

# 基于线粒体 COI 基因序列的挂墩稻弄蝶分类地位研究

国 栋<sup>1,2</sup>, 范晓凌<sup>1</sup>, 王 敏<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 资源环境学院 广东 广州 510642; 2 山东省农业科学院 高新技术研究中心, 山东 济南 250100)

**摘要:**对稻弄蝶属 *Parnara* 4 种 20 个样本的线粒体 COI 基因序列(1 380 bp)的特征、遗传距离进行了分析,并以 2 种谷弄蝶 *Pelopidas* 为外群,采用最大简约法(MP)和贝叶斯法(BI)构建系统树.结果表明:种间最小序列差异为 3.3%,种内个体间最大序列差异为 0.9%;系统树显示挂墩稻弄蝶 *Parnara batta* 与直纹稻弄蝶 *Parnara guttata* 是 2 个明显不同的分支;其种间的平均遗传距离为 3.5%.综合地理分布与形态差异,挂墩稻弄蝶应该是一个独立的种.

**关键词:**挂墩稻弄蝶; COI 基因; 系统发育; 分类

中图分类号:Q969

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)02-0043-04

## Taxonomic Status of *Parnara batta* Evans (Lepidoptera: HesperIIDae) Inferred from Mitochondrial COI Gene Sequences

GUO Dong<sup>1,2</sup>, FAN Xiao-ling<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>

(1 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 High-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

**Abstract:** The characterization and genetic distance of mitochondrial COI gene sequence (1 380 bp) from 20 individuals covering 4 species were analyzed in the skipper genus *Parnara*. Phylogenetic trees were reconstructed with maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) using two *Pelopidas* species as outgroups. The results indicated that the smallest sequence divergence among species was 3.3%, whereas the largest intraspecific genetic distance was 0.9%. The tree showed that *Parnara batta* was quite different from *Parnara guttata* and strongly supported, and their average genetic distance was 3.5%. The molecular analysis and their sympatric distribution, together with the differences of morphological characteristics, suggested that *Parnara batta* is a distinct species.

**Key words:** *Parnara batta*; COI gene; phylogeny; taxonomy

稻弄蝶属 *Parnara* Moore, 1881 的昆虫是水稻上的主要害虫之一,全世界已知 9 种,分布于亚洲(6 种)、澳洲(1 种)和非洲(2 种)<sup>[1]</sup>. 该类群在长期的演化过程中,成虫形态特征种间非常相似,种内个体间存在很大差异,致使一部分种的界定存在很大的争议,如挂墩稻弄蝶 *Parnara batta*, Evans<sup>[2]</sup> 将其作为直纹稻弄蝶 *Parnara guttata* (Bremer & Grey, 1853) 的一个亚种,即直纹稻弄蝶挂墩亚种 *P. guttata batta* Evans, 1949, 并得到了部分学者的支持<sup>[3]</sup>. Chiba

等<sup>[1]</sup>根据外部形态,尤其是雄性外生殖器特征对世界稻弄蝶属种类进行修订时,视直纹稻弄蝶挂墩亚种为指名亚种 *P. guttata guttata* 的异名,袁锋等<sup>[4]</sup>支持这一观点. Devyatkin & Monastyrskii<sup>[5]</sup> 依据斑纹与雄性外生殖器,在研究越南弄蝶时认为挂墩稻弄蝶是一个独立的种. 笔者近来的大量调查发现挂墩稻弄蝶与直纹稻弄蝶是同域分布的,如江西、福建、广东等地 2 种类型都有,所以作为亚种处理是不合适的. 由于对种间和种内形态变异的认识程度不同,仅

收稿日期:2009-08-12

作者简介:国 栋(1982—),男,硕士;通信作者:范晓凌(1966—),女,副教授,博士, E-mail: fanxiaol66@scau.edu.cn

基金项目:华南农业大学资源环境学院院长基金(ZHXY2008A04)

采用形态特征进行研究,致使不同的分类处理之间有较大出入.要解决这些由于对形态变异认识不同而产生的分类学问题,需要借助于独立于形态特征之外的数据.随着分子生物学技术的快速发展,分子数据已成为研究经典分类中疑难问题的主要依据,其中DNA分析成为许多传统研究领域重要辅助手段之一,特别是DNA序列分析.本文选取了适合于种及种下研究的线粒体COI基因对稻弄蝶属的几个近似种或变异类型进行系统发育分析,从而解决了挂墩稻弄蝶界定不一致的问题.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

挂墩稻弄蝶 *Parnara batta* 分布于中国福建以及越南中北部.本研究对湖北、江西、福建、广东、广西和海南进行了详细调查,所有的成虫标本采用网捕,浸泡于无水乙醇或快速干燥,以备DNA的提取.从采集到的成虫标本中选取了20个样本,包括4个近似种或不同的变异类型.根据以往的研究<sup>[6]</sup>,以谷弄蝶属 *Pelopidas* 的2个种为外群,共计22个标本(表1).

表1 研究标本的来源及基因序列号

Tab.1 The samples and accession sequences newly determined in this study

| 种名                             | 编号 | 采集地   | 登录号      |
|--------------------------------|----|-------|----------|
| 直纹稻弄蝶 <i>Parnara guttata</i>   | 1  | 江西武夷山 | GU290255 |
|                                | 2  | 江西武夷山 | GU290256 |
|                                | 3  | 江西武夷山 | GU290257 |
|                                | 4  | 福建南平  | GU290258 |
|                                | 5  | 湖北神农架 | GU290259 |
|                                | 6  | 海南尖峰岭 | GU290260 |
|                                | 7  | 广东南岭  | GU290261 |
| 挂墩稻弄蝶 <i>Parnara batta</i>     | 1  | 福建南平  | GU290262 |
|                                | 2  | 广西猫儿山 | GU290263 |
|                                | 3  | 广西猫儿山 | GU290264 |
|                                | 4  | 江西武夷山 | GU290265 |
|                                | 5  | 江西武夷山 | GU290266 |
| 曲纹稻弄蝶 <i>Parnara ganga</i>     | 1  | 海南尖峰岭 | GU290267 |
|                                | 2  | 海南尖峰岭 | GU290268 |
|                                | 3  | 福建南平  | GU290269 |
|                                | 4  | 广东广州  | GU290270 |
| 幺纹稻弄蝶 <i>Parnara bada</i>      | 1  | 广东广州  | GU290271 |
|                                | 2  | 广东广州  | GU290272 |
|                                | 3  | 福建南平  | GU290273 |
|                                | 4  | 福建南平  | GU290274 |
| 南亚谷弄蝶 <i>Pelopidas agna</i>    |    | 广东南岭  | GU290275 |
| 隐纹谷弄蝶 <i>Pelopidas mathias</i> |    | 福建南平  | GU290276 |

### 1.2 方 法

总DNA的提取采用试剂盒(血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司).无水乙醇浸泡的标本取胸部肌肉少许,或干标本取1至2条足,用TE溶液浸泡数小时,双蒸水冲洗,吸干水分.

PCR扩增引物为F1629, 5' - CATTAAATTG-GAGATGATCAAATTTAT - 3'<sup>[6]</sup>; COI - 2, 5' - TC-CATTGCACTAATCTGCCA - 3'<sup>[7]</sup>.扩增体系50 μL,包括10 × Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,10 pmol/L引物各2 μL,2.5 U *Taq*酶、DNA模板2 μL和去离子水补至50 μL.反应条件:94 °C预变性4 min,94 °C变性0.5 min,48 °C退火1.0 min,72 °C延伸1.5 min,共35个循环;72 °C延伸7 min,4 °C保存.PCR产物采用DNA凝胶纯化试剂盒(天根生化科技有限公司)回收目的片段,克隆双向测序.

所获得的序列用DNASTAR中的SeqMan<sup>[8]</sup>软件核查拼接.序列的比对,碱基差异,遗传距离的计算由MEGA 4.0<sup>[9]</sup>完成.采用最大简约法(Maximum parsimony, MP)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)分析物种间的系统发育关系.在PAUP \* 4.0b10<sup>[10]</sup>中构建MP树时用TBR(Tree-bisection-reconnection)分枝交换算法,100次随机增加序列(Random addition sequences)的启发式搜索(Heuristic search),序列特征等权处理,所有的裂缝(Gap)作为缺失性状(Missing data)对待,数据自展(Bootstrap)次数为1 000.在MrBayes 3.2.1<sup>[11]</sup>中进行贝叶斯分析时,最佳置换模型(GTR + G)由Modeltest 3.7<sup>[12]</sup>确定,同时运行2次,每次运行4条MCMC链2 000 000代,每100代保存1棵树,使用默认的冷热链参数,最初的500 000代为老化样本.

## 2 结果与分析

### 2.1 挂墩稻弄蝶的分类

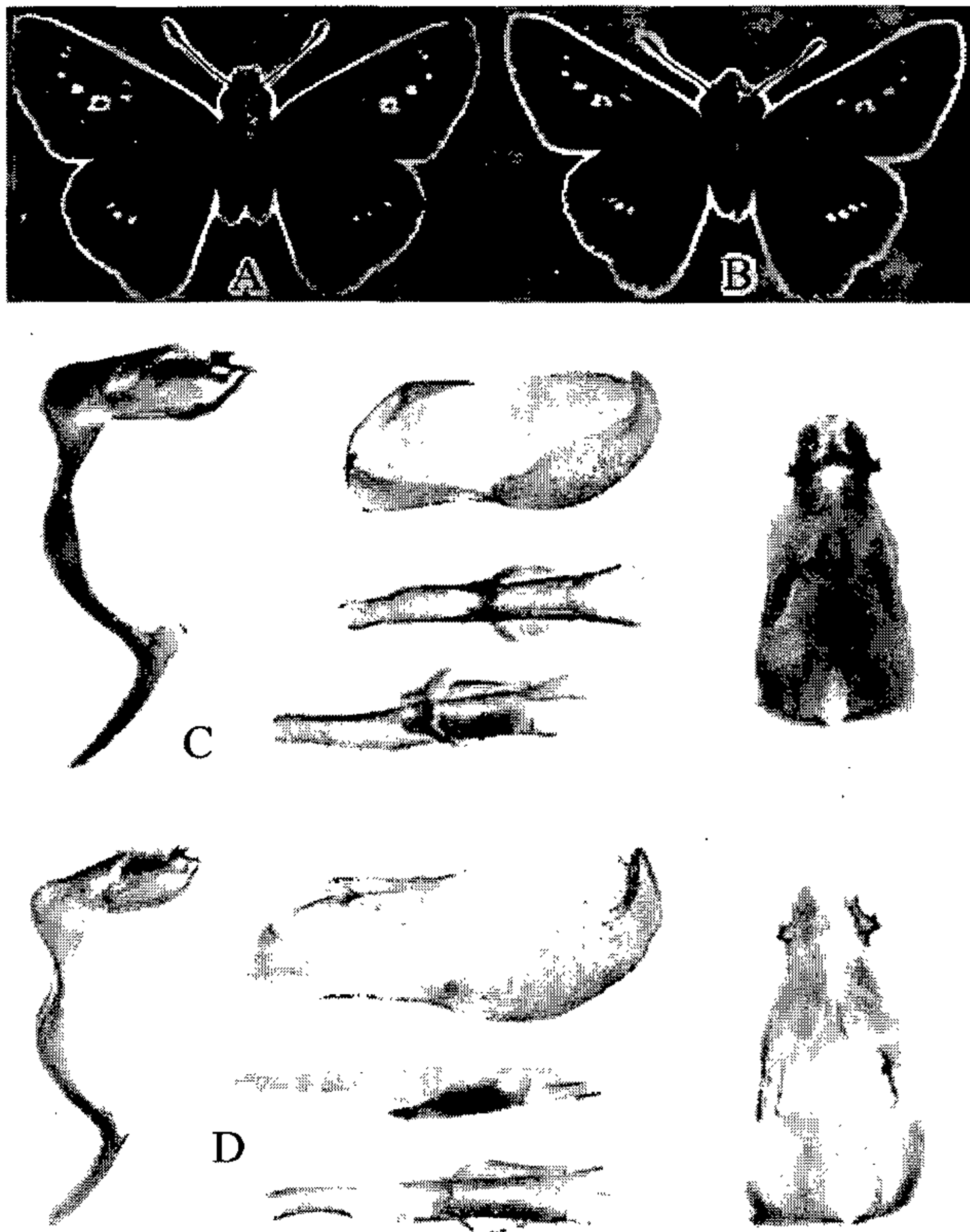
挂墩稻弄蝶 *P. batta* Evans, 1949

*P. guttata* batta Evans, 1949: 433 (Type locality: Gaudun, Fujian); Lee, 1965: 189-194.

*P. batta*: Devyatkin & Monastyrskii, 2002: 150-151.

鉴征:挂墩稻弄蝶与直纹稻弄蝶非常相似,但也有不同,其主要区别是体小,翅面斑纹小,前翅中室斑有或无,后翅斑纹退化,若有4个斑,则M1、M2室斑很小,并在同一直线上;雄性外生殖器背兜中突端部粗钝,抱器基部微弧形(图1).

分布:中国的福建、江西和广西;越南.



A:挂墩稻弄蝶 *P. batta* 成虫(福建武夷山);B:直纹稻弄蝶 *P. guttata* 成虫(福建武夷山);C:挂墩稻弄蝶雄性外生殖器;D:直纹稻弄蝶雄性外生殖器.

图 1 2 种稻弄蝶成虫和雄性外生殖器

Fig. 1 Adults and male genitalia of two *Parnara* species

## 2.2 COI 基因序列的分析

### 2.2.1 序列特征与碱基组成 在测定的稻弄蝶属

20 个样本的 COI 基因 1 380 bp 序列中,没有插入和缺失,其中变异位点 159 个,简约信息位点 128 个.碱基组成存在明显的偏向性,A、T、G、C 分别占 31.0%、40.6%、13.0%、15.5%,A + T 占 71.6%,G + C 占 28.5%.这一结果符合昆虫线粒体基因富含 A + T 的情况<sup>[13]</sup>,特别在第 3 密码子的 A + T 高达 91.4%.

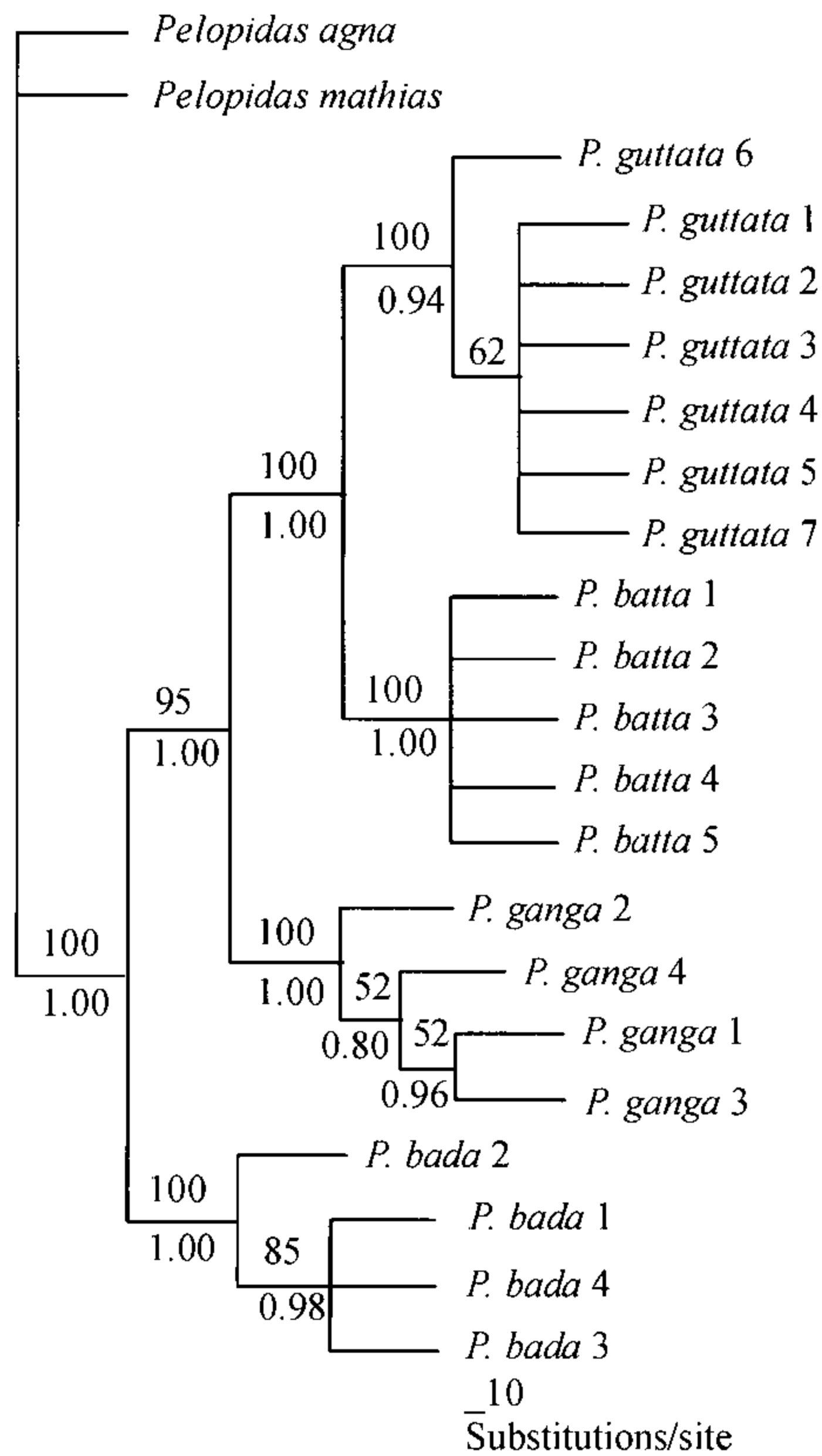
2.2.2 遗传距离 利用 MEGA4.0 软件中的 p-距离法(p-Distance)计算稻弄蝶属 20 个个体 COI 基因序列之间的遗传距离(表 2).表 2 显示,不同种之间的序列差异为 3.3%~6.7%.种内不同个体之间的序列差异:直纹稻弄蝶为 0.1%~0.3%,挂墩稻弄蝶为 0.1%~0.2%,曲纹稻弄蝶 *P. ganga* 为 0.4%~0.7%,幺纹稻弄蝶 *P. bada* 为 0.1%~0.9%.很明显,种间(直纹稻弄蝶与挂墩稻弄蝶)最小差异(3.3%)远远大于种内最大差异(0.9%).

2.2.3 系统发育分析 基于 COI 基因构建稻弄蝶属的 MP 树,该树的树长为 341,一致性指数(CI)为 0.853 4,保留指数(RI)为 0.929 6;同时基于 GTR + G 模型(-lnL = 3 569.158 4)构建贝叶斯树,2 种方法构建的系统树结果基本一致,文中提供的系统树是基于 MP 树的结果(图 2).由图 2 可见,稻弄蝶属的 20 个样本明显地聚成了 4 个分支,分别是直纹稻弄蝶,挂墩稻弄蝶,曲纹稻弄蝶和幺纹稻弄蝶;挂墩稻弄蝶聚成了明显而独立的一支,且得到了很高的支持[自展值(BP) = 100,后验率(PP) = 1.00],并与直纹稻弄蝶是姐妹种.

表 2 稻弄蝶属序列间的遗传距离

Tab. 2 Pairwise distance matrixe of the genus *Parnara*

| 序号 | 样本                  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    |
|----|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | <i>P. guttata</i> 1 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2  | <i>P. guttata</i> 2 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3  | <i>P. guttata</i> 3 | 0.003 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4  | <i>P. guttata</i> 4 | 0.003 | 0.001 | 0.003 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 5  | <i>P. guttata</i> 5 | 0.001 | 0.000 | 0.001 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 6  | <i>P. guttata</i> 6 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 0.002 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 7  | <i>P. guttata</i> 7 | 0.002 | 0.001 | 0.002 | 0.002 | 0.001 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 8  | <i>P. batta</i> 1   | 0.036 | 0.034 | 0.036 | 0.036 | 0.034 | 0.033 | 0.035 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 9  | <i>P. batta</i> 2   | 0.036 | 0.034 | 0.036 | 0.036 | 0.034 | 0.033 | 0.035 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 10 | <i>P. batta</i> 3   | 0.036 | 0.034 | 0.036 | 0.036 | 0.034 | 0.033 | 0.035 | 0.001 | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 11 | <i>P. batta</i> 4   | 0.036 | 0.035 | 0.036 | 0.036 | 0.035 | 0.034 | 0.036 | 0.002 | 0.002 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 12 | <i>P. batta</i> 5   | 0.036 | 0.034 | 0.036 | 0.036 | 0.034 | 0.033 | 0.035 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.002 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 13 | <i>P. ganga</i> 1   | 0.050 | 0.049 | 0.049 | 0.049 | 0.049 | 0.048 | 0.049 | 0.051 | 0.051 | 0.051 | 0.052 | 0.051 |       |       |       |       |       |       |       |
| 14 | <i>P. ganga</i> 2   | 0.051 | 0.050 | 0.050 | 0.051 | 0.050 | 0.049 | 0.051 | 0.050 | 0.050 | 0.050 | 0.051 | 0.050 | 0.004 |       |       |       |       |       |       |
| 15 | <i>P. ganga</i> 3   | 0.054 | 0.052 | 0.052 | 0.052 | 0.052 | 0.051 | 0.053 | 0.052 | 0.054 | 0.054 | 0.054 | 0.054 | 0.006 | 0.007 |       |       |       |       |       |
| 16 | <i>P. ganga</i> 4   | 0.053 | 0.051 | 0.051 | 0.052 | 0.051 | 0.051 | 0.052 | 0.051 | 0.051 | 0.051 | 0.052 | 0.051 | 0.004 | 0.004 | 0.007 |       |       |       |       |
| 17 | <i>P. bada</i> 1    | 0.063 | 0.062 | 0.062 | 0.063 | 0.062 | 0.061 | 0.062 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.054 | 0.056 | 0.058 | 0.056 |       |       |       |
| 18 | <i>P. bada</i> 2    | 0.063 | 0.062 | 0.062 | 0.063 | 0.062 | 0.061 | 0.062 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.055 | 0.057 | 0.059 | 0.057 | 0.009 |       |       |
| 19 | <i>P. bada</i> 4    | 0.061 | 0.059 | 0.059 | 0.061 | 0.059 | 0.059 | 0.060 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.065 | 0.064 | 0.052 | 0.054 | 0.056 | 0.054 | 0.004 | 0.007 |       |
| 20 | <i>P. bada</i> 3    | 0.060 | 0.059 | 0.059 | 0.060 | 0.059 | 0.058 | 0.059 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.051 | 0.053 | 0.055 | 0.053 | 0.003 | 0.007 | 0.001 |



图中分支上面的数字是 Bootstrap 1 000 重复抽样的置信值, 只显示分支支持度大于 50% 的值; 分支下面的数字是基于贝叶斯分析的后验率。

图2 基于线粒体 COI 基因序列的稻弄蝶属系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the genus *Parnara* based on sequences of the mitochondrial COI gene

### 3 结论

稻弄蝶属的成虫外形非常相似, 尤其表现在翅面斑纹上. 综合雄性外生殖器的形态分类依然不能解决疑难种界定的问题. 由于该类群特殊的生活环境, 种间和种内个体间不同程度的趋同和分化现象, 致使形态分类存有一定的争议.

关于挂墩稻弄蝶的分类地位, 本文基于线粒体 COI 基因的研究表明, 采自广西、福建、江西等地不同的个体都稳定地聚在了一起, 且获得很高的支持, 并与直纹稻弄蝶明显地分为 2 个分支. 由于两者是同域分布, 亚种的处理不妥. 综合它们形态上的差异, 笔者支持 Devyatkin & Monastyrskii 的观点, 即挂墩稻弄蝶是一个独立的种.

#### 参考文献:

[1] CHIBA H, ELIOT J N. A revision of the genus *Parnara*

Moore (Lepidoptera: Hesperidae), with special reference to the Asian species [J]. *Tyōto Ga*, 1991, 42 (3): 179-194.

- [2] EVANS W H. A catalogue of the Hesperidae from Europe, Asia & Australia in the British Museum (Natural History) [M]. London: The British Museum, 1949: 502.
- [3] 李传隆. 中国稻弄蝶属的种类及其地理分布 [J]. *动物学报*, 1965, 17(2): 189-194.
- [4] 袁锋, 王宗庆, 袁向群. 中国稻弄蝶属分类与一新记录种 [J]. *昆虫分类学报*, 2005, 27 (4): 292-196.
- [5] DEVIATKIN A L, MONASTYRSKII A L. Hesperidae of Vietnam, 12: A further contribution to the Hesperidae fauna of North and Central Vietnam [J]. *Atalanta*, 2002, 33 (1/2): 137-155.
- [6] DODO Y T, SAIGUSA T, CHIBA H, et al. Molecular phylogeny of Japanese skippers (Lepidoptera: Hesperidae) based on mitochondrial ND5 and COI gene sequences [J]. *Trans lepid Soc Japan*, 2008, 59(1): 29-41.
- [7] WANG B C, PARK J, WATABE H P, et al. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* section (Diptera: Drosophilidae) based on mitochondrial and nuclear sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 40 (2): 484-500.
- [8] SWINDELL S R., PLASTERER T N. Methods in molecular biology: Sequence data analysis guidebook [M]. Seqman: Contig Assembly, 1997: 75-89.
- [9] TAMURA K, DUKLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis software version 4. 0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8): 1596-1599.
- [10] SWOFFORD D L. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 4 [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.
- [11] HUELSENBECK J P, RONQUIST F R. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17 (8): 754-755.
- [12] POSADA D, CRANDALL K P. Modeltest: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14 (9): 817-818.
- [13] SIMON C, FRANCESCO F, ANDREW B, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Ent Soc Am*, 1994, 87(6): 651-701.

【责任编辑 周志红】