

基于线粒体 ND1 和 16S rRNA 基因序列探讨 中国蝴蝶 12 科的系统发育关系 (鳞翅目: 双孔次亚目: 蝶类)

邹方振¹, 郝家胜^{1,*}, 黄敦元^{1,2}, 张大秀¹, 朱国萍¹, 朱朝东^{2,*}

(1. 安徽师范大学生命科学学院分子进化与生物多样性实验室, 安徽芜湖 241000;

2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学所级重点实验室, 北京 100101)

摘要: 对中国 12 科共 32 种代表蝶类的 ND1 基因和 16S rRNA 基因进行了序列测定(包括新测 30 种 ND1 基因和 9 种 16S rRNA 基因)和比较分析, 同时采用邻接法、最大似然法和贝叶斯法构建了 12 科蝶类的系统发育树, 探讨了其高级分类群的系统发育关系。序列分析的结果显示: 经比对处理后的两个基因总长度为 869 bp, 其中保守位点 373 个, 可变位点 496 个, 简约信息位点 375 个; A+T 的平均含量为 80.2%, 明显高于 C+G 的平均含量 19.8%。分子系统树表明: 蛱蝶科不是单系群; 珍蝶类、斑蝶类和喙蝶类位于蛱蝶科内; 粉蝶科和凤蝶科具有共同祖先。据此建议: 绢蝶科应归入凤蝶科; 蛱蝶科归入灰蝶科; 珍蝶类、斑蝶类和喙蝶类作为蛱蝶科中的亚科, 眼蝶类从蛱蝶科中分离出来独立成科。另外, 环蝶类的系统分类地位还有待于进一步研究。

关键词: 鳞翅目; 双孔次亚目; 蝶类; ND1 基因; 16S rRNA 基因; 系统发育

中图分类号: Q969 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2009)02-191-11

Molecular phylogeny of 12 families of the Chinese butterflies based on mitochondrial ND1 and 16S rRNA gene sequences (Lepidoptera: Ditrysia: Rhopalocera)

ZOU Fang-Zhen¹, HAO Jia-Sheng^{1,*}, HUANG Dun-Yuan^{1,2}, ZHANG Da-Xiu¹, ZHU Guo-Ping¹, ZHU Chao-Dong^{2,*} (1. Laboratory of Molecular Evolution and Biodiversity, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolutionary Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In this study, the phylogenetic relationships of 12 families of the Chinese butterflies were investigated based on mitochondrial ND1 and 16S rRNA gene sequences. Thirty-two Chinese species were included in the analyses, of which 30 species were sequenced for the ND1 and 9 for the 16S rRNA gene. In the alignment, the two combined genes were 869 bp in length, including 373 conserved, 496 variable and 375 parsimonious-informative sites, respectively. The average percentage of A + T is 80.2%, which is much higher than that of C + G (19.8%). With both *Zygaena angelicae* and *Z. transalpina* as the outgroup taxa, the phylogenetic trees were reconstructed with the neighbor-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) methods. Major results included that: 1) Nymphalidae is not monophyletic; 2) the acraeids, danaiids and libytheids are included in Nymphalidae; 3) the Pieridae and Papilionidae have a closest common ancestor; 4) the Parnassiidae should be included in Papilionidae; and 5) the satyrids should be separated from the Nymphalidae and be given a family rank. In addition, our results also suggest that the Riodinidae should be classified into Lycaenidae, and the acraeids should be given a subfamily rank. As to the amathusiidae, its taxonomic level and phylogenetic position need further more detailed studies.

Key words: Lepidoptera; Ditrysia; Rhopalocera; mitochondrial ND1 gene; 16S rRNA gene; phylogeny

基金项目: 安徽省优秀青年基金(08040106811); 安徽省“重要生物资源保护与利用”重点实验室及中青年学术带头人专项基金(No. 590620); 安徽师范大学生物大分子重点实验室开放课题基金(2006A001); 安徽省高校“生物环境与生态安全”省级重点实验室专项基金资助课题

作者简介: 邹方振, 男, 1977年6月生, 安徽合肥人, 硕士研究生, 从事蝶类分子系统学研究, E-mail: zfh2006@163.com

* 通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: jshaonigpas@sina.com; zhued@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2008-07-14; 接受日期 Accepted: 2008-12-17

蝴蝶种类繁多, 已知的世界蝶类多达 15 141 种 (寿建新等, 2006)。其中, 中国蝴蝶已记载了 12 科、32 亚科、67 族、375 属和 1 317 种 (周尧, 1998)。在近 250 年的时间内, 蝶类的系统分类研究主要依据其成虫的形态学特征 (Ackery *et al.*, 1999)。随着分子生物学技术的发展, 众多的学者开始利用分子数据 (Brower and Egan, 1997; Brower, 2000; Caterino *et al.*, 2001), 以及形态学和分子的联合数据 (Kons, 2000; Wahlberg and Zimmermann, 2000) 来研究蝶类的系统发育关系。迄今, 它们种、属级别的分类已臻成熟, 其中的大多数类群已被命名 (Ackery *et al.*, 1999), 但是在较高级分类阶元的系统分类研究中仍然存在一些未解的难题 (Ehrlich, 1958; Scott, 1985; Martin and Pashley, 1992; De Jong *et al.*, 1996; Vane-Wright, 2003)。

目前, 中国蝶类的划分仍按照周尧 (2000) 的 12 科分类系统。国际上则通常将蝶类分成 2 总科 [弄蝶总科 (Hesperioidea) 和凤蝶总科 (Papilionoidea)]、5 科 [弄蝶科 (Hesperiidae)、凤蝶科 (Papilionidae)、粉蝶科 (Pieridae)、灰蝶科 (Lycaenidae) 和蛱蝶科 (Nymphalidae)]。眼蝶类 (satyrids)、斑蝶类 (danaids) 和喙蝶类 (libytheids) 等作为亚科级, 环蝶类 (amathusiids) 和珍蝶类 (acraeids) 作为族级分类阶元置于蛱蝶科内。蛱蝶类 (riodinids) 归为灰蝶科的一个亚科。但是, 其中各类群的系统位置和单系性等问题还未完全达成一致 (Ehrlich, 1958; Kristensen, 1976; Robbins, 1988; De Jong *et al.*, 1996; Ackery *et al.*, 1999; Vane-Wright, 2003; Wahlberg *et al.*, 2005)。

由于线粒体 DNA 在分子进化中有许多独特的优越性 (成新跃等, 2000), mtDNA 已成为研究进化的重要材料 (张亚平和施立明, 1992)。ND1 和 16S rRNA 基因是线粒体中常用的分子标记, 已被成功地应用于鳞翅目昆虫系统发生关系研究中 (Chapeo *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1994; Brower and Egan, 1997; Brower, 2000; Campbell *et al.*, 2000)。本研究尝试运用中国 12 科蝶类代表种类的 ND1 和 16S rRNA 基因序列数据, 结合 GenBank 中相关物种的同源序列数据, 基于不同的替代模型和构树方法, 重建 12 科蝶类的分子系统树, 以期进一步探讨中国 12 科蝶类之间的系统发育关系和有关类群的系统分类学地位。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用材料及来源见表 1。标本由郝家胜教授自野外采集并参考周尧 (1998, 2000) 等专著,

依据外形、翅纹、翅脉、触角、复眼等形态特征进行仔细鉴定后, 用 95% 酒精固定, 并置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取与纯化

采用蛋白酶 K-玻璃粉法提取和纯化基因组 DNA, 具体程序参照 Hao 等 (2005)。

1.3 引物合成、PCR 扩增及序列测定

扩增两种线粒体基因的引物均为通用引物。16S rDNA 引物序列为 16Sa: 5'-CGCCTGTTATCAAAAACAT-3', 16Sb: 5'-CCGGTCTGAACTCAGAT-3'; ND1 基因引物序列为 ND1a: 5'-CGTAAAGTCCTAGCATTATTCAGATTTCG-3', ND1b: 5'-ATCAAAAAGGAGCTCGATTAGTTTC-3', 引物均由上海申能博彩生物科技有限公司合成。PCR 反应的总体积为 50 μ L, 其中 10 \times Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 0.6 mg/mL BSA 7.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 nmol/L 引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, Taq 酶 1 μ L。PCR 反应程序, 16S rDNA 为: 94℃ 预变性 5 min 后, 按下述程序进行 35 个循环: 94℃ 变性 1 min 15 s, 52℃ 退火 1 min 10 s, 74℃ 延伸 2 min; 最后 72℃ 总延伸 10 min。ND1 基因为: 94℃ 预变性 5 min 后; 按下述程序进行 35 个循环: 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 2 min; 最后 72℃ 总延伸 10 min。反应均在 TC-XP 型基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司) 上进行。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测, 扩增产物与目标片段长度相符。PCR 产物经 3S 柱离心式 PCR 产物小量快速纯化试剂盒 (上海申能博彩) 纯化后, 在 ABI-377 型 DNA 自动测序仪进行序列测定 (上海英骏生物技术有限公司)。

1.4 序列处理和系统分析

用 Blast 软件将得到的序列与 GenBank 中的相关序列进行同源性比对, 确认所测序列无误。运用 PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) 软件对 ND1 和 16S rRNA 基因进行同质性检测 (the partition homogeneity test), 结果 $P=0.91$, 表明 ND1 和 16S rRNA 基因可以合并进行分析。通过 Clustal X 1.8 软件对序列进行对位排列 (Thompson *et al.*, 1997), 采用 DAMBE 软件 (Xia and Xie, 2001) 分析基因突变是否饱和。在序列数据和系统发育分析中分别运用 MEGA (version 3.0)、PAUP (version 4.0b10) 和 MrBayes (version 3.1.2) 等软件包 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Swofford, 2002; Kumar *et al.*, 2004)。

表 1 样品来源及 16S 和 ND1 GenBank 登录号

Table 1 The sampling locality and date of the studied materials and the GenBank accession numbers of their 16S and ND1

科/亚科 Family/Subfamily	种名 Species	样品来源及采集时间 Sampling locality / date	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
			16S	ND1
弄蝶科 Hesperidae				
竖翅弄蝶亚科 Coeliadinae	绿弄蝶 <i>Choaspes benjaminii</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EU783922	EU783937
花弄蝶亚科 Pyrginae	白弄蝶 <i>Abraximorpha davidii</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150343	EU783931
花弄蝶亚科 Pyrginae	密纹蛭弄蝶 <i>Satarupa monbeigi</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150353	EU783958
凤蝶科 Papilionidae				
凤蝶亚科 Papilioninae	斑凤蝶 <i>Papilio clytus</i>	广东海安 Haian Guangdong/2005.7	DQ673337	EU783951
凤蝶亚科 Papilioninae	玉带凤蝶 <i>Papilio polytes</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	DQ673341	EU783952
凤蝶亚科 Papilioninae	蓝凤蝶 <i>Papilio protenor</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	DQ673339	EU783953
凤蝶亚科 Papilioninae	碧凤蝶 <i>Papilio bianor</i>	云南大理 Dali, Yunnan/2006.7	DQ673341	EU783950
凤蝶亚科 Papilioninae	白斑凤蝶 <i>Byasa dasarada</i>	海南五指山 Wuzhishan, Hainan/2005.7	DQ673335	EU783935
凤蝶亚科 Papilioninae	红纹绿凤蝶 <i>Pathysa nomius</i>	海南三亚 Sanya, Hainan/2005.7	DQ673343	EU783956
绢蝶亚科 Parnassiinae	小红珠绢蝶 <i>Parnassius nomion</i>	山西五台山 Wutaishan, Shanxi/2006.8	EU783929	EU783955
粉蝶科 Pieridae				
粉蝶亚科 Pierinae	奥占斑粉蝶 <i>Delias agostina</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	EU783923	EU783939
粉蝶亚科 Pierinae	鹤顶粉蝶 <i>Hebomou glaucippe</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	EU783925	EU783943
粉蝶亚科 Pierinae	黑脉园粉蝶 <i>Cepora nerissa</i>	海南三亚 Sanya, Hainan/2005.7	EU783921	EU783936
蛱蝶科 Nymphalidae				
釉蛱蝶亚科 Heliconiinae	斐豹蛱蝶 <i>Argyreus hyperbius</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	DQ784692	EU783933
螯蛱蝶亚科 Charaxinae	二尾蛱蝶 <i>Polyura narcaea</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	DQ784717	EU783957
闪蛱蝶亚科 Apaturinae	傲白蛱蝶 <i>Helcyra superba</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	DQ784702	EU783944
线蛱蝶亚科 Limenitinae	戟眉线蛱蝶 <i>Limenitis homeyeri</i>	甘肃麻沿 Mayan, Gansu/2005.8	DQ784709	EU783948
丝蛱蝶亚科 Marpesiinae	电蛱蝶 <i>Dichorragia nesimachus</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	DQ784696	EU783941
苾蛱蝶亚科 Bybiinae	波蛱蝶 <i>Ariadne aradne</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	DQ784694	EU783934
斑蝶亚科 Danainae	幻紫斑蝶 <i>Euploea core</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	DQ784698	EU783942
斑蝶亚科 Danainae	绢斑蝶 <i>Parantica aglea</i>	海南文昌 Wenchang, Hainan/2005.7	DQ784712	EU783954
喙蝶亚科 Libytheinae	朴喙蝶 <i>Libythea celtis</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150349	EU783947
釉蛱蝶亚科 Heliconiinae	斑珍蝶 <i>Acraea violae</i>	海南文昌 Wenchang, Hainan/2005.7	EF150345	EU783932
闪蝶亚科 Morphinae	白袖箭环蝶 <i>Stichophthalma louisa</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150354	EU783959
眼蝶亚科 Satyrinae	暮眼蝶 <i>Melanitis leda</i>	广东海安 Haian, Guangdong/2005.7	EF150350	EU783949
眼蝶亚科 Satyrinae	翠袖锯眼蝶 <i>Elymnias hypermnestra</i>	海南三亚 Sanya, Hainan/2005.7	EU783924	EF597542
眼蝶亚科 Satyrinae	安徒生黛眼蝶 <i>Lethe andersoni</i>	云南景洪 Jinghong, Yunnan/2006.7	EU783928	EF597545
灰蝶科 Lycaenidae				
眼灰蝶亚科 Polyommatainae	雅灰蝶 <i>Jamides bochus</i>	云南景洪 Jinghong, Yunnan/2006.7	EU783927	EU783946
线灰蝶亚科 Theclinae	旖灰蝶 <i>Hypolycaena erylus</i>	海南三亚 Sanya, Hainan/2005.7	EU783926	EU783945
线灰蝶亚科 Theclinae	玳灰蝶 <i>Deudorix epijurbas</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150347	EU783940
银灰蝶亚科 Curetinae	银灰蝶 <i>Curetis bulis</i>	安徽黄山 Huangshan, Anhui/2005.8	EF150346	EU783938
蛱蝶科 Riodinidae				
红斑蛱蝶亚科 Hamearinae	梯翅褐蛱蝶 <i>Abisara saturata</i>	海南三亚 Sanya, Hainan/2005.7	EF150342	EU783930
斑蛾科 Zygaenidae				
	安琪斑蛾 <i>Zygaena angelicae</i>	德国 Germany	DQ833238	AJ844422
	横越斑蛾 <i>Zygaena transalpina</i>	意大利 Italy	DQ833198	AJ844443

分类体系依照 Wahlberg 等(2005)。Taxonomy following Wahlberg et al. (2005)。

系统分析采用了邻接法 (Neighbor-joining, NJ), 最大似然法 (Maximum-likelihood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian inference, BI)。使用 MEGA 软件, 基于 Kimura 两参数模型构建 NJ 树, 系统发育树采用 1 000 次内部分支检验来评估各自分支的置信度; 以 PAUP 软件构建 ML 树, 以 1 000 次的 bootstrap 重复抽样来检验系统树各分支的置信度; 用 MrBayes 软件构建贝叶斯树, lset 设置替代模型 nst = 6 (GTR 模型), 位点速率变异模型设置为 rates = gamma。同时建立 4 个马尔可夫链, 以随机树为起始树, 共运行 100 万代, 每 100 代抽样一次, 重复一次, 在舍弃老化样本后 (2 500 代), 根据剩余样本构建一致树, 并计算相关参数, 系统树各分支的置信度通过后验概率来检验。

2 结果与分析

2.1 碱基组成和序列变异

对 32 种蝶类的 ND1 和 16S rRNA 基因部分序列多重比对后, 共得到 869 个同源位点, 其中保守位点 373 个, 可变位点 496 个, 简约信息位点 375 个。A, T, C 和 G 碱基的平均含量分别为 37.6%, 42.6%, 7.8% 和 11.8%, 其中 A + T 平均含量为 80.2%, C + G 平均含量为 19.8%。显然, 碱基组成上存在偏倚。

基于 Kimura 两参数模型的遗传距离计算表明 (表 2), 在所研究的 32 种蝴蝶中, 种间距离从 0.017 (黑脉园粉蝶 *Cepora nerissa* 与奥古斑粉蝶 *Delias agostina*) 到 0.369 (碧凤蝶 *Papilio bianor* 与玳灰蝶 *Deudorix epijarbas*), 平均种间遗传距离为 0.185。外群和内群之间遗传距离最小的是安琪斑蛾 *Zygaena angelicae* 和暮眼蝶 *Melanitis leda*, 为 0.772; 遗传距离最大的是安琪斑蛾和碧凤蝶, 为 0.966。所有序列间的平均遗传距离为 0.260。

表 3 给出了蝶类不同科内及科间的平均遗传距离。其中弄蝶科和其他各科间的都较大; 凤蝶科与绢蝶科 (Parnassiidae) 间的为 0.17; 蛱蝶科 (Riodinidae) 和灰蝶科间的最小 (0.15); 眼蝶科 (Satyridae), 环蝶科 (Amathusiidae), 斑蝶科 (Danaiidae), 珍蝶科 (Acraeidae), 喙蝶科 (Libytheidae) 和蛱蝶科间的均较小。

本研究所涉 32 种蝴蝶联合基因碱基变异是颠换远多于转换, 转换/颠换 (Ts/Tv) 的平均值为

0.345 (表 2)。笔者以序列异歧度为横坐标, 以转换数和颠换数为纵坐标建立了散点图, 结果表明随着差异程度的增加, 颠换数呈线性增加, 而转换数已达到饱和。出现这种情况可能是由于某些位点发生多次替代, 使转换得以积累最终达到饱和, 也可能由于序列富含 A 和 T 从而使 Ts/Tv 值降低 (Desalle *et al.*, 1987)。

2.2 分子系统树

本研究以安琪斑蛾 *Zygaena angelicae* 和横越斑蛾 *Zygaena transalpina* 为外类群, 采用邻接法、最大似然法和贝叶斯法构建了 3 棵分子系统树: NJ 树、ML 树和贝叶斯树。系统树各分支的置信度以自引导值 (NJ 树和 ML 树) 和后验概率 (贝叶斯树) 来表示。置信度低于 50% 的值均没有显示。本研究的 3 棵分子系统树中, ML 树和贝叶斯树的拓扑结构基本相同, 所以只列出了 NJ 树和贝叶斯树。

两棵分子系统树的拓扑结构均支持: 蛱蝶科并非单系发生的类群; 珍蝶类、斑蝶类和喙蝶类位于蛱蝶科内; 蛱蝶类聚在灰蝶科内; 绢蝶类聚于凤蝶科中。

邻接法和贝叶斯法的分析结果也显示了不同之处。邻接法构建的 NJ 树如图 1 所示。该树的拓扑结构支持弄蝶科从蝶类中分离出来单独聚为一支系, 其他的各科聚为第二支系, 显示了弄蝶科和其他科的关系较远。第二支系以极高的置信度 (92%) 被分为 3 个小支系, 其中凤蝶科和绢蝶类聚为一支, 眼蝶类和蛱蝶科的螫蛱蝶亚科 (Charaxinae) 聚为一支, 环蝶类和粉蝶科聚为一支, 三支形成第一小支系 (置信度为 99%); 灰蝶科和蛱蝶科构成第二小支系; 在第三小支系中, 斑蝶类和蛱蝶科的丝蛱蝶亚科 (Marpesiinae) 以及喙蝶类聚为一支, 珍蝶类和蛱蝶科的釉蛱蝶亚科 (Heliconiinae)、线蛱蝶亚科 (Limenitinae)、闪蛱蝶亚科 (Apaturinae) 及苾蛱蝶亚科 (Bybiinae) 聚为一支。

贝叶斯树显示, 所有内群形成 5 个平行支系 (图 2)。其中, 珍蝶类、蛱蝶科部分亚科 (釉蛱蝶亚科、线蛱蝶亚科、闪蛱蝶亚科、苾蛱蝶亚科、丝蛱蝶亚科)、斑蝶类和喙蝶类构成第一支系; 凤蝶科、粉蝶科和环蝶类构成第二支系; 弄蝶科构成第三支系; 灰蝶科和蛱蝶科聚为第四支系; 眼蝶类和蛱蝶科的螫蛱蝶亚科聚在一起, 形成第五支系。

表 3 蝶类不同科内及科间的平均遗传距离 (分类系统参照周尧, 1998)

Table 3 Average genetic distance within and between families of butterflies in this study (classification following Chou, 1998)

科名 Family	科内 Within families			科间 Between families								
弄蝶科 Hesperidae	0.16											
凤蝶科 Papilionidae	0.17	0.19										
绢蝶科 Parnassiidae	-	0.18	0.17									
灰蝶科 Lycaenidae	0.15	0.19	0.19	0.16								
蛱蝶科 Riodinidae	-	0.19	0.19	0.21	0.15							
粉蝶科 Pieridae	0.10	0.19	0.17	0.15	0.18	0.16						
蛱蝶科 Nymphalidae	0.15	0.18	0.18	0.15	0.16	0.16	0.17					
眼蝶科 Satyridae	0.13	0.17	0.19	0.15	0.17	0.16	0.17	0.15				
环蝶科 Amathusiidae	-	0.17	0.17	0.18	0.17	0.18	0.13	0.15	0.15			
斑蝶科 Danaidae	0.11	0.18	0.19	0.16	0.16	0.17	0.16	0.15	0.15	0.16		
珍蝶科 Acraeidae	-	0.18	0.18	0.17	0.16	0.21	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	
喙蝶科 Libytheidae	-	0.17	0.17	0.15	0.15	0.18	0.14	0.14	0.14	0.15	0.13	0.15

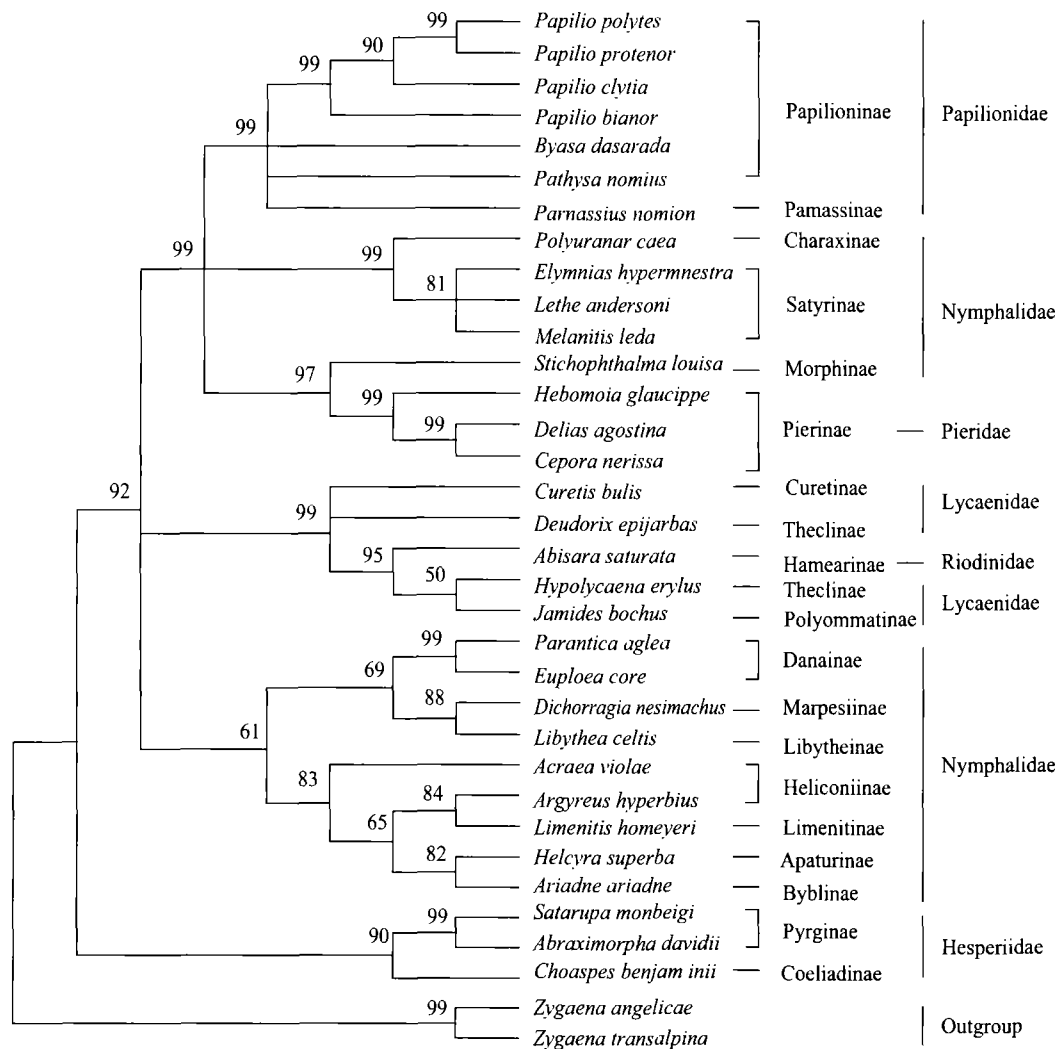


图 1 基于 ND1 和 16S rRNA 基因部分序列构建的 NJ 树

Fig. 1 The NJ tree based on partial mitochondrial ND1 and 16S rRNA gene sequence data

各分支上数字为 1 000 次内部分支检验置信度。Number on each branch corresponds to their bootstrap value for 1 000 replicates.

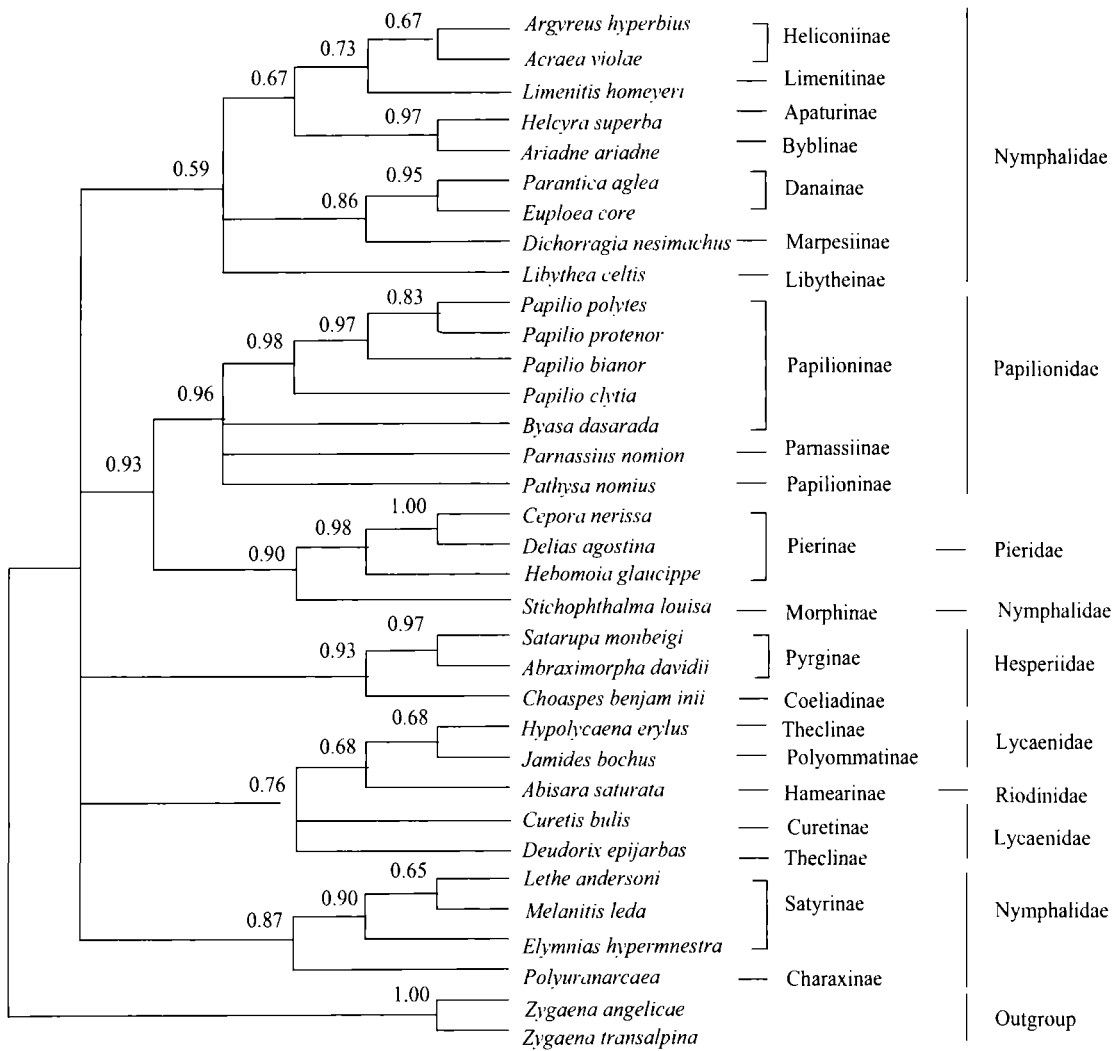


图 2 基于 ND1 和 16S rRNA 基因序列构建的贝叶斯树

Fig. 2 The Bayesian tree based on analysis of the mitochondrial ND1 and 16S rRNA gene sequence data

图中数字为后验概率。Number on each branch corresponds to its posterior probability value.

3 讨论

关于蝶类的系统分类，目前还没能取得完全统一，在国外普遍使用的是 Ackery (1999) 的分类系统，该系统把蝶类分为 2 总科(凤蝶总科和弄蝶总科)5 科(弄蝶科、凤蝶科、粉蝶科、蛱蝶科和灰蝶科)；国内普遍认同周尧(2000)的分类系统，该系统将中国蝶类分成 4 总科[弄蝶总科、凤蝶总科、蛱蝶总科(Nymphaloidea)和灰蝶总科(Lycaenoidea)]，下设 12 科。

3.1 蛱蝶科的系统发育关系

蛱蝶是蝶类中最大、最为复杂的一个类群(Hao et al., 2007)。尽管人们对蛱蝶已有一个多世纪的研究，但由于多数蛱蝶同源性状难以确定，缺乏可用于比较的同源性状，致使他们的形态鉴定和分类

产生了难题(Freitas and Brown, 2004)；另外，用于区别蛱蝶科和其他科特有的形态学衍生性状也较难找到(De Jong et al., 1996)；因而，该科的较高分类阶元的系统学研究长期以来一直存在很大争议，某些类群的分类地位在不同的分类体系中经常发生变化。目前，蛱蝶科的分类在国内外有所不同：在 Ackery 等(1999)的 13 亚科分类体系中，眼蝶类、斑蝶类、喙蝶类作为亚科级分类单元，珍蝶类和环蝶类则作为族级分类单元；而周尧(2000)的分类体系中，眼蝶类、斑蝶类、喙蝶类、珍蝶类和环蝶类都被提升为科级分类阶元，与蛱蝶科并列入蛱蝶总科。

Wahlberg 等(2005)利用 COI 和 EF-1 α 基因构建的系统树显示蛱蝶科为单系发生，但采用 Wingless 基因构建的系统树表明蛱蝶科为非单系群。本研究的分子系统树均显示蛱蝶科为非单系发生。蛱蝶科的单系性与否仍有待于进一步商榷。

Brower(2000)和Wahlberg等(2003, 2005)以及Freitas和Brown(2004)的研究均显示,眼蝶类形成的分支在蛱蝶科的内部,和螯蛱蝶亚科(Charaxinae)、闪蝶亚科(Morphidae)、绢蛱蝶亚科(Calinaginae)的亲缘关系较近。在本研究的两棵分子系统树中,眼蝶类和螯蛱蝶亚科的二尾蛱蝶均聚为一支,且置信度较高(后验概率为0.87,自引导值为99%),暗示眼蝶类和蛱蝶科部分类群的清晰界定还存在问题;但这一支并未聚在蛱蝶科分支的内部,显示国内将眼蝶类提升为科级分类阶元确实有其合理性。

至于珍蝶类,Hao等(2007)基于16S序列的二级结构研究指出,珍蝶类和蛱蝶类的二级结构有一定程度的相似性;本实验室基于蝶类触角扫描电镜观察的研究也得出珍蝶类和蛱蝶类有较近的亲缘关系的结论(郝家胜等,2007);我们的研究结果同样证实了珍蝶类和蛱蝶类较近的亲缘关系。然而,迄今珍蝶类的系统位置在国内外还存在较大分歧。国外将珍蝶类作为一个族置于蛱蝶科的釉蛱蝶亚科(Heliconiinae)内;国内则将其从蛱蝶科分离出来,独立成科。许多学者基于分子方面的研究结果显示,同属于釉蛱蝶亚科的珍蝶、豹蛱蝶和釉蛱蝶类在系统树中的位置确实较近,但多数研究都表明珍蝶类与其他同一亚科的蝶类为并系发生(Brower, 2000; Freitas and Brown, 2004)。因而,国外将珍蝶类作为釉蛱蝶亚科的一个族的定位不太合适,至少应给予亚科级分类地位。本研究的两棵分子系统树均显示珍蝶类聚在蛱蝶科。另外,本研究就蝶类不同科内及科间的平均遗传距离进行了比较,结果珍蝶类和蛱蝶类的平均遗传距离为0.15,这与蛱蝶类群内代表种间的平均遗传距离相等,给予珍蝶类科级分类阶元可能也不太妥当。因此,综合上述的研究成果,笔者认为将珍蝶类作为亚科级处理更为合适。

喙蝶类与蛱蝶类在形态学上比较接近,故有些学者将两科合并为Erycinidae(周尧,1998)。周尧(1999)将喙蝶类放在灰蝶总科,而周尧(2000)又将喙蝶类移入蛱蝶总科。郝家胜等(2007)通过扫描电镜对中国蝶类的触角以及分布于其上面的3种感觉器(星形感器、鳞形感器和毛形感器)进行了扫描电镜观察和比较,结果发现喙蝶类的星形感器和毛形感器与斑蝶类、蛱蝶类和眼蝶类相似。Hao等(2007)基于16S序列的二级结构研究结果显示:喙蝶类与蛱蝶类的二级结构有明显差异(后者无IV亚

区,二者在II、III、V亚区以及多分支环的大小上差别也很大);然而,喙蝶类与蛱蝶类的二级结构却极其相似。国外的许多学者也对喙蝶类的系统学位置进行了研究,结果显示喙蝶类和蛱蝶类在系统树中先聚类(Yagi *et al.*, 1999; Wahlberg *et al.*, 2005)。本研究基于ND1和16S rRNA基因序列的研究结果显示喙蝶类、斑蝶类均聚于蛱蝶科,表明两者作为蛱蝶科的亚科更为合理。

环蝶类的归宿问题至今仍未悬而未决,国外将环蝶类作为闪蝶亚科的一个族(Ackery *et al.*, 1999),国内则将其提升为科级分类阶元(周尧,2000)。从成虫形态学和行为特征上看,环蝶类和眼蝶类更近似(周尧,1998, 1999, 2000);分子系统学研究的结果也证实两者有较近的亲缘关系(Wahlberg *et al.*, 2003, 2005; Peña *et al.*, 2006),但同属于闪蝶亚科的环蝶类与其他蝶类并不在同一个亚分支内(Brower, 2000; Wahlberg *et al.*, 2003)。因而,环蝶类仅作为一个族级分类阶元而存在于闪蝶亚科中可能是不合适的,至少应给予亚科级分类阶元(Hao *et al.*, 2007)。本研究结果显示环蝶类和粉蝶类有较近的亲缘关系,这与国内外的其他研究结果有较大的分歧。本研究未能很好地解决环蝶类的系统位置。环蝶类的归宿问题仍有待于进一步探讨。

3.2 凤蝶科和绢蝶类、粉蝶类的系统发育关系

目前,绢蝶类的系统位置还存在着分歧:李传隆和朱云宝(1992)将绢蝶类作为科级阶元处理;周尧(1999)也将绢蝶类作为科级分类阶元和凤蝶科并列;武春生(2001)将绢蝶类下设为凤蝶科的一个亚科,和凤蝶亚科(Papilioninae)、锯凤蝶亚科(Zerynthiinae)并列;欧美专家则倾向于绢蝶类为亚科级(Munroe, 1961; Igarashi, 1979; Hancock, 1983)。丁亮等(2007)基于绢蝶类的幼虫、翅脉及后翅尾突、翅背面纹路、雌性交配栓和雄性外生殖器的形态特征对绢蝶类进行了研究,结果表明绢蝶类和锯凤蝶类更加近似,并指出绢蝶类很难独立于凤蝶科而独自形成科级分类阶元,作为亚科处理应为最佳。本研究的分子系统树均显示绢蝶类聚于凤蝶科,且置信度较高(贝叶斯树为0.96, NJ树为99),同样支持绢蝶类和凤蝶类有密切的亲缘关系。另外,从寄主植物来看,凤蝶类的锯凤蝶幼虫取食马兜铃科(Aristolochiaceae)植物,而部分绢蝶类种类如冰清绢蝶 *Parnassius glacialis*、白绢蝶 *P. stubbendorfii*等的寄主是从马兜铃科转到荷包牡丹科(Fumariaceae)的(丁亮等,2007)。基于以上

证据, 笔者倾向于将绢蝶类作为凤蝶科的亚科。

关于粉蝶类的系统位置, 国内外的学者也存在着争议: Ehrlich (1958) 和 Scott (1985) 的研究结果显示粉蝶类与由凤蝶类和绢蝶类构成的一支是姐妹群; Weller 等 (1996) 和 Ackery 等 (1999) 的研究表明粉蝶类与由蛱蝶类、灰蝶类和蚬蝶类三者构成的一支聚类, 形成姐妹群; Yagi 等 (1999) 和 Wahlberg 等 (2003) 的分子系统学研究均显示, 粉蝶类先与蛱蝶总科和灰蝶总科的类群聚合, 再与凤蝶类聚合; Hao 等 (2007) 的研究结果显示, 无论是基于 16S 序列一级结构的比较, 还是在二级结构比较中, 粉蝶类与绢蝶类和凤蝶类都很接近。本研究结果显示粉蝶类先与蛱蝶总科的环蝶类聚类, 再与绢蝶类和凤蝶类聚合。从形态学上来看, 粉蝶类和凤蝶类都具有雌雄蝶前足发达, 两触角基部接近, 端部加粗; 中室外脉纹有分叉等特征 (周尧, 1999)。因而, 结合形态学上的证据, 本研究认为粉蝶类和凤蝶类可能具有共同祖先。

3.3 灰蝶类和蚬蝶科的系统发育关系

蚬蝶类和灰蝶类在形态上很相似, 因而, 传统的分类将蚬蝶类置于灰蝶科中。De Jong 等 (1996) 的研究结果表明蚬蝶类聚于灰蝶科中; 但 Campbell 等 (2000) 和 Wahlberg 等 (2005) 的研究结果显示两者形成平行演化支, 并推测蚬蝶类和灰蝶类为姐妹群。国内有的学者也将蚬蝶类从灰蝶科分出, 作为科级阶元处理。本研究的分子系统树均显示蚬蝶类聚在灰蝶科内部, 表 3 给出的数据也显示蚬蝶类和灰蝶类的平均遗传距离最小 (0.15), 和灰蝶类群内代表种间的平均遗传距离相等。笔者倾向于传统的分类, 将蚬蝶类放在灰蝶科作为亚科处理。

3.4 弄蝶科的系统发育

传统分类单独将弄蝶类归入弄蝶总科, 其他蝶类归入凤蝶总科, 并认为弄蝶总科和凤蝶总科是姐妹群 (Wahlberg *et al.*, 2005)。国内主要基于形态学上的特征也将弄蝶类单独放在弄蝶总科。Wahlberg 等 (2005) 利用 COI、EF-1 α 和 Wingless3 个基因并结合形态学方面的数据较为全面地探讨了整个蝶类的系统发育关系, 结果显示, 弄蝶科构成系统树基部的一个独立支系, 各科间的系统学关系为 (弄蝶科 + (凤蝶科 + (粉蝶科 + (蛱蝶科 + (蚬蝶科 + 灰蝶科))))))。Hao 等 (2007) 的研究结果表明弄蝶类和其他蝶类有明显不同 (弄蝶科代表种白弄蝶的高变区二级结构唯一缺少 V 亚区)。本研究的两棵分子树没能取得一致的结果, NJ 树显示弄蝶类单独形

成一支系, 其他蝶类则聚在一起形成另一支系; 而贝叶斯树显示弄蝶类与其他蝶类形成平行演化支。有些学者指出与蛾类相似的喜蛾科 (Hedylidae) 与凤蝶总科的亲缘关系可能比弄蝶总科更近 (Scoble, 1986, 1992)。这也暗示了弄蝶类和其他蝶类有较远的亲缘关系。基于以上众多证据, 笔者倾向于 NJ 树显示的结果, 支持弄蝶类作为有别于其他蝶类, 独立进化的一个支系, 并支持给予其总科级分类地位。

综上所述, 到目前为止国内对蝶类高级类群间的研究主要基于形态学特征, 利用分子数据的研究还相当匮乏。本研究通过分子数据对中国蝶类高级分类群间的系统发育关系和各类群的分类地位进行了初步的探讨, 为以后的进一步研究提供部分参考。

致谢 中国科学院动物研究所武春生研究员提供了两种蛾类的译名, 丁亮助理工程师提出了部分修改建议, 在此深表感谢!

参考文献 (References)

- Ackery PR, De Jong R, Vane-Wright RI, 1999. The butterflies: Hedyloidea, Hesperoidea and Papilionoidea. In: Kristensen NP ed. *Lepidoptera: Moths and Butterflies. 1. Evolution, Systematics and Biogeography. Handbook of Zoology. Vol. IV. Walter de Gruyter, Berlin. Part 35.*
- Brower AVZ, Egan MG, 1997. Cladistic analysis of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiini): a revised phylogenetic position for Eueides based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 264: 969–977.
- Brower AVZ, 2000. Phylogenetic relationships among the Nymphalidae (Lepidoptera) inferred from partial sequences of the wingless gene. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 1 201–1 211.
- Campbell DL, Brower AVZ, Pierce NE, 2000. Molecular evolution of the wingless gene and its implications for the phylogenetic placement of the butterfly family Riodinidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Mol. Biol. Evol.*, 17: 684–696.
- Caterino MS, Reed RD, Kuo MM, Sperling FAH, 2001. A partitioned likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). *Syst. Biol.*, 50: 106–127.
- Chapco W, Kuperus WR, Litzberger G, 1992. Molecular phylogeny of melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae): the genus *Melanoplus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 92 (5): 617–623.
- Cheng XY, Zhou HZ, Zhang GX, 2000. Perspective of molecular biological techniques applied in insect systematics. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 25 (2): 121–133. [成新跃, 周红章, 张广学, 2000. 分子生物学技术在昆虫系统学研究中的应用. 动物分类学报, 25 (2): 121–133]

- Chou I, 1998. Classification and Identification of Chinese Butterflies. Henan Science and Technology Publishing House, Zhengzhou. [周尧, 1998. 中国蝴蝶分类与鉴定. 郑州: 河南科学技术出版社]
- Chou I, 1999. Atlas of Chinese Butterflies. Henan Science and Technology Publishing House, Zhengzhou. [周尧, 1999. 中国蝴蝶原色图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社]
- Chou I, 2000. Monographia Rhaopalocerorum Sinensium (Revised Edition). Henan Science and Technology Publishing House, Zhengzhou. [周尧, 2000. 中国蝶类志 (修订版). 郑州: 河南科学技术出版社]
- De Jong R, Vane-Wright RI, Ackery PR, 1996. The higher classification of butterflies (Lepidoptera): Problems and prospects. *Entomol. Scand.*, 27: 65–101.
- DeSalle R, Freedman T, Prager EM, 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 26: 157–164.
- Ding L, Zhang YZ, Zhu CD, 2007. Preliminary study on taxonomy and phylogeny of Zerynthiini and Parnassiini (Lepidoptera, Papilionidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 32 (2): 355–362. [丁亮, 张彦周, 朱朝东, 2007. 锯凤蝶类和绢蝶类(鳞翅目, 凤蝶科)分类地位及系谱关系初探. 动物分类学报, 32 (2): 355–362]
- Ehrlich PR, 1958. The comparative morphology, phylogeny and higher classification of the butterflies. *Kansas. Univ. Sci. Bull.*, 39: 305–370.
- Freitas AVL, Brown JR, 2004. Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Syst. Biol.*, 53 (3): 363–383.
- Hancock DL, 1983. Classification of the Papilionidae (Lepidoptera): a phylogenetic approach. *Smithersia*, 2: 1–48.
- Hao JS, Su CY, Zhu GP, Chen N, Wu DX, Pan HC, Zhang XP, 2007. Mitochondrial 16S rRNA molecular morphology of the main butterflies' lineages and its phylogenetic significance. *J. Genet. Mol. Biol.*, 18 (2): 111–123.
- Hao JS, Yin XB, Su CY, Huang DY, Xu L, 2007. SEM structures of the antennae from 12 families of Chinese butterflies and their phylogenetic implications. *Journal of Anhui Normal University (Natural Science)*, 30 (3): 354–360. [郝家胜, 殷先兵, 苏成勇, 黄敦元, 许丽, 2007. 12 科国产蝶类代表种类触角的扫描电镜观察及其系统学意义. 安徽师范大学学报(自然科学版), 30 (3): 354–360]
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny trees. *Bioinformatics*, 17 (8): 754–755.
- Igarashi S, 1979. Papilionidae and Their Early Stages. Kodansha, Tokyo. 30 (1–2): 69–72. (in Japanese)
- Kons HLJ, 2000. Phylogenetic Studies of the Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae) and a Revision of the Genus *Chlosyne* Butler. Ph. D. Dissertation, University of Florida, Gainesville.
- Kristensen NP, 1976. Remarks on the family-level phylogeny of butterflies (Insecta: Lepidoptera, Rhopalocera). *Zeit. Zool. Syst. Evol. Forsch.*, 14: 25–33.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163.
- Li CL, Zhu BY, 1992. Atlas of Chinese Butterflies. Shanghai Far East Publishers, Shanghai. [李传隆, 朱宝云, 1992. 中国蝶类图谱. 上海: 上海远东出版社]
- Martin JA, Pashley DP, 1992. Molecular systematic analysis of butterfly family and some subfamily relationships (Lepidoptera: Papilionoidea). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 85 (2): 127–139.
- Munroe E, 1961. The classification of the Papilionidae (Lepidoptera). *Can. Entomol. (Suppl.)*, 17: 1–51.
- Peña C, Wahlberg N, Weingartner E, 2006. Higher level phylogeny of Satyrinae butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 29–49.
- Robbins RK, 1988. Comparative morphology of the butterfly foreleg coxa and trochanter (Lepidoptera) and its systematic implications. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 90: 133–154.
- Scoble MJ, 1986. The structure and affinities of the Hedyloidea: A new concept of butterflies. *Bull. Br. Museum (Nat. Hist.) (Entomol.)*, 53: 251–286.
- Scoble MJ, 1992. The Lepidoptera: Form, Function and Diversity. Oxford University Press, New York.
- Scott JA, 1985. The phylogeny of butterflies (Papilionoidea and Hesperoidea). *J. Res. Lepid.*, 23: 241–281.
- Shou JX, Chou I, Li YF, 2006. Systematic Butterfly Names of the World. Shaanxi Science and Technology Publishing House, Shaanxi. [寿建新, 周尧, 李宇飞, 2006. 世界蝴蝶分类名录. 陕西: 陕西科学技术出版社]
- 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.
- Swofford DL, 2002. PAUP* 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), Beta Version. Sinauer Associates, Sunderland.
- Yagi T, Sasaki G, Takebe H, 1999. Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. *J. Mol. Evol.*, 48: 42–48.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 24: 4 876–4 882.
- Vane-Wright RI, 2003. Evidence and identity in butterfly systematics. In: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR eds. *Butterflies: Evolution and Ecology Taking Flight*. University of Chicago Press, Chicago. 477–514.
- Wahlberg N, Braby MF, Brower AVZ, De Jong R, Lee MM, Nylin S, Pierce NE, Sperling FAH, Vila R, Warren AD, Zaslavov E, 2005. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 272: 1 577–1 586.
- Wahlberg N, Weingartner E, Nylin S, 2003. Towards a better

- understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 473 – 487.
- Wahlberg N, Zimmermann M, 2000. Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mtDNA sequences. *Cladistics*, 16: 347 – 363.
- Weller SJ, Pashley DP, Martin JA, 1996. Reassessment of butterfly family relationships using independent genes and morphology. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 89: 184 – 192.
- Wu CS, 2001. *Fauna Sinica, Insecta. Vol. 25.* Science Press, Beijing.
- [武春生, 2001. 中国动物志, 昆虫纲. 第 25 卷. 北京: 科学出版社]
- Xia X, Xie Z, 2001. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.*, 92: 371 – 373.
- Zhang YP, Shi LM, 1992. Mitochondrial DNA polymorphisms in animals: a review. *Zool. Res.*, 13 (3): 289 – 298. [张亚平, 施立明, 1992. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究, 13 (3): 289 – 298]

(责任编辑: 袁德成)