泽 Shandong Heze	JX064146
			1886	
			独行喲蜋螂 3 <i>O. solivagus</i> Harold, 内蒙通辽 Neimeng Tongliao	KC138232
			1886	
			独行喲蜋螂 4 <i>O. solivagus</i> Harold, 甘肃白银 Gansu Baiyin	KC138233
			1886	
			独行喲蜋螂 5 <i>O. solivagus</i> Harold, 甘肃定西 Gansu Dingxin	KC138234
			1886	
			寡居喲蜋螂 1 <i>O. viduus</i> Harold, 辽宁沈阳 Liaoning Shenyang	JX064148
			1874	
			寡居喲蜋螂 2 <i>O. viduus</i> Harold, 山东菏泽 Shandong Heze	JX064149
			1874	
			寡居喲蜋螂 3 <i>O. viduus</i> Harold, 山东菏泽 Shandong Heze	JX064150
			1874	
			掘 喲 蜋 螂 1 <i>O. fodiens</i> 辽宁沈阳 Liaoning Shenyang	JX064151
			Waterhouse,1875	
			掘 喲 蜋 螂 2 <i>O. fodiens</i> 山东菏泽 Shandong Heze	JX064152
			Waterhouse,1875	
			婪喲蜋螂 <i>O. lenzi</i> Harold,1874 山东菏泽 Shandong Heze	JX064153
			小驼喲蜋螂 1 <i>O. gibbulus</i> (Pallas, 内蒙贺兰山 Neimeng Helanshan	JX064154
			1781)	
			小驼喲蜋螂 3 <i>O. gibbulus</i> (Pallas, 内蒙贺兰山 Neimeng Helanshan	KC138228
			1781)	
			小驼喲蜋螂 4 <i>O. gibbulus</i> (Pallas, 甘肃定西 Gansu Dingxin	KC138229
			1781)	
			小驼喲蜋螂 5 <i>O. gibbulus</i> (Pallas, 甘肃白银 Gansu Baiyin	KC138230
			1781)	
			小驼喲蜋螂 6 <i>O. gibbulus</i> (Pallas, 内蒙通辽 Neimeng Tongliao	KC138231
			1781)	

续表 1 (Table 1 continued)

科 Family	亚科及属 Subfamily and genus	种 Species	样品产地 Collection location	GenBank 登陆号 GenBank accession no.
		双齿喻蛻螂 <i>O. bidentatus</i> Drapiez, 厄瓜多尔 Ecuador		AY131923 *
		1819		
		粪堆喻蛻螂 <i>O. fimetarius</i> Roth, 南非 South Africa		AY131925 *
		1851		
		光背喻蛻螂 <i>O. glabratus</i> Hope, 澳大利亚 Australia		AY131926 *
		1841		
		马氏喻蛻螂 <i>O. mulgravei</i> Paulian, 澳大利亚 Australia		AY131927 *
		1937		
		怪异喻蛻螂 <i>O. obscurior</i> Boucomont, 1914	印度尼西亚 Indonesia	AY131928 *
		暗红喻蛻螂 <i>O. rubicundulus</i> Macleay, 1864	澳大利亚 Australia	AY131930 *
		短齿喻蛻螂 <i>O. semiarétus</i> D'Orbigny, 1902	马来西亚 Malaysia	AY131932 *
		洁蛻螂属 1 <i>C. molossus</i> L., 1775	山东菏泽 Shandong Heze	JX064142
粪金龟 Geotrupidae	角粪金龟亚科 Bolboceratinae	洁蛻螂属 2 <i>C. molossus</i> L., 1775	山东菏泽 Shandong Heze	JX064143
		洁蛻螂属 3 <i>C. molossus</i> L., 1775	山东菏泽 Shandong Heze	JX064144
		洁蛻螂属 4 <i>C. molossus</i> L., 1775	山东菏泽 Shandong Heze	JX064145
	角粪金龟属 <i>Bolbotrypes</i>	戴锤角粪金龟 1 <i>B. davidis</i> (Fairmaire, 1891)	内蒙贺兰山 Neimeng Helanshan	JX064156
		戴锤角粪金龟 2 <i>B. davidis</i> (Fairmaire, 1891)	辽宁沈阳 Liaoning Shenyang	KC138235
	粪金龟亚科 Geotrupinae			
		粪堆粪金龟 1 <i>G. stercorarius</i> (L., 1758)	内蒙贺兰山 Neimeng Helanshan	JX064157
	粪堆粪金龟属 <i>Geotrupes</i>	粪堆粪金龟 2 <i>G. stercorarius</i> (L., 1758)	内蒙贺兰山 Neimeng Helanshan	JX064158

注: 分类体系依照 Lawrence & Newton (1995)。* AY1319XX 序列号来源 GenBank 数据库, 其他序列来自本试验。
Taxonomy following Lawrence & Newton (1995). * indicates the accession no. AY1319XX from GenBank, and the other sequenced from our study.

1.4 序列处理和系统分析

将自测的喻蜣螂属 15 个个体以及外群 8 个个体的 COI 基因 3' 端序列, 采用 DNASTar 7.1.0 软件 (Burland, 2000) 中的 SeqMan 进行正反链拼接和校正。在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 运行 BLAST 程序, 比较序列同源性。联合 GenBank 下载的 7 条同源序列, 采用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对 (Thompson *et al.*, 1997)。应用 Mega4.0 软件统计核苷酸组成和替代位点 (Tamura *et al.*, 2007), 基于 Kimura-2 双参数模型, 计算遗传距离。运用 DAMBE 软件 (Xia and Xie, 2001) 进行碱基替代饱和度分析。应用 DNAsp 5.0 软件分析单倍型多样性 (haplotype diversity, Hd) 和核苷酸多样性 (nucleotide diversity, Π/π)。75 bp 和 50 bp 滑动窗口下 (步长 step size 为 25 bp) 考察核苷酸变异位点分布 (Librado and Rozas, 2009)。运行 MEGA4.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) (Saitou *et al.*, 1987), 基于 Kimura-2 参数模型构建系统发育树, bootstrap 分析重复抽样 1 000 次, 检验各节点的置信度。

2 结果与分析

2.1 基因序列特征分析

运用 Mega4.0 软件, 计算喻蜣螂属 12 个种的碱基组成和碱基替代数。结果显示, 731 bp 片段总计编码 243 个氨基酸, 没有任何碱基的插入、缺失。序列变异位点 213 个, 占总位点的 29.14%, 简约信息位点 167 个, 占 22.85%。A、T、G、C 含量分别为 32.6%、39.4%、13.8%、14.2%, A + T 含量 72.0%, G + C 含量 28.2%, 主要源于第 3 位点的碱基偏倚 (90.8% 和 9.2%)。碱基替代共发生 77 次, 转换 (transition, Ts) 34 次; 颠换 (transversion, Tv) 43 次。转换/颠换的比 (R) 平均为 0.8, 第 1, 2, 3 位点分别为 2.8, 0.9 和 0.6。核苷酸替换主要发生在密码子第 3 位点上, 总计为 64 次, 占总数的 83.12% (图 1)。第 3 位点显示高水平的颠换频率。采用 DAMBE 软件进行替代饱和度分析, 以转换和颠换数为纵轴, 以 TN93 模式的 genetic distance 为横轴, 生成散点图, 图中的转换和颠换数呈线性增长。

2.2 遗传距离分析

应用 Mega4.0 软件, 基于 Kimura 2-parameter 模型, 计算种群间的遗传距离 (转换 + 颠换)。不含外群时, 除掘喻蜣螂与婪喻蜣螂种间距离为 1.1% 外, 其余种间遗传距离在 8.1% ~ 15.8% 之间; 种内遗传距离为 0 ~ 0.2%, 小驼喻蜣螂种内遗传距离为 0.2%, 独行喻蜣螂为 0.1%, 掘喻蜣螂和寡居喻蜣螂均为 0 (表 2)。包含外群时, 将内外群分成 4 组。Gp1 (内群喻蜣螂属个体) 与 Gp2 (外群神农洁蜣螂 *Catharsius molossus*) 之间的遗传距离为 17.0%, Gp1 与 Gp3 (粪堆粪金龟 *Geotrupes stercorarius*)、Gp1 与 Gp4 (戴锤角粪金龟 *Bolbotrypes davidis*) 之间分别为 19.7%、18.8%。

2.3 单倍型和核苷酸多样性及变异位点分布状况分析

采用 DNAsp5.0 软件分析单倍型和核苷酸多样性及变异位点分布状况, 结果显示, 喻蜣螂属 12 个种 22 个个体分属 14 个单倍型, 其中独行喻蜣螂 4 个样本占 2 个单倍型 (H6, H10), 小驼喻蜣螂 4 个样本占 2 个单倍型 (H11, H12), 寡居喻蜣螂的 3 个样本和掘喻蜣螂的 2 个样本各占 1 个单倍型 (H7, H2), 其余的 8 个种各占 1 个单倍型。单倍型多样性 (Hd) 为 0.944 ± 0.030 , 核苷酸多样性 (Π/π) 为 0.10518 ± 0.0045 。运行滑动窗口考察了核苷酸多态性变异位点分布规律, 75 bp 和 50 bp 滑动窗口下, 序列变异位点的结果相似, 460 ~ 480 bp 附近可变位点数 (number of variable sites, S) 较少, 分别为 13 个和 7 个; 240 ~ 290 bp、675 bp 附近可变位点数较多, 分别为 28 个和 22 个 (图 2)。

2.4 系统发育关系分析

以粪金龟科 (Geotrupidae) 的粪堆粪金龟、戴锤角粪金龟以及金龟亚科 (Scarabaeinae) 的神农洁蜣螂作外群, 采用 Mega 4.0 软件构建 NJ 树的结果显示 (图 3), 外群粪堆粪金龟、戴锤角粪金龟首先从系统树分离出来, 然后分化的是与喻蜣螂属同亚科的洁蜣螂代表种。喻蜣螂属所有种聚集并为单系群, 其中, (1) 来自马来西亚 *O. semiareus* 最早分化为第一支序; (2) 国内的寡居喻蜣螂和独行喻蜣螂 *O. solivagus* 不同个体分别以 100% 的置信度聚集在本种分支下, 再与来自印度尼西亚的 *O. obscurior* 聚集为第二支序; (3) 其余种类聚成与第二支序平行的第三支序。在第三支序中, 掘喻蜣

表 2 喻蛭螂属种间和种内平均遗传距离(基于 Kimura-2 双参数模型)

Table 2 Interspecies and intraspecies average divergence of <i>Onthophagus</i> based on the Kimura-2-parameters model													种内遗传距离 Intraspecies divergence
种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1													—
2	0.107												0
3	0.098	0.106											—
4	0.096	0.098	0.081										—
5	0.109	0.011	0.106	0.109									—
6	0.121	0.100	0.104	0.115	0.105								0.001
7	0.131	0.120	0.140	0.130	0.127	0.099							0
8	0.137	0.146	0.146	0.148	0.153	0.125	0.142						—
9	0.148	0.146	0.148	0.135	0.151	0.148	0.135	0.158					—
10	0.132	0.124	0.153	0.134	0.131	0.139	0.145	0.157	0.142				0.002
11	0.112	0.099	0.096	0.107	0.107	0.115	0.120	0.140	0.141	0.112			—
12	0.109	0.118	0.122	0.117	0.123	0.131	0.127	0.130	0.143	0.121	0.101		—

注:1. 暗红喻蛭螂 *O. rubicundulus*; 2. 掘喻蛭螂 *O. fodiens*; 3. 双齿喻蛭螂 *O. bidentatus*; 4. 粪堆喻蛭螂 *O. fimetarius*; 5. 婪喻蛭螂 *O. lenzi*; 6. 独行喻蛭螂 *O. solivagus*; 7. 寡居喻蛭螂 *O. viduus*; 8. 怪异喻蛭螂 *O. obscurior*; 9. 短齿喻蛭螂 *O. semiareus*; 10. 小驼喻蛭螂 *O. gibbulus*; 11. 光背喻蛭螂 *O. glabratus*; 12. 马氏喻蛭螂 *O. mulgravei*.
“—”代表该种仅一个个体,无种内遗传距离 “—” indicates that there is only one individual from this species and no intraspecies divergence.

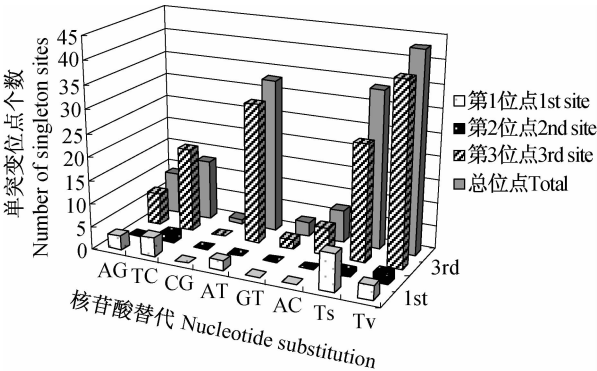


图 1 喻蛭螂属COI 序列各密码子位点的碱基变异
Fig.1 Sequence variation of the mitochondrial COI gene of *Onthophagus* species analyzed
AG、TC 为转换 (Ts), CG、AT、GT、AC 为颠换 (Tv)。
AG、TC are transition (Ts); CG、AT、GT、AC are transversion (Tv)。

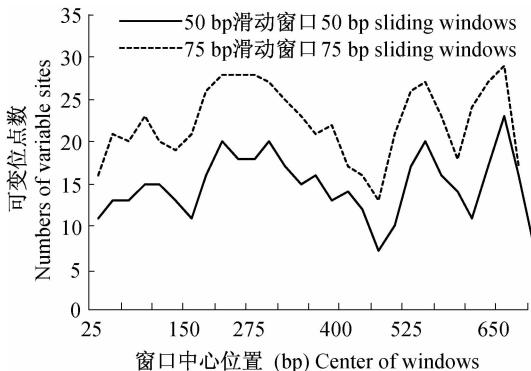


图 2 翁蛭螂属COI 序列可变量点数的滑动窗口分析
Fig.2 Sliding windows analysis(variable sites,S) among COI sequences of *Onthophagus* species

螂、婪喻蛭螂则以 100% 置信度优先聚集为姊妹种,形成第 1 小分支;厄瓜多尔的 *O. bidentatus*、澳大利亚的 *O. rubicundulus*、南非的 *O. fimetarius* 聚

为第 2 小分支;国内的小驼喻蛭螂以较高的置信度聚在种分支下,再与澳大利亚 *O. glabratus*、澳大利亚 *O. mulgravei* 聚集为第 3 小分支。分子树中,所有种的不同个体(包括外群)均以较高的信度优先聚集在本种分支下。

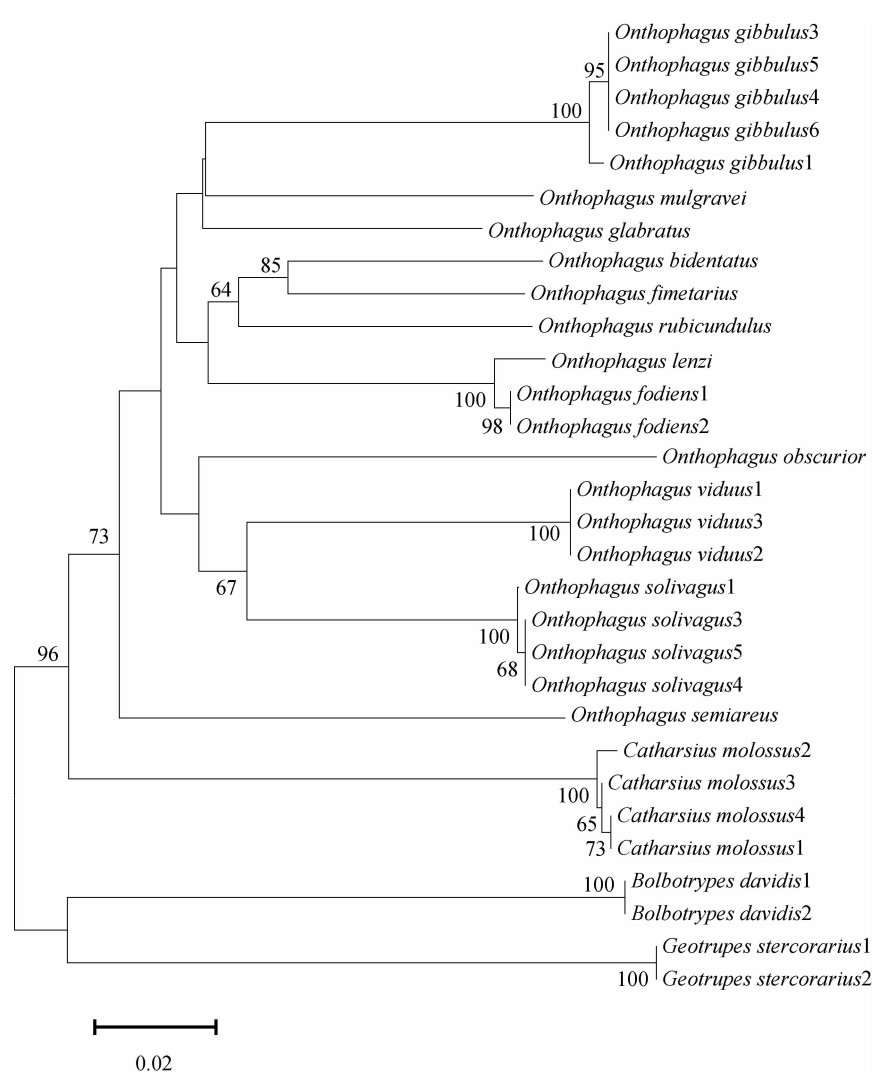


图 3 基于COI 条形码构建的喈蜣属种类 NJ 树

Fig.3 NJ tree based on COI gene sequences data from the genus *Onthophagus* species

3 讨论

COI 基因作为 DNA 条形码标准序列的研究正逐步深入。多数研究认为COI 基因既有足够的变异位点,又有蛋白编码基因所共有的兼并性特点,即密码子第 3 位碱基不受自然选择压力的影响,可以自由变异 (Herbert *et al.*, 2003a)。本文分析了 12 种喈蜣的COI 基因序列,731 个核苷酸位点中,A + T 含量占 72.0%,表现了昆虫线粒体基因序列碱基组成的共性特征 (Simon *et al.*, 1994; Price, 2009)。序列中变异位点 213 个,简约信息位点 167 个,第 3 位点发生碱基替代的频率较高,第 3 位点显示高水平的颠换频率,需进行碱基替代饱和度检验 (Knight and Mindell, 1993),说

明COI 基因可为重建喈蜣属系统发育关系提供足够的信息简约位点。

物种间 DNA 序列的遗传距离是分类鉴定的重要依据。Hebert 等 (2003b) 对 13 320 个种的动物COI 序列分析的结果显示,98% 的种间遗传距离大于 2%,提出将 2% 的遗传距离作为划分种间与种内的阈值。本研究中,内群喈蜣属与外群戴锤角粪金龟、粪堆粪金龟、神农洁蜣螂之间的平均遗传距离与依据形态学界定的科、亚科、属分类地位相吻合。喈蜣属种间,除掘喈蜣与婪喈蜣外,其余种间遗传距离在 8.1% ~ 15.8% 之间,远大于 2%,基本符合基于遗传距离界定物种的规律性。环境和生态因子的同质性可以引起种间遗传基础的趋同性变异,使种间遗传距离减小

(Meier *et al.*, 2006)。掘喙蛭螂与婪喙蛭螂的遗传距离小于 2%，分子树上的较早优先聚集也体现了两个种间的近缘关系。考察掘喙蛭螂与婪喙蛭螂形态学特征，两者存在许多共同点，如小盾片缺如，前胸背板后缘无凹沟，前足胫节端部不平截，雄虫前足胫节内侧端部不延伸呈指状，头面不呈八角形等，主要区别在于，掘喙蛭螂前胸背板有“凸”字形或近三角形平缓凸面；而婪喙蛭螂前胸背板平缓，不呈“凸”字形或三角形(刘广瑞等，1997)。可能的原因是在长期进化过程中，两个种间发生了渗入杂交(introgressive hybridization)或者简单杂交(simple hybridization)，导致种间发生基因渗透和交流(van Velzen *et al.*, 2007; Schlei *et al.*, 2008; Wirta, 2009)，演化为近缘种或姊妹种。喙蛭螂属种内，小驼喙蛭螂和独行喙蛭螂分别略有分化。小驼喙蛭螂作为较古老的种，在加快草场粪便的分解速度、破碎转移，促进营养和能量循环中起重要作用。张彩霞等(2008)采用 RAPD 分子标记技术对内蒙古中部地区小驼喙蛭螂种群做了分析，认为小驼喙蛭螂种内发生了高水平的遗传分化，环境的异质性是引起趋异分化的主要原因。本研究样本取自内蒙甘肃两省的 4 个地区，长期的环境差异造成了遗传基础多样性，因此存在一定水平的种内分化。独行喙蛭螂不同个体的鞘翅具多样性，翅基 I ~ III、V ~ VI 沟带间和翅端部 I ~ IV、V ~ VI 沟带间带有棕黄色斑点，端部斑点常有变或不显，呈现多样性变异。掘喙蛭螂和寡居喙蛭螂 2 个种的个体间差异无明显分化。

重建系统发育关系是物种分类鉴定的主要手段(Frézal and Leblois, 2008)。Monaghan 等(2007)采用 COI 等基因构建金龟亚科 Scarabaeinae 的 MrBayes 树结果显示，*O. semiareus* 较早从进化树上分化出来，*O. fimetarius* 分化的较晚，其余 5 个种介于分子树中部。本研究建树结果表明，*O. semiareus* 仍是分化最早的一个分支，寡居喙蛭螂和独行喙蛭螂的分支位置晚于 *O. obscurior*，掘喙蛭螂和婪喙蛭螂早于 *O. bidentatus*、*O. rubicundulus*、*O. fimetarius* 组成的分支，小驼喙蛭螂晚于 *O. mulgravei* 和 *O. glabratus*。12 个种聚集在本属下，说明属内种间具有较近亲缘关系，这与 Emlen 等(2005)研究喙蛭螂属的性选择和角的形态进化所得结论相吻合，与形态学的分类地位一

致。本研究用不同方法构建的分子系统树均显示喙蛭螂属种类聚合为一个单系群，具有较近的共同祖先。除考虑属种间支序外，鉴定物种还应参考同种样本分组聚类，即同种的个体聚成一枝到种为正确的种的鉴定(Hollingsworth *et al.*, 2009)。NJ 树中，所有个体(包括外群)分别优先聚集到本种分支下，验证了形态学上种的鉴定的正确性。

单倍型多样性指数(Hd)和核苷酸多样性指数(Π/π)是 DNA 条形码分类的另外两个重要参数。本研究结果证明，国内外喙蛭螂种群不仅积累了单倍型多样性，还积累了核苷酸序列的多样性(Avise, 2000)。这与 Sole 等(2008)对马达加斯加 Canthonini and Dichotomini 族蛭螂的种群单倍型多样性分析结果较为接近(Hd 为 0.909 ~ 1.000)。多数昆虫分类和系统发育关系研究采用 COI 基因 5' 端序列，本研究参考了 Monaghan 等(2007)的研究方法，探讨了应用 COI 3' 端序列的有效性，认为 COI 3' 端也可作为 DNA 条形码的候选区域对喙蛭螂种类进行鉴定。有研究认为，选择可变位点丰富的短序列作为条形码可获得与全序列基本一致的结果(Janzen *et al.*, 2005)；特异性微型条形码(minimalist-barcoding)应用于质量不高的样本能提高物种鉴定的准确性(Hajibabaei *et al.*, 2006)。本试验滑动窗口分析结果表明，COI 基因 3' 端多变区域短序列也包含较多的变异信息。

DNA 条形码的建立应以广泛的样本采集作为基础(DeSalle *et al.*, 2005)。本研究样本数量有限，但分析结果印证了 DNA 条形码的有效性，可帮助对喙蛭螂属种群分类鉴定的理解，为 DNA 条形码应用提供分子数据支持。未来的 DNA 条形码应用研究，应增加不同地理位置和不同分类阶元的代表性，结合形态学和地理生物学，综合种群杂交、区域分化、近期辐射和核基因序列多样性等因素展开讨论，并筛选可变位点多的短序列作为标记，在保证准确性的前提下尽可能降低测序成本。

致谢:感谢沈阳农业大学方红教授对标本进行鉴定。

参考文献 (References)

- Ahrens D, Monaghan MT, Vogler AP, 2007. DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mol. Phyl. Evol.* , 44(1) :436 – 449.
- Avice JC, 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts London, England: Harvard University Press. 447 – 448.
- Burland TG, 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.* , 132:71 – 91.
- Davis AJ, Sutton SL, 1997. A dung beetle that feeds on fig: implications for the measurement of species rarity. *J. Trop. Ecol.* , 13:759 – 776.
- Desalle R, Egan MG, Siddall M, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* , 360:1905 – 1916.
- Emlen DJ, Marangelo J, Ball B, Cunningham CW, 2005. Diversity in the weapons of sexual selection: Horn evolution in the beetle genus *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Evolution* , 59(5) :1060 – 1084.
- Frézal L, Leblois R, 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* , doi: 10.1016 / j. meegid.
- Grebennikov VV, Ballerio A, Ocampo FC, Scholtz CH, 2004. Larvae of Ceratocanthidae and Hybosoridae (Coleoptera: Scarabaeoidea): study of morphology, phylogenetic analysis and evidence of paraphyly of Hybosoridae. *Syst. Entomol.* , 29(4) :524 – 543.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield J, Hebert PDN, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes* , 6(4) :959 – 964.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* , 270(1512) :313 – 321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWard J, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* , 270 (Suppl.) :96 – 99.
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM, 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol. Ecol. Res.* , 9(2) :439 – 457.
- Howden HF, Cartwright OL, 1963. Scarab beetles of the genus *Onthophagus* Latreille north of Mexico (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc. US Natl. Mus.* , 114(3467) :1 – 35.
- Howden HF, Gill BD, 1993. Mesoamerican *Onthophagus* Latreille in the Dicranus and Mirabilis groups (Coleoptera: Scarabaeidae). *Can. Entomol.* , 125(6) :1091 – 1114.
- Janzen DH, Hajibabaei M, Burns JM, Hallwachs W, Remigio E, Hebert PDN, 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* , 1462(360) :1835 – 1845.
- Janzen DH, Wachs WH, Blandin P, Burns J, Cadiou JM, Chacon I, Dapkey T, Deans AR, Epstein ME, Espinoza B, Franclemont JG, Haber WA, Hajibabaei M, Hall JPW, Hebert PDN, Hajibabaei M, Hall JPW, Hebert PDN, Gauld ID, Harvey DJ, Hausmann A, Kitching IJ, Lafontaine D, Landry JF, Claude Lemaire, Miller JY, Miller JS, Miller L, Miller SE, Montero J, Munroe E, Green SR, Ratnasingham S, Rawlins JE, Robbins RK, Rodriguez JJ, Rougerie R, Sharkey MJ, Smith MA, Solis MA, Sullivan JB, Thiaucourt P, Wahl DB, Weller SJ, Whitfield JB, Willmott KR, Wood DM, Woodley NE, Wilson JJ, 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Mol. Ecol. Res.* , 9(Suppl.1) :1 – 26.
- Knight A, Mindell DP, 1993. Substitutions bias weighting of DNA sequence evolution and the phylogenetic positions of Fea's viper. *Sys. Biol.* , 42(1) :18 – 31.
- Lawrence JF, Newton AF, 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family group names)//Pakaluk J, Slipinski SA (eds.). *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson* Muzeum i Instytut Zoologii PAN. Warszawa. 779 – 1006.
- Librado P, Rozas J, 2009. DNAsp V5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* , 25(11) :1451 – 1452.
- Macagno ALM, Pizzo A, Rolando A, Palestin C, 2011. Size and shape interspecific divergence patterns partly reflect phylogeny in an *Onthophagus* species-complex (Coleoptera: Scarabaeidae). *Zool. J. L. Soc.* , 162(3) :482 – 498.
- Matthews EG, 1972. A revision of the Scarabaeinae dung beetles of Australia. I. Tribe Onthophagini. *Aust. J. Zool.* , 19(9) :3 – 330.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Peter KL Ng, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.* , 55(5) :715 – 728.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP, 2005.

- DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc.* , 360(1462):1925 – 1933.
- Monaghan MT, Inward DJG, Hunt T, Vogler AP, 2007. A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Mol. Phyl. Evol.* , 45(2):674 – 692.
- Price DL, 2009. Phylogeny and biogeography of the dung beetle genus *Phanaeus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Syst. Entomol.* , 34(1):137 – 150.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* , 4(4):406 – 425.
- Schlei OL, Crete-Lafreniere A, Whiteley AR, 2008. DNA barcoding of eight North American coregonine species. *Mol. Ecol. Resour.* , 8(6):1212 – 1218.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 87(6):651 – 701.
- Sole CL, Bastos ADS, Scholtz CH, 2008. Intraspecific patterns of mitochondrial variation in natural population fragments of a localized desert dung beetle species, *Pachysoma gariepinum* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Heredity* , 99(5):464 – 475.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* , 24(8):1596 – 1599.
- Tarasov SI, Solodovnikov AY, 2011. Phylogenetic analyses reveal reliable morphological markers to classify mega-diversity in Onthophagini dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *Cladistics* , 27(5):490 – 528.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* , 25(24):4876 – 4882.
- van Velzen R, Bakker FT, van Loon JJA, 2007. DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae). *Proc. Neth. Entomol. Soc.* , 18:95 – 103.
- Wirta H, 2009. Complex phylogeographical patterns, introgression and cryptic species in a lineage of Malagasy dung beetles. *Biol. J. Linn. Soc.* , 96(4):942 – 955.
- Xia X, Xie Z, 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* , 92:371 – 373.
- 白明, 杨星科, 2008. 粪食性金龟的行为及其适应演化. 昆虫知识, 45(3):499 – 505.
- 刘广瑞, 章有为, 王 瑞, 1997. 中国北方常见金龟子彩色图鉴. 北京: 中国林业出版社. 1 – 29.
- 肖金花, 肖 晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向 – DNA 条形编码. 动物学报, 50(5):852 – 855.
- 张彩霞, 邵丽华, 刘新民, 2008. 内蒙古中部小驼喻蜣螂七个种群的遗传多样性. 生态学杂志, 27(9):1520 – 1525.
- 张媛, 郭晓华, 刘广纯, 张卓, 2011. DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(2):410 – 416.