研究论文

# 基于线粒体 COⅠ和 Cytb 基因序列研究粉蝶科七属间的系统发生关系*

乔 枫 陈振宁** 陈 志** 谢惠春 尚 军 柯 君

（青藏高原资源与环境教育部重点实验室 青海师范大学 西宁 810008）

**摘 要** **【目的】** 为了探讨粉蝶科 Pieridae 7 属的系统进化关系。**【方法】** 基于线粒体 COⅠ（609 bp）和 Cytb（393 bp） 基因部分序列，以眼蝶科的 2 个物种为外类群，运用 UPGMA 和 ME 法重建分子系统树。**【结果】** 联合基因构建的分子系统树显示：外群牧女珍眼蝶 *Coenonympha amaryllis*（Cramer）和阿芬眼蝶 *Aphantopus hyperantu*（Linnaeus）构成一独立支系，可以作为外群；云粉蝶属和粉蝶属姊妹关系构成一分支，亲缘关系较近；襟粉蝶属与钩粉蝶属形成姐妹关系，亲缘关系较近。**【结论】** 成功重建了粉蝶科 7 属的系统进化关系。

**关键词** 粉蝶科，COⅠ基因，Cytb 基因，系统发生

# Phylogenetic relationships among seven Pieridae genera based on partial sequences of the COⅠ and Cytb genes

QIAO Feng CHEN Zhen-Ning** CHEN Zhi** XIE Hui-Chun SHANG Jun KE-Jun

(Educational Key Lab of Environment and Resource in Qinghai-Tibet Platean, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

**Abstract** **[Objectives]** The phylogenetic relationships among 7 genera of butterflies in the Pieridae were investigated. **[Methods]** Based on partial sequences of the COⅠ ( 609 bp) and Cytb ( 393 bp) genes, and with 2 species of Satyrinae as the outgroup, phylogenetic relationships were analyzed and reconstructed with the UPGMA and ME methods. **[Results]** The molecular phylogenetic trees showed that *Coenonympha amaryllis* and *Aphantopus hyperantu* were an outgroup; *Pieris*, *Pontia*, *Anthocharis*, *Gonepteryx*, *Aporis*,*Colias* were, a group; *Pontia* and *Pieris* were a sister-group, *Aporia* and *Mesapia* were a group with a close relationship, *Gonepteryx* and *Anthocharis* were a sister-group.

**Key words** Pieridae, COⅠ gene, Cytb gene, phylogenetic relationships

粉蝶科 Pieridae 有 1 200 多种，广泛分布(Ackery *et al*., 1999; Vane and Wright, 2003），中国已知 154 种（武春生，2010）。粉蝶科体型通常为中型或小型，色彩较素淡，一般为白、黄和橙色，并常有黑色或红色斑纹。前翅三角形，后翅卵圆形，无尾突。前足发育正常，有两分叉的两爪（周尧，1994，1998）。寄主为十字花科、豆科、蔷薇科等，有的为蔬菜或果树害虫，最常见如菜粉蝶 *Pieris rapae* 和豆粉蝶 *Colias hyale*（Braby *et al*., 2006）。Klots（1929，1933）在前人的基础上将粉蝶科分为 3 个亚科；Ehrlich（1958） 基于更多的形态学特征将粉蝶科分为 4 个亚科。Braby 等（2006）认为钩粉蝶属与方粉蝶属构成姐妹群，不过其自举检验值较低（< 50%），而与豆粉蝶属亲缘关系远些；绢蝶属与云粉蝶属、粉蝶属、豆粉蝶属、钩粉蝶属、襟粉

* 资助项目：国家科技支撑计划课题（2012BAC08B04）

**通讯作者，E-mail: qhczn@126.com; czi58@163.com

收稿日期：2012-11-15，接受日期：2013-11-18

蝶属的亲缘关系较远，这些有待于进一步验证。许丽等（2007）研究结果显示钩粉蝶属与黄粉蝶属聚为一分支（自展值为 51%），迁粉蝶属和豆粉蝶属以较高的后验概率形成姐妹群（自展值为 92%），绢蝶属与（云粉蝶属+粉蝶属）呈平行衍化支。因此，粉蝶科中有些属的分类和系统发生关系仍存在一些争议，相关的系统学资料还很匮乏，尤其是基于分子证据探讨其有关类群间系统发生关系，如有关妹粉蝶属的研究较少，这些有待于进一步研究。

动物体内的线粒体基因组中一般不含间隔区和内含子，是唯一的核外遗传信息载体，结构简单，无重复序列，严格遵守母系遗传，几乎不发生倒位、易位等畸变与重组，并已广泛应用于多种动物类群的系统进化研究。有关利用线粒体基因研究蝶类的系统发育，有许多报道，如：张敏等（2007）和吴冬霞等（2007） 运用 Cytb 基因分别对迷蛱蝶属、线蛱蝶亚科的相关物种的分子系统发生进行了研究。苏成勇等（2007） 以及陈娜等（2007） 运用 16S rRNA 基因分别就凤蝶亚科、蛱蝶科主要类群的分子系统发生进行分析。王戎疆等（2004）利用线粒体 COⅡ基因序列分析法，研究了我国尾蛱蝶属 5 种蝴蝶的系统分化。在线粒体 DNA 中，Cytb 基因进化速度适中，适合研究种内到种间甚至科间的系统发育关系(许丽等，2007）；COⅠ基因进化速度快，较其它的线粒体基因保守(Simon *et al.*，1994；张媛等，2011；黄丽莉等，2012），能有效地解决鳞翅类分子系统中的一些争议(Zhu *et al*，2006；吴冬霞等，2007；张敏等，2007；杨倩倩等，2012；李蓓等，2013；张明和张东，2013）。本研究扩增并测定了粉蝶科 7 属 17 种的 COⅠ和 Cytb 基因，以眼蝶科的外群牧女珍眼蝶 *Coenonympha amaryllis* (Cramer）和阿芬眼蝶 *Aphantopus hyperantu* (Linnaeus)的 COⅠ和 Cytb 基因部分序列作为外群，结合许丽等（2007）研究序列，构建了分子系统树，初步探讨了粉蝶科 7 属蝶类之间的系统发生关系。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

本实验所用蝴蝶干标本均由作者采集，常温保存、常规方法干制而成；新鲜样品采集后立即放入无水酒精中固定，带回实验室后放入－20℃冰箱保存。供试材料种类、登录号、采集日期和地点见表 1。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂和仪器** 试剂主要有：dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Ladder Marker 等，这些试剂均购自于 Fermentas 公司；引物合成、PCR 凝胶产物回收试剂盒、测序由北京三博远志生物技术公司提供。所需仪器主要包括：离心机（Eppendorf 公司，centrifuge 5804R），PCR 扩增仪（BIO-RAD 公司，S1000$^{TM}$ Thermal Cycler）、电泳仪（北京六一仪器厂 DYY-12C 型）、紫外透射反射仪（上海精科实业有限公司 WFH-201B）、紫外分光光度计（GE 公司 GeneQuant100）、Molecular lmager（BIO-RAD 公司 Gel Doc$^{TM}$ XR）等。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取与纯化** 取鲜样品的胸部肌肉、干标本的足，提取总 DNA。提取方法参照 Zmmerman 等（2000） 的方法，取下干标本的足用无菌双蒸水浸泡 48 h 以上，弃双蒸水；取下鲜样品的胸部肌肉；二者同时加入提取缓冲液（5 mmol/L Tris-HCl，25 mmol/L NaCl pH 8.0，25 mmol/L EDTA, 0.1% SDS），剪碎材料。加入 20 μL 的 20 mg /mL 蛋白酶 K，混匀，58℃消化过夜。经酚和氯仿纯化后，加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，DNA 沉淀经 70%乙醇清洗，空气干燥后，溶于 30 μL TE，－20℃ 保存备用。

**1.2.3 目的基因片段的扩增与序列测序** PCR 使用扩增昆虫 COⅠ 基因部分的一对通用引物（张大秀等，2009），CO IF：5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3′，CO IR：5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3′。扩增昆虫 Cytb 基因部分的一对通用引物（David *et al.*，2008），CytbF：5′- TGA GGA CAA ATA

TCA TTT TGA GGW-3′，CytbR：5′-ACT GGT CGA GCT CCA ATT CAT GT -3′。PCR 反应体系的总体积为 50 μL，其中包括 10~30 ng 的模板 DNA，10 x PCR Buffer 5.0 μL，25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 3.0 μL, 0.5 μL 25 mmol/L 的 dNTP，1.0 μL 10 μmol/L 的引物，1 U *Taq* 酶，双蒸水补足至 50 μL。扩增 CO Ⅰ 和 Cytb 基因片段反应程序为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 1 min，48 ℃ 退火 1 min，72 ℃ 延伸 1 min 30 s，循环次数为 35 次；最后 72 ℃ 总延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，经凝胶纯化试剂盒纯化, 基因片段由北京三博远志生物技术公司测序。

### 1.3　DNA 序列的数据处理

将测定的序列在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较，确认无误后通过 Clustal X 1．8 软件 (Thompson *et al.*，1997) 对基因序列进行多重序列比对，并辅以人工校对。本研究测定了 19 个物种（包括外群）的 CO Ⅰ 和 Cytb 基因部分序列，所有序列已公布在 GanBank，登录号见表 2。采用 Clustal X 1.8 软件 (Thompson *et al.*, 1997) 对本研究所测得的序列和下载序列进行比对。采用 MEGA 4.1 软件(Kumar *et al.*, 2004) 分析各基因序列的碱基组成、转换与颠换比、遗传距离。MEGA 4.1（Kumar *et al.*, 2004）分别分析 CO Ⅰ 和 Cytb 基因序列片段以及合并后基因序列片段的变异位点、简约信息位点、转换与颠换比值、遗传距离及各碱基的平均含量。依据 Kimura 2-parameter 采用 MEGA 4.1 软件构建 CO Ⅰ 基因和 Cytb 基因合并序列的 UPGMA 和 ME 树，1 000 次自举检测 (Felsenstein, 1985) 估计系统树中各结点的置信值，并且依据 Kimura 2-parameter 模型推测遗传距离。

## 2　结果与分析

### 2.1　序列组成和变异

本文分析的 DNA 序列全部存入 GenBank 中，登录号见表 1。CO Ⅰ 基因片段经 Clustal X1.8 软件比对后共有 609 bp，除外群以外，其中保守位点 389 个，可变位点 220 个，简约信息位点 184 个，A、T、G、C 碱基的平均含量为 30.6 %、38.2 %、14.2 %、17.1 %，转换/颠换的比例为 R=1.066。A+T 平均含量为 58.8%，C+G 平均含量为 31.3%。

Cytb 基因片段经 Clustal X1.8 软件比对后共有 393 bp，除外群以外，其中保守位点 83 个，可变位点 299 个，简约信息位点 150 个，A、T、G、C 碱基的平均含量为 32.4 %、41.0 %、9.3 %、17.4 %，转换/颠换的比值 R=1.178，A+T 平均含量为 73.4%，C+ G 平均含量为 26.7%。

CO Ⅰ 和 Cytb 基因联合后，除外群外，其中保守位点 584 个，可变位点 407 个，简约信息位点 326 个；A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 31.3%、39.4%、12.1%、19.1%，转换/颠换的比值为 R=1.434，整合数据集的转换/颠换(R) = 1.434 < 2，表明碱基替代已达饱和。A+T 平均含量较高，为 70.7%，表现出明显的 A+T 偏倚。这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性。

### 2.2　遗传距离特征

基于 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离显示各种之间遗传距离介于 0.001～0.213 之间（表 2），平均遗传距离为 0.147；外类群和内类群的最小遗传距离是牧女珍眼蝶 *Coenonympha amaryllis* 与斑缘豆粉蝶 *Colias erate-1*（或黎明豆粉蝶 *Colias erate-2*）之间（0.148），最大遗传距离是阿芬眼蝶 *Aphantopus hyperantu* 和暗脉菜粉蝶 *Pieris napi* 之间（0.213）；在内群中, 属内种间的遗传距离最小是云粉蝶 *Pontia daplidice-3* 与箭纹云粉蝶 *Pontia callidice-2* 之间 （0.001），最大遗传距离是菜粉蝶 *Pieris rapae-2*（或菜粉蝶 *Pieris rapae-1*）与欧洲粉蝶 *Pieris brassicae* 之间（0.126）；属间的最小遗传距离是灵奇尖粉蝶 *Appias lyncida* 与菜粉蝶 *Pieris rapae-3*（或大展粉蝶 *Pieris extensa*）之间（0.103），最大遗传距离是橙黄豆粉蝶 *Colias fieldi* 与暗脉菜粉蝶 *Pieris napi* 之间（0.201）。

表 1　样品及来源

**Table 1　The sources of samples and DNA data**

| 科名 Family | 种名 Species | 采集地点 Sampling locality | 采集时间 Collection date | GenBank 登录号 GenBank accession No. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | CO I | Cytb |
| 粉蝶科 | 橙黄豆粉蝶 *Colias fieldii-1* (Menetries) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ996393 | JQ924451 |
| Pieridae | 橙黄豆粉蝶 *Colias fieldii-2* (Menetries) | 青海，湟中 Qinghai，Huangzhong | 2011.07 | JQ922057 | JQ924429 |
| | 山豆粉蝶 *Colias montium* (Oberthür) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu (Dry specimens) | 1995.07 | JQ922065 | JQ924444 |
| | 斑缘豆粉蝶 *Colias erate* (Esper) | 青海，民和 Qinghai，Minhe (Dry specimens) | 2005.08 | JQ922063 | JQ924441 |
| | 小檗绢粉蝶 *Aporia hippia* (Bremer) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu (Dry specimens) | 2007.07 | JQ922053 | JQ924421 |
| | 妹粉蝶 *Mesapia peloria* (Hewitson) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922062 | JQ924437 |
| | 云粉蝶 *Pontia daplidice-1* (Linnaeus) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922054 | JQ996400 |
| | 云粉蝶 *Pontia daplidice-2* (Linnaeus) | 青海，民和 Qinghai，Minhe (Dry specimens) | 2005.08 | JQ996396 | JQ996402 |
| | 箭纹云粉蝶 *Pontia callidice* (Hübner) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922056 | JQ924427 |
| | 绿云粉蝶 *Pontia chloridice* (Hübner) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922059 | JQ924432 |
| | 菜粉蝶 *Pieris rapae-2* (Linnaeus) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922055 | JQ924424 |
| | 菜粉蝶 *Pieris rapae-1* (Linnaeus) | 青海，民和 Qinghai，Minhe (Dry specimens) | 2005.08 | JQ996397 | JQ924443 |
| | 大卫粉蝶 *Pieris davidis* (Oberthür) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922060 | JQ924433 |
| | 黑纹粉蝶 *Pieris melete* (Oberthür) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922061 | JQ924435 |
| | 皮氏尖襟粉蝶 *Anthocharis bieti* (Oberthür) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922058 | JQ924431 |
| | 红襟粉蝶 *Anthocharis cardamines* (Linnaeus) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ996390 | JQ924422 |
| | 钩粉蝶 *Gonepteryx rhamni-1* (Linnaeus) | 青海，民和 Qinghai，Minhe (Dry specimens) | 2005.08 | JQ922064 | JQ924442 |
| | 钩粉蝶 *Gonepteryx rhamni-2* (Linnaeus) | 安徽，黄山 Anhui，Huangshan | 2005.08 | EF584865* | EF584888* |
| | 圆翅钩粉蝶 *Gonepteryx amintha* (Blanchard) | 云南，景洪 Yunnan，Jinghong | 2005.08 | EF584864* | EF584887* |
| | 青粉蝶 *Pareronia anais* (Cramer) | 海南，三亚 Hainan，Sanya | 2005.08 | EF584868 * | EF584891 * |
| | 鹤顶粉蝶 *Hebomoia glaucippe* (Linnaeus) | 云南，景洪 Yunnan，Jinghong | 2006.08 | EF584866* | EF584889* |
| | 橙黄豆粉蝶 *Colias fieldi* (Menetries) | 云南，丽江 Yunnan，Lijiang | 2005.08 | EF584859* | EF584882* |

续表 1（**Table 1 continued**）

| 科名 Family | 种名 Species | 采集地点 Sampling locality | 采集时间 Collection date | GenBank 登录号 GenBank accession No. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | CO I | Cytb |
| | 黎明豆粉蝶 *Colias erate-2* (Esper) | 云南，大理 Yunnan，Dali | 2005.08 | EF584858* | EF584881* |
| | 暗色绢粉蝶 *Aporia bieti* (Linnaeus) | 云南，丽江 Yunnan，Lijiang | 2005.08 | EF584850* | EF584873* |
| | 酪色绢粉蝶 *Aporia potanini* (Alphéraky) | 黑龙江，齐齐哈尔，Heilongjiang，Qiqihaer | 2006.07 | EF584852* | EF584875* |
| | 灰姑娘绢粉蝶 *Aporia intercostata* (Oberthür) | 安徽，黄山 Anhui，Huangshan | 2006.07 | EF584851* | EF584874* |
| | 欧洲粉蝶 *Pieris brassicae* (Linnaeus) | 云南，丽江 Yunnan，Lijiang | 2006.08 | DQ411838* | EF584892* |
| | 菜粉蝶 *Pieris rapae-3*(Linnaeus) | 美国 USA | 2006.12 | AY954581* | EF165027* |
| | 大展粉蝶 *Pieris extensa* (Poujade) | 云南，丽江 Yunnan，Lijiang | 2006.08 | EF584869* | EF584893* |
| | 暗脉菜粉蝶 Pieris napi (Linnaeus) | 加拿大 Canada | 2006.12 | AF170861* | AM236011* |
| | 云粉蝶 *Pontia daplidice-3*(Linnaeus) | 黑龙江，齐齐哈尔 Heilongjiang，Qiqihaer | 2006.07 | EF584871 * | EF584895* |
| | 箭纹云粉蝶 *Pontia callidice-2*(Linnaeus) | 北京大学 Peking University | 2006.06 | EF584870 * | EF584894* |
| 眼蝶科 | 牧女珍眼蝶 *Coenonympha amaryllis* (Cramer) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922033 | JQ924449 |
| Satyrinae | 阿芬眼蝶 *Aphantopus hyperantu* (Linnaeus) | 青海，互助 Qinghai，Huzhu | 2011.07 | JQ922034 | JQ924450 |

注：*表示序列来自许丽等（2007）。

* indicate sequences from Xu *et al*. (2007).

表 2　35 种蝴蝶 CO I 和 Cytb 部分基因 Kimura 2-parameter 遗传距离

**Table 2　Pairwise distances based on the formula of Kimura 2-parameter for genetic mitochondrial CO I and Cytb genes from 35 families**

| | 1 | 2 | 3 | 1 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.028 | 0.030 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.044 | 0.047 | 0.038 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.042 | 0.044 | 0.036 | 0.002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.054 | 0.056 | 0.072 | 0.083 | 0.081 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.155 | 0.157 | 0.150 | 0.151 | 0.151 | 0.168 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.152 | 0.155 | 0.147 | 0.150 | 0.150 | 0.165 | 0.005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.135 | 0.137 | 0.127 | 0.132 | 0.132 | 0.155 | 0.079 | 0.078 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.162 | 0.165 | 0.164 | 0.169 | 0.169 | 0.161 | 0.145 | 0.142 | 0.141 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.171 | 0.174 | 0.174 | 0.165 | 0.162 | 0.156 | 0.152 | 0.152 | 0.145 | 0.131 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 0.145 | 0.145 | 0.139 | 0.135 | 0.135 | 0.155 | 0.136 | 0.134 | 0.132 | 0.118 | 0.142 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 0.150 | 0.150 | 0.151 | 0.144 | 0.144 | 0.159 | 0.152 | 0.154 | 0.146 | 0.152 | 0.163 | 0.150 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 0.149 | 0.149 | 0.150 | 0.142 | 0.142 | 0.158 | 0.151 | 0.152 | 0.145 | 0.150 | 0.161 | 0.149 | 0.001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 0.148 | 0.148 | 0.149 | 0.141 | 0.141 | 0.156 | 0.150 | 0.151 | 0.143 | 0.149 | 0.160 | 0.147 | 0.002 | 0.001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 0.151 | 0.151 | 0.157 | 0.147 | 0.147 | 0.165 | 0.156 | 0.156 | 0.151 | 0.151 | 0.166 | 0.155 | 0.012 | 0.011 | 0.012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 0.169 | 0.169 | 0.171 | 0.166 | 0.166 | 0.184 | 0.150 | 0.147 | 0.146 | 0.135 | 0.170 | 0.134 | 0.115 | 0.114 | 0.113 | 0.121 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | 0.155 | 0.156 | 0.141 | 0.143 | 0.143 | 0.155 | 0.150 | 0.147 | 0.126 | 0.129 | 0.162 | 0.122 | 0.105 | 0.104 | 0.103 | 0.112 | 0.090 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | 0.160 | 0.160 | 0.155 | 0.151 | 0.151 | 0.169 | 0.142 | 0.140 | 0.144 | 0.146 | 0.159 | 0.106 | 0.144 | 0.143 | 0.141 | 0.149 | 0.119 | 0.111 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 0.157 | 0.157 | 0.155 | 0.154 | 0.154 | 0.166 | 0.146 | 0.143 | 0.144 | 0.150 | 0.163 | 0.110 | 0.145 | 0.144 | 0.143 | 0.150 | 0.124 | 0.113 | 0.007 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 0.161 | 0.161 | 0.153 | 0.147 | 0.147 | 0.171 | 0.138 | 0.136 | 0.137 | 0.149 | 0.159 | 0.103 | 0.143 | 0.141 | 0.140 | 0.150 | 0.122 | 0.111 | 0.008 | 0.009 | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | 0.153 | 0.153 | 0.148 | 0.145 | 0.145 | 0.174 | 0.132 | 0.130 | 0.137 | 0.145 | 0.160 | 0.103 | 0.126 | 0.126 | 0.125 | 0.135 | 0.118 | 0.104 | 0.043 | 0.045 | 0.042 | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | 0.170 | 0.170 | 0.162 | 0.160 | 0.160 | 0.188 | 0.141 | 0.139 | 0.138 | 0.164 | 0.173 | 0.125 | 0.127 | 0.125 | 0.124 | 0.134 | 0.112 | 0.096 | 0.096 | 0.097 | 0.093 | 0.056 | | | | | | | | | | | | |
| 24 | 0.180 | 0.180 | 0.180 | 0.170 | 0.170 | 0.201 | 0.157 | 0.155 | 0.156 | 0.177 | 0.191 | 0.136 | 0.138 | 0.136 | 0.135 | 0.145 | 0.128 | 0.105 | 0.107 | 0.109 | 0.103 | 0.071 | 0.030 | | | | | | | | | | | |

续表 2（**Table 2 continued**）

| | 1 | 2 | 3 | 1 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25 | 0.178 | 0.178 | 0.182 | 0.166 | 0.166 | 0.188 | 0.163 | 0.160 | 0.147 | 0.172 | 0.171 | 0.140 | 0.152 | 0.150 | 0.149 | 0.162 | 0.111 | 0.110 | 0.108 | 0.113 | 0.105 | 0.098 | 0.078 | 0.091 | | | | | | | | | | |
| 26 | 0.178 | 0.178 | 0.174 | 0.166 | 0.166 | 0.196 | 0.159 | 0.159 | 0.134 | 0.160 | 0.166 | 0.126 | 0.152 | 0.150 | 0.152 | 0.158 | 0.128 | 0.122 | 0.126 | 0.126 | 0.123 | 0.112 | 0.105 | 0.124 | 0.110 | | | | | | | | | |
| 27 | 0.159 | 0.162 | 0.156 | 0.149 | 0.149 | 0.168 | 0.166 | 0.168 | 0.160 | 0.170 | 0.187 | 0.160 | 0.172 | 0.170 | 0.172 | 0.180 | 0.168 | 0.152 | 0.166 | 0.171 | 0.162 | 0.160 | 0.157 | 0.167 | 0.168 | 0.160 | | | | | | | | |
| 28 | 0.182 | 0.184 | 0.170 | 0.171 | 0.171 | 0.180 | 0.178 | 0.175 | 0.156 | 0.157 | 0.188 | 0.170 | 0.170 | 0.169 | 0.167 | 0.178 | 0.178 | 0.159 | 0.168 | 0.170 | 0.168 | 0.160 | 0.168 | 0.184 | 0.187 | 0.190 | 0.174 | | | | | | | |
| 29 | 0.158 | 0.159 | 0.155 | 0.144 | 0.144 | 0.149 | 0.180 | 0.180 | 0.158 | 0.157 | 0.169 | 0.150 | 0.153 | 0.151 | 0.150 | 0.157 | 0.160 | 0.134 | 0.155 | 0.158 | 0.158 | 0.155 | 0.161 | 0.175 | 0.162 | 0.167 | 0.179 | 0.174 | | | | | | |
| 30 | 0.149 | 0.149 | 0.149 | 0.139 | 0.139 | 0.140 | 0.176 | 0.174 | 0.155 | 0.150 | 0.168 | 0.145 | 0.144 | 0.143 | 0.141 | 0.153 | 0.152 | 0.128 | 0.150 | 0.153 | 0.150 | 0.141 | 0.147 | 0.165 | 0.153 | 0.155 | 0.173 | 0.165 | 0.048 | | | | | |
| 31 | 0.155 | 0.155 | 0.145 | 0.135 | 0.132 | 0.154 | 0.167 | 0.165 | 0.161 | 0.149 | 0.163 | 0.136 | 0.148 | 0.149 | 0.148 | 0.154 | 0.150 | 0.134 | 0.146 | 0.146 | 0.145 | 0.135 | 0.146 | 0.164 | 0.164 | 0.152 | 0.171 | 0.165 | 0.079 | 0.076 | | | | |
| 32 | 0.154 | 0.155 | 0.147 | 0.137 | 0.137 | 0.150 | 0.170 | 0.169 | 0.157 | 0.139 | 0.160 | 0.130 | 0.140 | 0.141 | 0.140 | 0.150 | 0.141 | 0.118 | 0.141 | 0.141 | 0.138 | 0.127 | 0.142 | 0.157 | 0.162 | 0.164 | 0.174 | 0.156 | 0.079 | 0.076 | 0.064 | | | |
| 33 | 0.169 | 0.169 | 0.166 | 0.156 | 0.156 | 0.152 | 0.176 | 0.176 | 0.169 | 0.160 | 0.186 | 0.156 | 0.150 | 0.151 | 0.150 | 0.158 | 0.159 | 0.144 | 0.156 | 0.155 | 0.156 | 0.155 | 0.161 | 0.173 | 0.172 | 0.167 | 0.183 | 0.182 | 0.129 | 0.111 | 0.108 | 0.108 | | |
| 34 | 0.168 | 0.170 | 0.157 | 0.148 | 0.148 | 0.151 | 0.180 | 0.178 | 0.163 | 0.187 | 0.175 | 0.175 | 0.202 | 0.200 | 0.199 | 0.203 | 0.190 | 0.168 | 0.182 | 0.184 | 0.184 | 0.171 | 0.188 | 0.204 | 0.187 | 0.195 | 0.195 | 0.183 | 0.157 | 0.166 | 0.175 | 0.169 | 0.182 | |
| 35 | 0.173 | 0.174 | 0.173 | 0.164 | 0.164 | 0.156 | 0.200 | 0.198 | 0.165 | 0.165 | 0.171 | 0.178 | 0.206 | 0.204 | 0.203 | 0.204 | 0.195 | 0.172 | 0.191 | 0.191 | 0.190 | 0.188 | 0.200 | 0.213 | 0.205 | 0.204 | 0.195 | 0.185 | 0.185 | 0.187 | 0.192 | 0.183 | 0.184 | 0.140 |

1.橙黄豆粉蝶 *Colias fieldii-1*；2. 橙黄豆粉蝶 *Colias fieldii-2*；3. 山豆粉蝶 *Colias montium*；4. 斑缘豆粉蝶 *Colias erate*-1；5.黎明豆粉蝶 *Colias erate-2*；6.橙黄豆粉蝶 *Colias fieldi*；7.钩粉蝶 *Gonepteryx rhamni-1*；8.圆翅钩粉蝶 *Gonepteryx amintha*；9.钩粉蝶 *Gonepteryx rhamni-2*；10.皮氏尖襟粉蝶 *Anthocharis bieti*；11.红襟粉蝶 *Anthocharis cardamines*；12.灵奇尖粉蝶 *Appias lyncida*；13.云粉蝶 *Pontia daplidice-1*；14.云粉蝶 *Pontia daplidice-3*；15.箭纹云粉蝶 *Pontia callidice-2*；16.云粉蝶 *Pontia daplidice-2*；17.箭纹云粉蝶 *Pontia callidice*；18.绿云粉蝶 *Pontia chloridice*；19.菜粉蝶 *Pieris rapae-2*；20.菜粉蝶 *Pieris rapae-1*；21.菜粉蝶 *Pieris rapae-3*；22.大展粉蝶 *Pieris extensa*；23.黑纹粉蝶 *Pieris melete*；24.暗脉菜粉蝶 *Pieris napi*；25.大卫粉蝶 *Pieris davidis*；26.欧洲粉蝶 *Pieris brassicae*；27.青粉蝶 *Pareronia anais*；28.鹤顶粉蝶 *Hebomoia glaucippe*；29.小檗绢粉蝶 *Aporia hippia*；30.暗色绢粉蝶 *Aporia bieti*；31.妹粉蝶 *Mesapia peloria*；32.酪色绢粉蝶 *Aporia potanini*；33.灰姑娘绢粉蝶 *Aporia intercostata*；34.牧女珍眼蝶 *Coenonympha amaryllis*；35.阿芬眼蝶 *Aphantopus hyperantu*.

### 2.3 分子系统树的构建

本研究以眼蝶科的牧女珍眼蝶和阿芬眼蝶为外群，采用 Mega4.1 构建基于 COⅠ 与 Cytb 构建 UPGMA 树和 ME 树，得到的分子系统树如图 1，图 2 所示。所构建分子系统树中的内部分支检验置信值和后验概率低于 50% 的未作显示。由图 1，图 2 可以看出：外群牧女珍眼蝶和阿芬眼蝶构成一独立支系，可以作为外群；粉蝶属、云粉蝶属、襟粉蝶属、钩粉蝶属、绢粉蝶属（妹粉蝶除外）、豆粉蝶属各自以较高

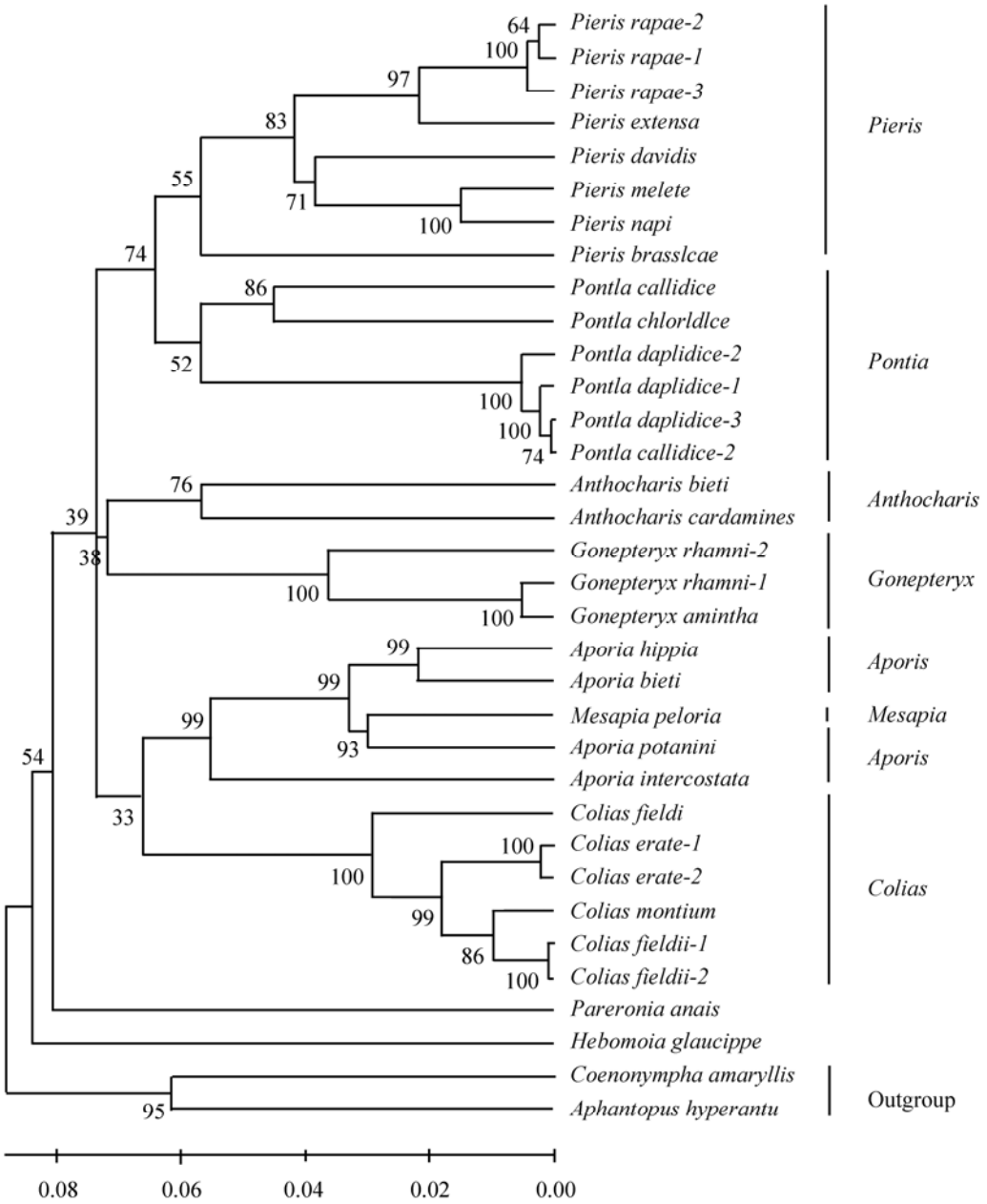


图 **1** 基于线粒体 **CO**Ⅰ和 **Cytb** 基因部分序列构建的 **UPGMA** 树，转换和颠换（各分支上数字为 **bootstrap 1 000** 次内部分支检验置信值）

**Fig. 1 The UPGMA tree based on partial mitochondrial CO Ⅰ and Cytb genes, transition and transversion (numbers on each node are the values of bootstrap 1 000 replicates)**

图中拉丁学名的中文名称见表 1，图 2 同。

The Chinese name of the scientific name is the same with Table 1, the same for Fig.2.

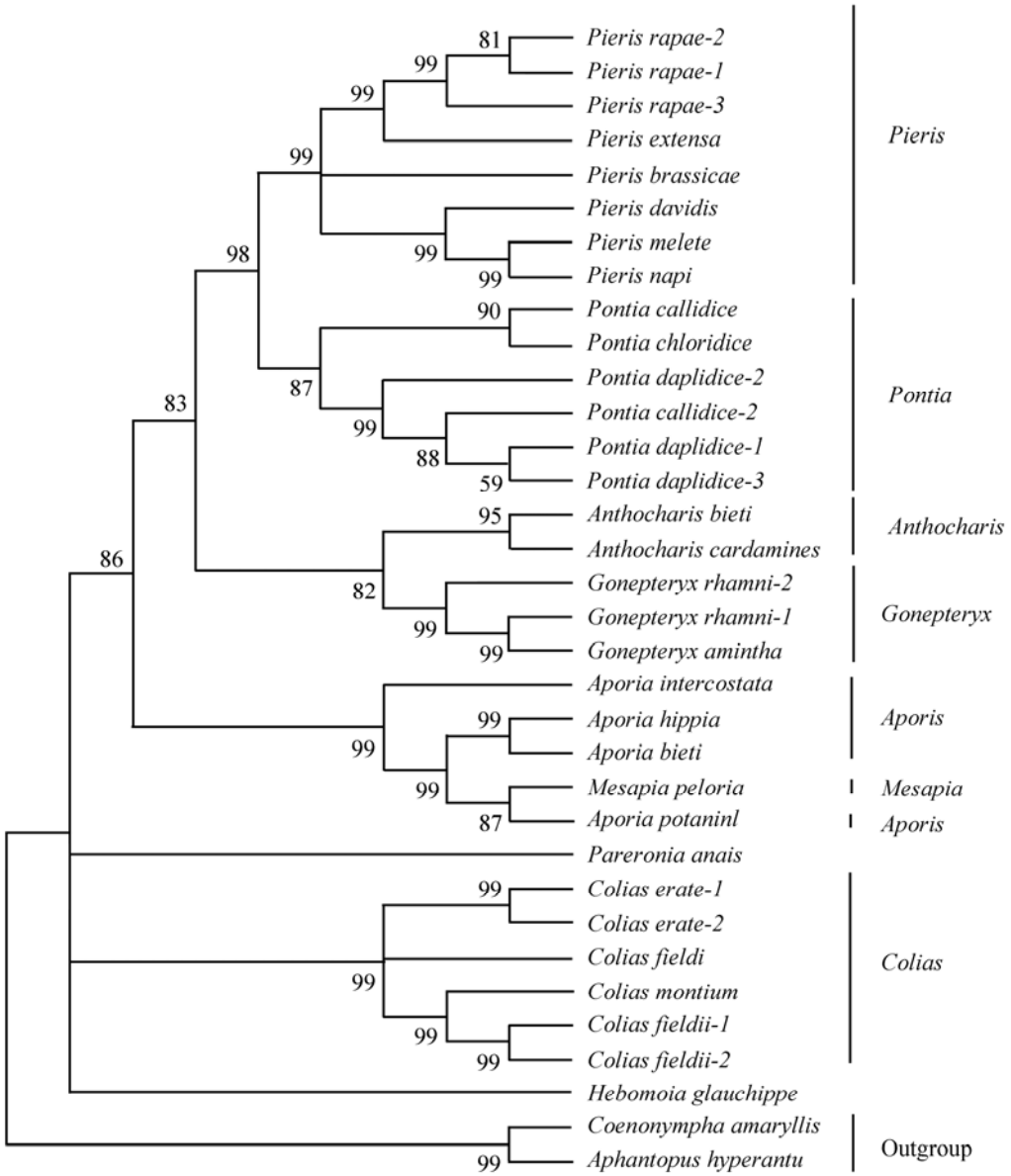


**图 2　基于线粒体 CO Ⅰ和 Cytb 基因部分序列构建的 ME 树，转换和颠换（各分支上数字为 bootstrap 1 000 次内部分支检验置信值）**

**Fig. 2　The ME tree based on partial mitochondrial CO Ⅰ and Cytb genes, transition and transversion (numbers on each node are the values of bootstrap 1 000 replicates)**

置信值形成单系群（自展值在 76%~100%）；粉蝶属与云粉蝶属形成姐妹关系构成一分支，亲缘关系较近（自展值在 74%~98%）；豆粉蝶属构成一独立分支。图 2 显示襟粉蝶属与钩粉蝶属形成姐妹关系，亲缘关系较近（自展值在 82%）。

## 3　讨论

### 3.1　序列变异分析

Knight and Mindell（1993）认为，在重建系统树时转换/颠换值若小于 2.0，则此基因序列突变已达饱和状态，受进化噪音的影响可能性较

大，重建系统发生时如不进行特别加权就会出现错误信息。本文中蝶 Cytb 基因的转换／颠换平均值为 2.0，不小于 2.0 的临界值。另外，内群所有序列的平均遗传距离为 2.6%，也远远低于昆虫线粒体 DNA 突变饱和点 25%~30%（DeSalle *et al.*，1987；Brower and DeSalle，1998）。因而构建分子系统树时不需要对转换和颠换进行特别加权。

本研究通过对 COⅠ 和 Cytb 基因的部分序列进行联合分析，除外群外，其中保守位点 584 个，可变位点 407 个，简约信息位点 326 个；A、T、G、C 碱基的平均含量分别为 31.3%、39.4%、12.1%、19.1%，A+T 平均含量较高，为 70.7%，表现出明显的 A+T 偏倚。这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性。转换/颠换的比值为 R=1.434，整合数据集的转换/颠换（R）= 1.434 < 2，表明碱基替代已达饱和。

### 3.2 联合分析

在对分子系统树的分析中，Kimball 等（1999）指出，任何自举检验值小于 50%的分支都应谨慎对待，只有置信度大于 70%的进化枝才是比较可信的。依据此原则，本文所构建的分子系统树中，各分支的自举检验值基本都高于 70%，因而可信度较高。本研究以眼蝶科的牧女珍眼蝶和阿芬眼蝶为外群，构建 UPGMA 树和 ME 树，共同结果显示：外群牧女珍眼蝶和阿芬眼蝶构成一独立支系，可以作为外群；粉蝶属、云粉蝶属、襟粉蝶属、钩粉蝶属、绢粉蝶属（妹粉蝶除外）、豆粉蝶属各自以较高置信值形成单系群 (自展值在 76%~100%）；粉蝶属与云粉蝶属形成姐妹关系构成一分支，亲缘关系较近(自展值在 74%~98%）；豆粉蝶属构成一独立分支。图 2 显示襟粉蝶属与钩粉蝶属形成姐妹关系，亲缘关系较近(自展值在 82%）。

### 3.3 粉蝶科各属间系统发生关系及其分类地位问题的讨论

本研究采用 MAGE4.1 软件分析粉蝶科 35 种的系统进化关系，UPGMA 分子系统树健全性好。非加权组平均法 (UPGMA）是一种较常用的聚类分析方法，最早是用来解决分类问题的。Haseeb 等（2008）基于 16S rRNA、线粒体 DNA 的 Cytb 和 d-loop 片段，用 3 种方法 BA、MP、UPGMA 对羚羊进行系统进化研究，结果显示 BA 和 UPGMA 方法在线粒体标记进行羚羊系统进化研究中具有效率高和健全性好。

本研究中粉蝶科 7 属构成 4 分支（图 2），其中云粉蝶属和粉蝶属为姊妹群关系构成一分支（自展值 98%），表明这 2 个属亲缘关系比较接近，这与 Braby 等（2006）、许丽等（2007）研究结果一致；妹粉蝶（妹粉蝶属）和绢粉蝶属形成一分支，许丽等（2007）认为绢粉蝶属为一簇，与（云粉蝶属+粉蝶属）形成平行演化支。

本研究中钩粉蝶属与襟粉蝶属形成姐妹关系构成一分支（图 2 自展值 82%），与许丽等（2007）研究结果不同，他们把黄粉蝶属和钩粉蝶属组成（自展值为 51%）一分支，迁粉蝶属和豆粉蝶属互为姐妹关系形成另一个支系（自展值高达 92%），与斑粉蝶属+（襟粉蝶族+ 绢粉蝶属+（云粉蝶属+粉蝶属））为平行演化支。

近十多年来，随着分子系统学在蝶类的系统分类研究中的运用，粉蝶类的相关研究取得了一定进展。Braby 等（2006）利用多个基因重建了粉蝶科的系统树。分歧在于 Braby 等（2006）认为钩粉蝶属与方粉蝶属构成姐妹群，亲缘关系很近；而与豆粉蝶属亲缘关系远些，不过其自举检验值也较低（< 50%）。因此从分子系统发生角度尚不能确定钩粉蝶属与其余各属的亲缘关系。本研究结果显示钩粉蝶属与襟粉蝶属为姐妹群，亲缘关系较近，为钩粉蝶属的分子系统进化关系提供有力线索。

综上所述，本文分析了粉蝶科 7 属的分子系统发生关系，研究结果显示，云粉蝶属和粉蝶属姊妹关系构成一分支，亲缘关系较近；绢粉蝶属和妹粉蝶（妹粉蝶属）一分支，亲缘关系较近；钩粉蝶属与襟粉蝶属为姐妹群构成一分支，亲缘关系较近。以上结果为今后进一步运用分子手段探讨分析中国粉蝶科的系统发生关系提供了参考和借鉴。

## 参考文献 (References)


Ackery PR, Jong RD, Vane WRI, 1999. The butterflies: Hedyloidea, Hesperioidea and Papilionoidea//Kristensen NP(ed.). Lepidoptera, Moths and Butterflies. Evolution, Systematics and Biogeography. Berlin: de Gruyter. Vol.1. 263–300.

Braby MF, Vila R, Pierce NE, 2006. Molecular phylogeny and systematics of the Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea): higher classification and biogeography. *Zool. J. Linn. Soc.*, 147: 239–275.

Brower AVZ, Desalle R, 1998. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterfies: The utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*, 7: 73–82.

Chen N, Zhu GP, Hao JS, Zhang XP, Su CY, Pan HC, Chew FS, 2006. The green-veined white (*Pieris napi* L.), its Pierine relatives, and the systematics dilemmas of divergent character sets (Lepidoptera, Pieridae). *Biol . J. Linn. Soc.*, 88: 413–435.

David JL, Djunijanti P, Naomi EP, Rudolf M, 2008. Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *BMC Evolutionary Biology*, 8: 301–314.

DeSalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC, 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondria DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J . Mol. Evol.*, 26: 57–164.

Ehrlich PR, 1958. The comparative morphology, phylogeny and higher classification of the butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea). *University of Kansas Science Bulletin*, 39: 305–364.

Felsenstein J, 1985. Confidence limit s on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.

Haseeb A, Ibrahim AA, Ali HB, Ahmad HAF, Ali AAH, 2008. Bayesian, maximum parsimony and UPGMA models for inferring the phylogenies of antelopes using mitochondrial markers. *Evolutionary Bioinformatics*, 4: 263–270.

Kimbal RT, Braun EL, Zwartjes PW, 1999. A molecular phylogeny of the pheasants and part ridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11: 38–54.

Klots AB, 1933. A generic revision of the Pieridae (Lepidoptera) together with a study of the male genitalia. *Entomol. Am.*, 12: 139–242.

Klots AB, 1929. The generic status of *Catopsilia* Hbner and *Phoebus* Hbner, with a discussion of the relationships of the species and the homologies of the male genitalia (Lepidoptera, Pieridae). *Bulletin of the Brooklyn Entomological Society*, 24: 203–214.

Klots AB, 1933. A generic classification of the Pieridae (Lepidoptera) together with a study of the male genitalia. *Entomologica America*, 12: 139–242.

Knight A, Mindel DP, 1993. Substitution bias, weighting of DNA sequences evolution, and the phylogenetic positions of feasviper. *Syst. Biology*, 42 ( 1): 18–31.

Kumar S, Tamura K, Ne M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163.

Simon C, Frati F, Becknbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogeneticutility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am*., 87: 651–701.

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. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876–4882.

Vane, Wright RI, 2003. Evidence and identity in butterfly systematics// Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (eds.). Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight. Chicago: University of Chicago Press. 477–513.

Zimmermann M, Wahlberg N, Descimon N, 2000. Phylogeny of *Euphydryas* check spot butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on mitochondrial DN A sequence data. *Ann. En tomol. Soc. Am*., 93 (3): 347–335.

陈娜, 朱国萍, 郝家胜, 张小平, 苏成勇, 潘鸿春, 吴冬霞. 2007. 基于线粒体 16S rDNA 序列探讨蛱蝶科(鳞翅目, 蝶亚目)主要分类群的系统发生关系. 动物学报, 53(1): 106–118.

黄丽莉, 阙海勇, 陈超, 匡先钜, 薛芳森, 2012. 亚洲玉米螟不同地理种群基于 CO Ⅰ基因序列初步分析. 应用昆虫学报, 49 (6): 1508–1512.

李蓓, 郭晓华, 刘广纯, 刘新民, 2013. 嗡蜣螂属 *Onthophagus* 十二种线粒体 CO Ⅰ基因的 DNA 条形码研究. 应用昆虫学报, 50 (1): 108–117.

苏成勇, 朱国萍, 郝家胜, 陈娜, 潘鸿春, 吴冬霞, 张小平, 2007. 凤蝶亚科 16S rRNA 基因的分子系统发生分析. 动物分类学报, 32 (2): 335–342.

王戎疆, 万宏, 龙玉, 雷光春, 李绍文, 2004. 利用线粒体 CO Ⅱ基因序列对中国尾蛱蝶属系统分化的研究. 昆虫学报, 47 (2): 243–247.

武春生, 2010. 中国动物志昆虫纲第五十二卷鳞翅目粉蝶科. 北京: 科学出版社. 1–365.

吴冬霞, 郝家胜, 朱国萍, 陈娜, 苏成勇, 潘鸿春, 张小平, 2007. 基于线粒体 Cytb 基因的线蛱蝶亚科的系统发育. 动物学研究, 28 (1): 1–8.

许丽, 郝家胜, 朱国萍, 殷先兵, 潘鸿春, 黄敦元, 张小平, 2007. 基于线粒体 CO Ⅰ 和 Cytb 基因的粉蝶亚科及黄粉蝶亚科(粉

蝶科）部分类群的分子系统发生. 动物分类学报，32 (4): 842–850.

杨倩倩, 李志红, 伍祎, 柳丽君, 2012. 线粒体 COⅠ基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用. 应用昆虫学报，49 (06): 1687–1695.

张大秀，郝家胜，邹方振，朱国萍，潘鸿春，张小平, 2009. 基于线粒体 Cytb 基因和 COⅠ 基因序列研究豹蛱蝶亚科 (鳞翅目，蛱蝶科) 10 属间的系统发生关系. 动物分类学报，34 (3): 522–530.

张敏, 曹天文, 郭亚平, 张建珍, 马恩波, 王瑞, 2007. 迷蛱蝶属及相关物种细胞色素基因 b 基因序列及分子系统研究. 动物分类学报, 32 (2): 255–260.

张明, 张东, 2013. 基于线粒体 COⅠ基因片段的麻蝇属(双翅目: 麻蝇科)部分种类 DNA 分类研究). 应用昆虫学报，50 (1): 71–85.

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): 186–192.

周尧, 1994. 中国蝶类志. 郑州: 河南科学技术出版社. 231–238.

周尧, 1998. 中国蝴蝶分类与鉴定. 郑州: 河南科学技术出版社. 30–38.