

扬眉线蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析

王菊平^{1,2}, 曹天文^{1,2,*}, 张越^{2,3}, 范仁俊^{1,2},
张苗^{1,2}, 石保明^{1,2}, 彭福成^{1,2}

(1. 山西省农业科学院植物保护研究所, 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031;
2. 山西省昆虫资源共享服务平台, 太原 030031; 3. 山西省农业种子总站, 太原 030006)

摘要:【目的】了解扬眉线蛱蝶 *Limenitis helmanni* 线粒体基因组结构及其分子系统发育。【方法】采用 PCR 步移法对扬眉线蛱蝶线粒体基因组全序列进行测定和分析。基于线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因的核苷酸序列构建了 66 种鳞翅目昆虫的系统发育树。【结果】扬眉线蛱蝶线粒体基因组全长 15 178 bp (GenBank 登录号: KY290566), 包括 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和一段长度为 346 bp 的 A + T 富含区, 基因排列顺序与其他已知近缘种昆虫相同。扬眉线蛱蝶线粒体基因组中存在很高的 A + T 含量 (81.1%)。13 个蛋白质编码基因中, *COI* 以 CGA 作为起始密码子, *ND5* 以 GTT 作为起始密码子, 其余均以昆虫典型的 ATN 为起始密码子。*COII* 和 *ND4* 基因使用了不完全终止密码子 T, 其余基因均以典型的 TAA 为终止密码子。在所测得的 22 个 tRNA 基因中, 除 tRNA^{Ser(AGN)} 缺少 DHU 臂外, 其余 tRNA 均能形成典型的三叶草结构。与其他多数鳞翅目昆虫一样, 扬眉线蛱蝶的 A + T 富含区中有一段由 ATAGA 引导的保守的多聚 T 结构, 长度为 20 bp, 并散布着一些长短不一的串联重复单元。系统发育树结果显示, 蛱蝶科亚科级别的系统发育关系为: (绢蛱蝶亚科 + 眼蛱蝶亚科) + ((蛱蝶亚科 + 闪蛱蝶亚科) + (釉蛱蝶亚科 + 线蛱蝶亚科))。【结论】线蛱蝶族与翠蛱蝶族的亲缘关系较近, 丽蛱蝶族是该亚科较早分化出来的一支。基于线粒体基因组构建的线蛱蝶亚科物种系统发育关系与传统形态分类学研究结论不一致。

关键词: 鳞翅目; 蛱蝶科; 扬眉线蛱蝶; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)08-0950-12

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Limenitis helmanni* (Lepidoptera: Nymphalidae)

WANG Ju-Ping^{1,2}, CAO Tian-Wen^{1,2,*}, ZHANG Yue^{2,3}, FAN Ren-Jun^{1,2}, ZHANG Miao^{1,2}, SHI Bao-Ming^{1,2}, PENG Fu-Cheng^{1,2} (1. Shanxi Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; 2. Shanxi Insect Information Infrastructure, Taiyuan 030031, China; 3. Shanxi Agricultural Seed Station, Taiyuan 030031, China)

Abstract: 【Aim】To explore the complete mitochondrial genome structure and molecular phylogenetics of *Limenitis helmanni*. 【Methods】The complete mitochondrial genome of *L. helmanni* was sequenced and analyzed by using PCR and primer walking. Based on the sequences of 13 protein-coding genes and two rRNA genes of the mitochondrial genome, the phylogenetic tree of 66 lepidopteran species were constructed with Bayesian inference method. 【Results】The complete mitochondrial genome of *L. helmanni* is a circular molecule of 15 178 bp (GenBank accession no.: KY290566), including 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and a 346 bp A + T-rich region. The mitogenomic gene arrangement is consistent with those of other closely related species. The mitochondrial genome of *L.*

基金项目: 山西省农业科学院农业科技创新研究项目 (ZDSYS1509); 山西省应用基础研究项目 (201601D202059, 2011011033-2); 山西省科技重大专项 (20121101007)

作者简介: 王菊平, 女, 1976 年 11 月生, 山西长治人, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为昆虫分子系统学, E-mail: jp76@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ctwen@126.com

收稿日期 Received: 2017-03-17; 接受日期 Accepted: 2017-06-12

helmanni is biased toward a high A + T content (81.1%). All protein-coding genes start with a typical ATN initiation codon, except that *COI* starts with the CGA codon and *ND5* with the GTT codon. Most of the 13 PCGs have a complete termination codon (TAA), except *COII* and *ND4* genes which have incomplete stop codons (T). All tRNA genes show the classic clover-leaf structure, except that the dihydrouridine (DHU) arm of tRNA^{Ser(AGN)} forms a simple loop. The A + T-rich region of *L. helmanni* contains some conserved structures such as the motif ATAGA, 20 bp poly(T) stretch and some tandem repeat units, which is similar to those of other related lepidopteran species. Bayesian phylogenetic analyses supported that the relationship of Nymphalidae subfamilies is (Calinaginae + Satyrinae) + ((Nymphalinae + Apaturinae) + (Heliconiinae + Limenitidinae)). 【Conclusion】Limenitini is closely related with the Euthaliini, and Parthenini may be the earliest diverged lineage in Limenitidinae. The phylogenetic relationship of Limenitidinae species based on the mitochondrial genome is not consistent with the results of the traditional morphology-based taxonomy.

Key words: Lepidoptera; Nymphalidae; *Limenitis helmanni*; mitochondrial genome; phylogeny

线粒体(mitochondrion)是广泛存在于各类真核生物细胞内的一种重要和独特的细胞器,是细胞进行氧化磷酸化的场所,并拥有独立的遗传物质——线粒体基因组(mitogenome)。线粒体基因组是核基因之外的遗传信息,能编码自身所需的蛋白质、tRNA 及 rRNA。动物线粒体基因组大多是一个共价闭合的环状双螺旋,在极个别生物中也发现有链状线粒体基因组的存在(Bridge *et al.*, 1992)。线粒体基因组大小为约 14 ~ 20 kb,因其结构简单、母系遗传、相对较快的进化速率等特点,近年来被广泛用于系统发育研究中(Ballard, 2000; Cameron *et al.*, 2007; 毛增辉等, 2010)。

随着 DNA 测序技术的成熟以及全线粒体基因组测序策略的不断发展,使得一些大标本分类单元的长 DNA 序列的测序成为可能。近年来,越来越多的鳞翅目昆虫线粒体全基因组被测序,采用线粒体全基因组数据进行系统发育研究已成为发展方向之一。根据 NCBI 基因组数据库,截至目前为止已提交的鳞翅目蛱蝶科线粒全基因组序列有 106 种,其中线蛱蝶亚科有 20 种。

线蛱蝶亚科是蛱蝶科中较大的亚科之一,包括许多农林重要害虫。按最新的分类研究结果,全世界共有 46 属 800 余种,中国有其中的 22 属共 118 种,约占世界总数的 1/8。该亚科在分类问题上一直存在着争议,不同学者对这一类群的分类归属意见不尽相同。在形态分类方面,不同的研究者认为该亚科可能是一个多系群或并系群;在系统学研究方面,该亚科内的族及一些属、种的归属也存在着争议,因此,获得更多线蛱蝶亚科物种的线粒体基因组序列显得颇为迫切。

扬眉线蛱蝶 *Limenitis helmanni* 隶属于鳞翅目

(Lepidoptera), 蛱蝶科(Nymphalidae), 线蛱蝶亚科(Limenitidinae), 线蛱蝶族(Limenitini), 在我国分布于黑龙江、山西、河南、陕西、甘肃、青海、新疆、湖北、江西、浙江、福建、四川等地。目前国内对扬眉线蛱蝶的研究仅有成虫形态及生境等方面的报道(周尧等, 1994, 1998), 尚未见到有关其线粒体基因组全序列的研究报道。

本研究通过引物步移法,测定了扬眉线蛱蝶的线粒体基因组序列,对其结构组成进行了初步分析,并与已报道的 20 种线蛱蝶亚科物种的线粒体基因组进行了比较分析,为澄清线蛱蝶亚科分类中存在的一些问题提供系统发育方面的依据,同时也为线粒体基因组序列在进化和系统发育分析中的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 标本的采集和保存

扬眉线蛱蝶 2016 年 7 月 6 日采自山西省榆次市庆城林场(37.59°N, 112.97°E, 海拔 1 028 m),采集到的昆虫活体放入 95% 的酒精中固定,同时回到实验室后更换一次酒精,最后置于 -20℃ 冰箱保存备用(样品号: YM20160706)。

1.2 基因组 DNA 提取

挑选备用的蝴蝶标本,取其胸部肌肉,采用 OMEGA Insect DNA Kit 试剂盒结合酚氯仿法提取样品总 DNA,抽提完毕后,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及浓度,并于 -20℃ 保存备用。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

参考 Simon 等(2006)的线粒体通用引物序列和目前已发表的鳞翅目蛱蝶科的猫蛱蝶 *Timelaea*

maculata 和黑紫蛱蝶 *Sasakia funebris* 的引物(曹天文等, 2013; Wang *et al.*, 2013)进行首轮扩增。其他未能得到的序列通过在 GenBank 中下载虬眉带蛱蝶 *Athyma opalina*、珠履带蛱蝶 *Athyma asura* 和丫纹俳蛱蝶 *Parasarpa dudu* 线粒体基因组序列进行 ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) 对比寻找相关保守区, 根据引物设计的基本原则(张新宇和高燕宁, 2004), 利用引物设计软件 Primer Premier (Ver. 5.0) (Singh *et al.*, 1998) 设计相关引物。本实验共用引物 23 对, 覆盖了扬眉线蛱蝶线粒体基因组所有序列(表 1)。

按照引物序列, 采用 TaKaRa La Taq 聚合酶扩增各个片段。PCR 反应体系为 25 μL : 10 \times LA PCR Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , TaKaRa LA Taq 酶(5 U/ μL) 0.25 μL , 灭菌水补足至 25 μL 。少数引物在进行 PCR 扩增反应时对模板 DNA 和引物的量作适当调整。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 复性 50 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 序列测定

目的 PCR 扩增产物通过直接测序法获得目的片段信息。所有片段均为双向测通, 其中第 14 和 16 对引物为本研究根据已经测得的序列片段设计的引物。

1.5 序列的拼接与注释

得到所有序列片段测序结果后, 利用 Sequencher 5.4.1 (Gene Codes Corporation, 2015) 软件对所有序列进行拼接。线粒体全基因组各基因的定位及注释参考已测得的鳞翅目昆虫全线粒体基因组注释结果(Zhang *et al.*, 2012; 王菊平等, 2012; Cao *et al.*, 2016) 进行, 通过 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 比对以及 Blast 在线搜索分析相结合来依次注释蛋白质编码基因 (protein-coding genes, PCGs)、tRNA 基因、rRNA 基因和控制区的位置。tRNA 基因二级结构的预测主要是通过 tRNAscanSE 1.21 在线预测并进行人工校正。

1.6 系统发育分析

基于 66 种鳞翅目昆虫全线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因的核苷酸序列建立贝叶斯树, 并选择了与鳞翅目关系较近的果蝇 *Drosophila yakuba* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 作为外群。将 66 种鳞翅目昆虫和 2 个外群线粒体

基因组中的 13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因序列通过 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 软件进行序列比对后串联在一起, 之后采用贝叶斯法 (Bayesian inference method, BI) 构建系统发育树并进行分析。所用软件为 MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), 模型为 GTR + I + G, 数据集由基因分区, 节点值表示贝叶斯后验概率 (Bayesian posterior probabilities, PP), 用 2 000 000 代来估算各节点的值, 其参数如下: nruns = 2, nchains = 4, samplefreq = 1 000, 其中抽样的 25% 划为老化样本, 舍去。

2 结果

2.1 扬眉线蛱蝶线粒体基因组结构

扬眉线蛱蝶的线粒体基因组全长为 15 178 bp (GenBank 登录号: KY290566), 由 22 个 tRNA 基因、13 个蛋白质编码基因、2 个 rRNA 基因 (16S *rnnL* 和 12S *rnnS*) 和 1 个非编码的控制区 (control region) 组成。在线粒体基因组编码的 37 个基因中, N 链 (minor coding strand) 编码了 14 个基因, 包括 4 个蛋白质编码基因, 8 个 tRNA 基因及 2 个 rRNA 基因; 其余 23 个基因由 J 链 (major coding strand) 编码。*rnnS* 基因和 tRNA^{Met} 基因之间 346 bp 确定为控制区。

在扬眉线蛱蝶线粒体基因组整个编码区的 37 个基因中 (控制区除外), 相邻基因之间存在基因间隔或基因重叠现象。基因间隔区有 13 处, 共 122 bp, tRNA^{Gln} 和 *ND2* 之间间隔最长为 52 bp, 其次是 tRNA^{Ser(AGN)} 和 tRNA^{Glu} 之间, 间隔 30 bp; 有 15 处基因重叠, 共 62 bp, 最长一处位于 tRNA^{Phe} 和 *ND5* 之间, 重叠序列为 26 bp; 既无间隔又无重叠的区域共有 9 处 (表 2)。扬眉线蛱蝶的基因结构及基因顺序见图 1 及表 2。

2.2 扬眉线蛱蝶线粒体基因组核苷酸组成

扬眉线蛱蝶线粒体基因组中 A, T, C 和 G 碱基含量分别为 38.8%, 42.3%, 11.3% 和 7.6%, T 含量最高而 G 含量最低。A + T 含量为 81.1%, G + C 含量为 18.9% (表 3)。

蛋白质编码基因总共含 3 735 个密码子, 不包含终止密码子, A + T 含量为 79.9%, 比全序列的 A + T 含量稍低。蛋白质编码基因密码子第 1 位点的 A + T 含量 (82.1%) 高于第 2 位点 (78.9%) 和第 3 位点 (78.6%)。22 个 tRNA 基因 A + T 含量为

表 1 本研究使用的引物序列
Table 1 PCR primers used in this study

序号 No.	引物 Primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	引物来源 Source of primers
1	TMJ-210	ATAAAAGCTTTTGGGCTCATACT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	TY-N1433	GGCTGAATAATAAGCGATAAATTGTAAA	Simon <i>et al.</i> , 2006
2	TW-J1301	GTAAAWTAACTAATARTCTTCAAA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C1-N2353	GCTCGTGTATCAATATCTATWCC	Simon <i>et al.</i> , 2006
3	C1-J2195	TGATTTTTGGWCATCCWGAAGT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C1-N2776	GATAATCTGAATATCGWCGNGG	Simon <i>et al.</i> , 2006
4	C1-J2756	ACATTTTTCCACARCAAYTT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C2-N3389	TATTCATARCTTCARTATCATTG	Simon <i>et al.</i> , 2006
5	TL2-J3043	GGCAGACTATATGYAATGRATTTAA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	TK-N3796	ACTATAAAATGGTTTAAAGAG	Simon <i>et al.</i> , 2006
6	C2-J3624	AATCCAGGTCGATTAAYCA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	A6-N4552	ATGTCCWGCATTTATGTTWGC	Simon <i>et al.</i> , 2006
7	A6-J4463	TTTATTCATATWATWCCNCAAGG	Simon <i>et al.</i> , 2006
	C3-N4908	CGTAAAYATCTCGTCATCATTG	Simon <i>et al.</i> , 2006
8	C3-J4792	GTAGATTATAGACCWTRGCC	Wang <i>et al.</i> , 2013
	N3-N5731	TTGGATCAAACCCRCAYTC	Wang <i>et al.</i> , 2013
9	N3-J5747	CCATTTGAATGTGGRTTGTAYCC	曹天文等, 2013
	TF-N6384	ATATTATAGAGYTTTRAYAYTGAAG	曹天文等, 2013
10	TN-J6172	AGAGGTATATCACTGTTAATGA	曹天文等, 2013
	N5-N7211	TTAAAGCTTTAYTATTTATRTGYGC	曹天文等, 2013
11	N5-J7077	TTAAATCTTTWGARTAAAYCC	曹天文等, 2013
	N5-N7793	TTGGGTTGRGATGGNYTAGG	曹天文等, 2013
12	N5-J7572	AAAAGGAATTTGAGCACTTTTWT	Wang <i>et al.</i> , 2013
	N4-N8727	AAATCTTTRATTGCTTATTCWTC	Wang <i>et al.</i> , 2013
13	N4-J8641	CCAGAAGAACATAANCCRTG	Wang <i>et al.</i> , 2013
	N4L-N9629	GTTTGTGAAGGWYTTTTRGG	Wang <i>et al.</i> , 2013
14	N4-J9611	ATCATTCCCATGAGTTCCG	本研究 This study
	CB-N100049	CTATTGCAAGAGGATGATTA	本研究 This study
15	N4L-J9648	ACCTAAAGAACCCTTCACAWAC	Simon <i>et al.</i> , 2006
	CB-N11010	TATCTACAGCRAATCCYCCYCA	Simon <i>et al.</i> , 2006
16	CB-J10712	TATTTACATATTTGGACGAGG	本研究 This study
	CB-N11861	TGGATTTAATGTTGAATATGGAG	本研究 This study
17	CB-J11335	CATATTCAACCCGAATGRTA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	N1-N12067	AATCGWACTCCWTTTGATTTTGC	Simon <i>et al.</i> , 2006
18	N1-J11876	CGAGGTAAAGTMCCWCGAACYCA	Simon <i>et al.</i> , 2006
	N1-N12595	GTWGCCTTTTTGACTTTATTRGARCG	Simon <i>et al.</i> , 2006
19	N1-J12261	TACTTCATAAGAAATAGTYTGRGC	Simon <i>et al.</i> , 2006
	LR-N13000	TTACCTTAGGGATAACAGCGTAA	Simon <i>et al.</i> , 2006
20	LR-J12888	CCGGTTTGAACCTCARATCATGTA	Wang <i>et al.</i> , 2013
	LR-N13889	ATTTATTGTATCTFKTGTATCAG	Wang <i>et al.</i> , 2013
21	LR-J13342	CCTTTGTACRGTCAAAATACYGC	Simon <i>et al.</i> , 2006
	SR-N14220	ATATGYACAYATTGCCCGTC	Simon <i>et al.</i> , 2006
22	LR-J13900	TTTAATAAACCYCTGATACAMAAG	Simon <i>et al.</i> , 2006
	SR-N14745	GTGCCAGCAGYYGCGGTTANAC	Simon <i>et al.</i> , 2006
23	SR-J14610	ATAATAGGCTATCTAATCCTAGT	Simon <i>et al.</i> , 2006
	TM-N200	TCCTTTATATRTGAGGTATGARCC	Simon <i>et al.</i> , 2006

表 2 扬眉线蛱蝶线粒体基因组注释

Table 2 Organization of the mitochondrial genome of *Limnitis helmanni*

基因 Gene	方向 Direction	位置 (nt) Position	大小 (bp) Size	基因间的间隔 (bp) * Intergenic length	反密码子 Anticodon	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon
tRNA ^{Met}	F	1 - 67	67		CAT		
tRNA ^{Ile}	F	71 - 135	65	3	GAT		
tRNA ^{Gln}	R	133 - 201	69	-3	TTG		
<i>ND2</i>	F	254 - 1 264	1 011	52		ATT	TAA
tRNA ^{Trp}	F	1 263 - 1 330	68	-2	TCA		
tRNA ^{Cys}	R	1 323 - 1 383	61	-8	GCA		
tRNA ^{Tyr}	R	1 387 - 1 452	65	3	GTA		
<i>COI</i>	F	1 456 - 2 991	1 536	3		CGA	TAA
tRNA ^{Leu(UUR)}	F	2 987 - 3 053	67	-5	TAA		
<i>COII</i>	F	3 055 - 3 733	679	1		ATG	T-tRNA
tRNA ^{Lys}	F	3 734 - 3 804	71	0	CTT		
tRNA ^{Asp}	F	3 811 - 3 876	66	6	GTC		
<i>ATP8</i>	F	3 877 - 4 044	168	0		ATT	TAA
<i>ATP6</i>	F	4 038 - 4 715	678	7		ATG	TAA
<i>COIII</i>	F	4 719 - 5 507	789	3		ATG	TAA
tRNA ^{Gly}	F	5 510 - 5 576	67	2	TCC		
<i>ND3</i>	F	5 574 - 5 930	357	-3		ATA	TAA
tRNA ^{Ala}	F	5 930 - 5 994	65	-1	TGC		
tRNA ^{Arg}	F	5 994 - 6 055	62	-1	TCG		
tRNA ^{Asn}	F	6 056 - 6 122	67	0	GTT		
tRNA ^{Ser(AGN)}	F	6 121 - 6 181	61	-2	GCT		
tRNA ^{Glu}	F	6 212 - 6 279	68	30	TTC		
tRNA ^{Phe}	R	6 278 - 6 341	64	-2	GAA		
<i>ND5</i>	R	6 316 - 8 076	1 761	-26		GTT	TAA
tRNA ^{His}	R	8 074 - 8 141	68	-3	GTG		
<i>ND4</i>	R	8 142 - 9 480	1 339	0		ATG	T-tRNA
<i>ND4L</i>	R	9 480 - 9 764	285	-1		ATG	TAA
tRNA ^{Thr}	F	9 774 - 9 838	65	9	TGT		
tRNA ^{Pro}	R	9 839 - 9 902	64	0	TGG		
<i>ND6</i>	F	9 905 - 10 432	528	2		ATT	TAA
<i>CytB</i>	F	10 432 - 11 583	1 152	-1		ATG	TAA
tRNA ^{Ser(UCN)}	F	11 582 - 11 646	65	-2	TGA		
<i>ND1</i>	R	11 645 - 12 601	957	-2		ATG	TAA
tRNA ^{Leu(CUN)}	R	12 603 - 12 670	68	1	TAG		
lrRNA	R	12 671 - 13 987	1 317	0			
tRNA ^{Val}	R	13 988 - 14 053	66	0	TAC		
srRNA	R	14 054 - 14 832	779	0			
控制区 Control region		14 833 - 15 178	346	0			

* 基因间的间隔一列中,正数表示基因间隔碱基数,负数表示基因重叠碱基数。* In the column of intergenic length, the positive number indicates interval base pairs between genes, while the negative indicates the overlapping base pairs between genes.



图 1 扬眉线蛱蝶线粒体基因组结构

Fig. 1 Structure of the mitochondrial genome of *Limenitis helmanni*

顺时针方向的箭头表示基因在 J 链上编码, 逆时针方向的箭头表示在 N 链上编码; 填充的颜色框表示不同的 tRNA 基因, 用对应的氨基酸单字母表示; 未填充颜色的白色框分别表示蛋白质编码基因、rRNA 基因和控制区。The clockwise arrows indicate that the genes are located on the J-strand, the counterclockwise arrows indicate that the genes are located on the N-strand. The color-filled blocks denote tRNA genes, which are indicated by one-letter amino acid code of the corresponding amino acid. The white blocks denote protein-coding genes, rRNA genes and the control region, respectively.

81.5%, *rrnL* 基因的 A + T 含量为 84.5%, *rrnS* 基因的 A + T 含量为 85.1%, 控制区的 A + T 含量最高

为 94.3% (表 3)。

扬眉线蛱蝶线粒体基因组与其他鳞翅目昆虫一样, 也具有很高的 A + T 含量, 与线蛱蝶亚科已知的近缘种相比, 其 A + T 含量居中, 其中苏带蛱蝶 *Athyma sulphitia* 最高 (82.0%), 耙蛱蝶 *Bhagadatta austenia* 最低 (79.3%) (Wu *et al.*, 2014) (表 4)。13 个蛋白质编码基因的 A + T 含量中, 扬眉线蛱蝶 *L. helmanni* 较高, 与绿裙玳蛱蝶 *Tanaecia julii* (79.9%)、红裙边翠蛱蝶 *Euthalia irrubescens* (79.9%) 相同, 略低于苏带蛱蝶 *A. sulphitia* (80.7%)、潘迪蛱蝶 *Pandita sinope* (80.2%)、黑角律蛱蝶 *Lexias dirtea* (80.1%) 和新月带蛱蝶 *Athyma selenophora* (80.0%), 略高于其余 14 种, 其中耙蛱蝶 *B. austenia* 最低, 为 77.1%。分析结果符合昆虫线粒体基因组中 A + T 含量偏向性的特征 (Tzeng *et al.*, 1992; Lee and Kocher, 1995; Noack *et al.*, 1996)。

2.3 扬眉线蛱蝶线粒体基因组蛋白质编码基因密码子使用

扬眉线蛱蝶 13 个蛋白质编码基因的排列顺序与其他已知鳞翅目昆虫的基因排列顺序一致 (Kim *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016a, 2016b)。13 个蛋白质编码基因的起始密码子中, *COI* 以 CGA 作为起始密码子, *ND5* 以 GTT 作为起始密码子, *ND3* 以 ATA 作为起始密码子, *ND2*, *ATP8* 和 *ND6* 以 ATT 作为起始密码子, *COII*, *ATP6*, *COIII*, *ND4*, *ND4L*, *CytB* 和 *ND1* 以 ATG 作为起始密码子。所使用的终止密码子中, *COII* 和 *ND4* 以单独的 T 作为终止密码子, 其余均以 TAA 作为终止密码子 (表 2)。

表 3 扬眉线蛱蝶线粒体基因组核苷酸组成

Table 3 Nucleotide composition of the complete mitochondrial genome of *Limenitis helmanni*

基因序列 Gene sequences	大小(bp) Size	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A + T (%)	G + C (%)
全基因组 Whole genome	15 178	38.8	42.3	7.6	11.3	81.1	18.9
蛋白质编码基因 Protein-coding genes	11 240	33.6	46.3	10.2	9.9	79.9	20.1
密码子第 1 位 1st codon site	3 735	35.1	47.0	9.3	8.6	82.1	17.9
密码子第 2 位 2nd codon site	3 735	34.9	44	10.6	10.7	78.9	21.3
密码子第 3 位 3rd codon site	3 735	30.6	48.0	10.7	10.5	78.6	21.2
tRNA	1 456	41.6	39.9	10.8	7.8	81.5	18.6
<i>rrnL</i> (16S rRNA)	1 317	45.8	38.7	10.4	5.1	84.5	15.5
<i>rrnS</i> (12S rRNA)	779	44.9	40.2	9.9	5.0	85.1	14.9
控制区 Control region	346	43.1	51.2	2.3	3.5	94.3	5.8

表 4 线蛭亚科 21 个近缘物种线粒体基因组核苷酸组成

Table 4 Nucleotide composition of 21 closely related species of Limenitidinae

物种 Species	全基因组 Whole genome		蛋白质编码基因 Protein-coding genes		<i>rmlL</i>		<i>rmlS</i>		A + T 富含区 A + T-rich region		GenBank 登录号 GenBank accession no.
	A + T (%)	密码子个数 ^a Number of codons	A + T (%)	大小(bp) Size	A + T (%)	大小(bp) Size	A + T (%)	大小(bp) Size	A + T (%)	大小(bp) Size	
	大小(bp) Size		大小(bp) Size		大小(bp) Size		大小(bp) Size		大小(bp) Size		
扬眉线蛭 <i>Limenitis helmanni</i>	81.1	3 735	79.9	1 317	84.5	779	85.1	346	94.3		KY290566
珠履带蛭 <i>Athyma astura</i>	81.1	3 721	79.8	1 321	84.5	779	85.6	283	93.6		NC_024410
虬眉带蛭 <i>Athyma opalina</i>	80.1	3 720	78.6	1 324	84.1	780	85.2	288	94.4		NC_024418
苏带蛭 <i>Athyma subpita</i>	82.0	3 732	80.7	1 319	84.7	779	85.7	349	94.6		NC_017744
玄珠带蛭 <i>Athyma perius</i>	80.0	3 724	78.6	1 328	85.3	782	85.2	-	-		NC_024397
双色带蛭 <i>Athyma cama</i>	80.6	3 719	79.1	1 326	84.6	779	85.3	428	94.6		NC_024395
新月带蛭 <i>Athyma selenophora</i>	81.3	3 722	80.0	1 324	85.0	782	85.7	356	94.6		NC_024393
白斑带蛭 <i>Athyma kasa</i>	80.3	3 720	78.7	1 321	84.8	780	84.9	347	94.9		NC_024394
婀蛭 <i>Abrata ganga</i>	81.2	3 719	79.8	1 314	84.8	777	85.4	546	93.2		NC_024404
耙蛭 <i>Bhagadatta austenia</i>	79.3	3 745	77.1	1 418	83.8	780	84.0	382	94.5		NC_024413
丫纹蛭 <i>Parasarpa dudu</i>	81.1	3 720	79.6	1 322	85.2	779	85.6	278	95.0		NC_024405
金蟠蛭 <i>Pantoporia hordonia</i>	80.7	3 712	78.7	1 315	84.1	783	85.7	799	96.2		NC_024402
绿蛭 <i>Dophla evelina</i>	81.0	3 721	79.4	1 327	84.6	778	85.6	388	95.4		NC_024400
黑角线蛭 <i>Lexias dirtea</i>	81.3	3 722	80.1	1 320	84.6	778	85.1	433	95.6		NC_024399
潘迪蛭 <i>Pandita sinope</i>	81.4	3 723	80.2	1 330	84.7	784	85.1	276	96.8		NC_024398
丽蛭 <i>Parthenos sylvia</i>	81.1	3 732	79.7	1 316	84.1	779	84.7	383	94.3		NC_024417
绿裙玳蛭 <i>Tanaecia julii</i>	81.3	3 661	79.9	1 315	84.8	780	85.4	389	92.1		NC_024416
红裙边翠蛭 <i>Euthalia irubescens</i>	81.3	3 721	79.9	1 327	84.6	781	84.8	395	94.2		NC_024396
娑环蛭 <i>Neptis soma</i>	79.9	3 709	78.6	1 317	84.1	777	84.8	329	91.5		NC_024401
珂环蛭 <i>Neptis clinia</i>	80.3	3 701	78.6	1 359	84.4	776	84.8	623	88.4		NC_025759
啡环蛭 <i>Neptis philyra</i>	80.2	3 709	78.7	1 315	84.1	780	85.2	343	92.4		NC_024419

^a在总的密码子计算中没有包括终止密码子 Termination codons were excluded in total codon count.

全部蛋白质编码基因的密码子和氨基酸使用情况的统计分析显示,使用最频繁的氨基酸为 Leu, Ile, Phe, Asn 和 Met,使用最频繁的密码子为 TTA, ATT, TTT, AAT 和 ATA,反映了核苷酸组成的 AT 偏好性。对于检测到的 tRNA 基因,使用最频繁的氨基酸并不总是与 tRNA 的反密码子对应的。

2.4 扬眉线蛱蝶线粒体基因组 tRNA 基因和 rRNA 基因

根据 tRNAScan-SE 预测结果,并辅助人工校正的方法预测出扬眉线蛱蝶线粒体的 22 个 tRNA 结构。扬眉线蛱蝶 22 个线粒体 tRNA 中,除 tRNA^{Leu}和 tRNA^{Ser}所对应的 tRNA 有 2 个以外,其他的氨基酸都只有 1 个 tRNA 与之对应。除了 tRNA^{Ser(AGN)}缺少 DHU 臂外,其余 21 个 tRNA 均可形成典型的三叶草结构。

扬眉线蛱蝶线粒体基因组中 22 个 tRNA 基因的排列顺序与其近缘种昆虫的相同,基因长度在 61 ~ 71 bp 之间。每种 tRNA 的反密码子都与已知蛱蝶科物种的反密码子相同(Zhang *et al.*, 2012; 王菊平等, 2015; Wang *et al.*, 2016a)。tRNA 的二级结构也与已知蛱蝶科物种非常类似,这种现象与许多后生动物相一致(Liao *et al.*, 2010)。

在所预测的 22 种 tRNA 二级结构中总共出现了 18 对碱基错配,其中有 17 对为 GU 错配,其余 1 对为 GA 错配。GA 错配发生在 tRNA^{Leu(CUN)}的 DHU 臂上。与之相比较的 20 种近缘种的 tRNA 二级结构均含有 G = U 和 U = U 等非经典配对,这种错配现象在鳞翅目之外的许多昆虫类群中也有发现(Bae *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2009)。

rRNA 基因是线粒体基因组中进化最慢、最为保守的基因,仅根据核苷酸序列无法精确定位 rRNA 基因的起始位置,因此通常被认为伸达两侧基因的

边界(Boore, 2006)。rRNA 位于 tRNA^{Leu(CUN)}和 tRNA^{Val}之间,rRNA 位于 tRNA^{Val}和控制区之间,长度分别是 1 317 和 779 bp,A + T 含量分别为 84.5% 和 85.1% (表 4)。与其近缘种相比,耙蛱蝶 *B. austenia* 的 rRNA 长度最长,为 1 418 bp,其余均在 1 314 ~ 1 359 bp 之间。rRNA 长度差别较小,在 776 ~ 784 bp 之间(表 4)。表 4 中的 21 个物种中,玄珠带蛱蝶 *Athyma perius* 的 rRNA 基因 A + T 含量最高,为 85.3%,苏带蛱蝶 *A. sulphitia*、新月带蛱蝶 *A. selenophora* 和金蟠蛱蝶 *P. hordonia* 的 rRNA 基因 A + T 含量最高,为 85.7%,而耙蛱蝶 *B. austenia* 的 rRNA 和 rRNA 基因 A + T 含量均最低,分别为 83.8% 和 84.0%。

2.5 扬眉线蛱蝶线粒体基因组控制区

控制区是后生动物线粒体基因组中的一段非编码区,由于其富含 A 和 T 碱基,又称为 A + T 富含区(Zhang and Hewitt, 1997)。控制区为线粒体基因组主要的非编码区,在线粒体基因组中的位置比较保守。扬眉线蛱蝶 A + T 富含区位于 rRNA 基因和 tRNA^{Met} 基因之间,长度为 346 bp,A + T 含量为 94.3%。相比较的 21 个近缘物种的控制区长度有明显差异,其中金蟠蛱蝶 *Pantoporia hordonia* 最长,为 799 bp,潘迪蛱蝶 *Pandita sinope* 最短,为 276 bp,相差 523 bp;而 A + T 含量则潘迪蛱蝶 *P. sinope* 最高,为 96.8%,珂环蛱蝶 *Neptis clinia* 最低,为 88.4%,相差较小,且除珂环蛱蝶 *N. clinia* 以外,其余几种近缘种的 A + T 含量均在 90.0% 以上(表 4)。

扬眉线蛱蝶在 rRNA 基因的下流有一段由 ATAGA 引导的保守的长度为 20 bp 的多聚 T 结构。此外,在扬眉线蛱蝶线粒体 A + T 富含区中存在 2 段长度为 13 bp 的重复单元,2 个似微卫星结构 (AT)₇ 和 (AT)₆ (图 2)。

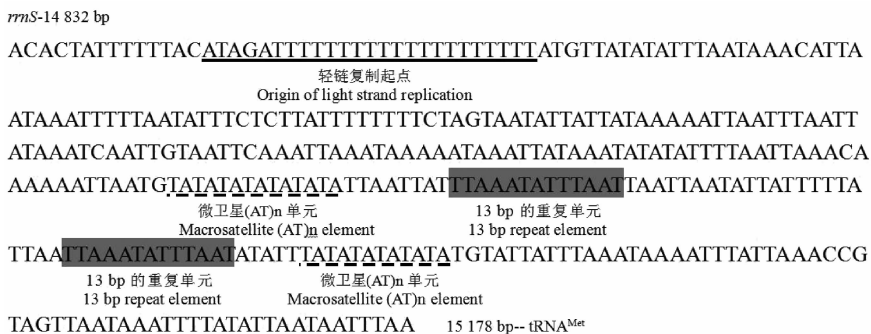


图 2 扬眉线蛱蝶线粒体基因组 A + T 富含区结构

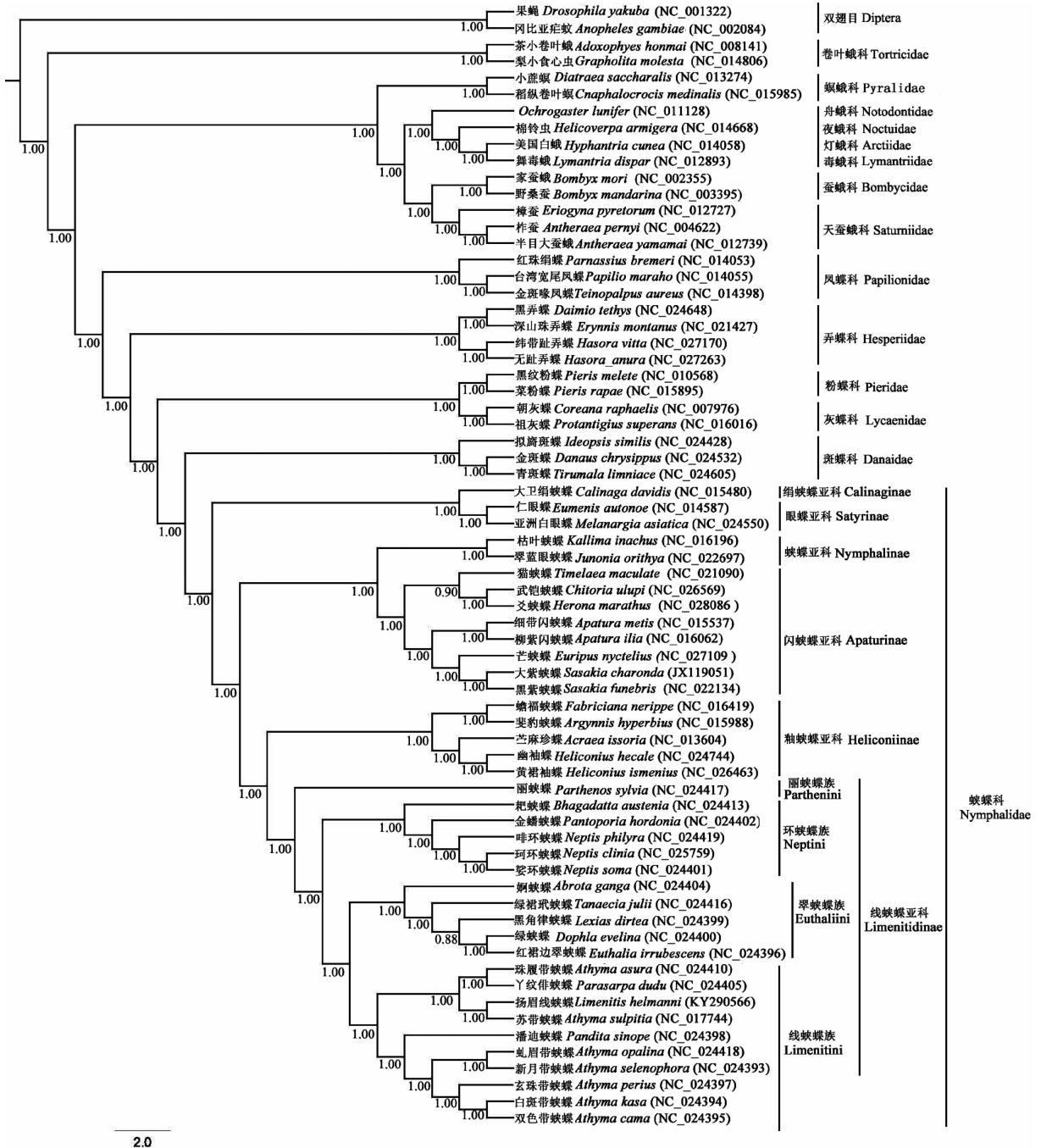
Fig. 2 Structure of the A + T-rich region of the mitochondrial genome of *Limenitis helmanni*

2.6 扬眉线蛱蝶与鳞翅目其他种线粒体基因组的系统发育关系

以冈比亚按蚊 *A. gambiae* 和果蝇 *D. yakuba* 作为外群,基于 66 种鳞翅目昆虫全线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因的第 1 和第 2 密码子以及 2 个 rRNA 基因的核苷酸序列建立贝叶斯树。结果显

示蛱蝶科亚科级别的系统发育关系为:(绢蛱蝶亚科 Calinaginae + 眼蝶亚科 Satyrinae) + ((蛱蝶亚科 Nymphalinae + 闪蛱蝶亚科 Apaturinae) + (釉蛱蝶亚科 Heliconiinae + 线蛱蝶亚科 Limenitidinae))。

线蛱蝶亚科 21 个物种分为 4 簇:丽蛱蝶 *Parthenos sylvia* 先单独成 1 簇;第 2 簇:耙蛱蝶



2.0

图3 基于 66 种鳞翅目昆虫线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因的第 1 和第 2 密码子以及 2 个 rRNA 基因核苷酸序列的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree based on the 1st and 2nd codons of 13 protein-coding genes and two rRNA genes of the mitochondrial genome sequences of 66 lepidopteran species. The nodal values indicate the Bayesian posterior probabilities (PP).

Bhagadatta austenia + (金蟠蛱蝶 *Pantoporia hordonia* + (啡环蛱蝶 *Neptis philyra* + (珂环蛱蝶 *Neptis clinia* + 娑环蛱蝶 *Neptis soma*))); 第 3 簇: 婀蛱蝶 *Abrota ganga* + (绿裙玳蛱蝶 *Tanaecia julii* + (黑角律蛱蝶 *Lexias dirtea* + (绿蛱蝶 *Dophla evelina* + 红裙边翠蛱蝶 *Euthalia irrubescens*))); 第 4 簇, 又分为 2 小簇: 第 1 小簇: (珠履带蛱蝶 *Athyma asura* + 丫纹俳蛱蝶 *Parasarpa dudu*) + (扬眉线蛱蝶 *Limnitis helmanni* + 苏带蛱蝶 *Athyma sulphitia*); 第 2 小簇: 潘迪蛱蝶 *Pandita sinope* + ((虬眉带蛱蝶 *Athyma opalina* + 新月带蛱蝶 *Athyma selenophora*) + (玄珠带蛱蝶 *Athyma perius* + (白斑带蛱蝶 *Athyma kasa* + 双色带蛱蝶 *Athyma cama*)))。

3 讨论

扬眉线蛱蝶基因排列顺序与已知蛱蝶科昆虫的基因排列顺序一致 (Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016a; Xuan *et al.*, 2016)。其中 *trnM-trnI-trnQ* 的排列方式与假想昆虫祖先的排列方式 *trnI-trnQ-trnM* 不同 (Boore *et al.*, 1998), 但这种排列方式在鳞翅目昆虫中却非常典型。其线粒体基因组中 *rrnL* 位于 *tRNA^{Leu(CUN)}* 和 *tRNA^{Val}* 之间, *rrnS* 位于 *tRNA^{Val}* 和控制区之间, 这些都表明了蝶类线粒体基因组进化上的保守性。

在扬眉线蛱蝶线粒体基因组中, *COI* 基因起始密码子为 CGA, 这与已知的大多数鳞翅目昆虫是一致的。通常情况下, 在昆虫中物种的 *COI* 基因没有标准的起始密码子, *COI* 基因的起始密码子具有明显的多样性, 有 3 种四联体起始密码子 TTAG, ATAA 和 ATTA (Clary and Wolstenholme, 1983; De Bruijn, 1983; Kim *et al.*, 2006), 也有人认为 *COI* 基因的起始密码子为六联体起始密码子, 如玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 和亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 中 *COI* 基因的起始密码子为 TATTAG (Coates *et al.*, 2005), 家蚕 *Bombyx mori* 为 TTTTAG 等。本研究所比较的 21 个近缘物种 *COI* 基因的起始密码子均为 CGA。此外, 扬眉线蛱蝶 *ND5* 基因使用了 GTT 作为起始密码子, 而其余 20 个近缘种则均以 ATT 或 ATA 作为起始密码子 (Wu *et al.*, 2014)。在终止密码子上, 扬眉线蛱蝶 *COII* 和 *ND4* 以单独的 T 作为终止密码子, 而与之比较的 20 个近缘种中, 除丽蛱蝶 *Parthenos sylvia* 和苏带蛱蝶 *Athyma sulphitia* 的 *COII* 基因以 TAA 为终止密码子外, 其余均以单独的

T 作为终止密码子。ND4 基因则除绿裙玳蛱蝶 *T. julii* 以 TAG 为终止密码子外, 其余均以单独的 T 作为终止密码子。从起始密码子和终止密码子的使用情况也再一次验证了昆虫线粒体基因组中 A + T 含量偏向性的特征。

A + T 富含区在鳞翅目昆虫线粒体基因组中的位置比较保守, 位于 *rrnS* 基因和 *tRNA^{Met}* 基因之间, 但它的长度在各个物种中却变化很大。本文中金蟠蛱蝶 *P. hordonia* 的 A + T 富含区长度为 799 bp, 而潘迪蛱蝶 *P. sinope* 的 A + T 富含区长度仅为 276 bp, 相差 523 bp。在近缘种类之间 A + T 富含区的长度差异主要是由于串联重复拷贝的数目不同, 虽然也有插入和缺失的存在, 但影响相对较小 (Zhang and Hewitt, 1997)。

基于全线粒体基因组的 Bayesian 系统发育分析结果表明: 线蛱蝶亚科 21 个物种中, 线蛱蝶族 (Limnitiini) 首先与翠蛱蝶族 (Euthaliini) 相聚, 再与环蛱蝶族 (Neptini) 聚在一起, 最后与丽蛱蝶族 (Parthenini) 聚成一簇。由此可见, 线蛱蝶族 (Limnitiini) 与翠蛱蝶族 (Euthaliini) 的亲缘关系较近, 其次是环蛱蝶族 Neptini, 而丽蛱蝶族 Parthenini 是该亚科较早分化出来的一支。这一结果与 Wu 等 (2014) 的研究结论基本吻合。我国传统的形态分类系统将婀蛱蝶 *A. ganga* 和耙蛱蝶 *B. austenia* 划分为线蛱蝶族, 本研究结果显示, 耙蛱蝶 *B. austenia* 与环蛱蝶族物种金蟠蛱蝶 *P. hordonia*、啡环蛱蝶 *N. philyra*、珂环蛱蝶 *N. clinia* 和娑环蛱蝶 *N. soma* 聚成一簇; 婀蛱蝶 *A. ganga* 则和翠蛱蝶族的绿裙玳蛱蝶 *T. julii*、黑角律蛱蝶 *L. dirtea*、绿蛱蝶 *D. evelina* 和红裙边翠蛱蝶 *E. irrubescens* 聚为一簇。本研究结果与传统的形态分类学研究结论有所不同。

参考文献 (References)

- Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 978–985.
- Ballard JW, 2000. Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J. Mol. Evol.*, 51: 48–63.
- Boore JL, 2006. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus macromphalus* (Mollusca: Cephalopoda). *BMC Genomics*, 7: 182.
- Boore JL, Lavrov DV, Brown WM, 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 392: 667–668.
- Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R, Buss LW,

1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8750–8753.
- Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC, Whiting MF, 2007. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Syst. Entomol.*, 32: 40–59.
- Cao LM, Wang JP, Young JJ, Shiu MY, Yuan XQ, Liu JP, Cao TW, 2016. The complete mitochondrial genome of *Hasora vitta* (Butler, 1870) (Lepidoptera: Hesperidae). *Mitochondrial DNA*, 27(4): 3020–3021.
- Cao TW, Wang JP, Xuan SB, Zhang M, Guo YP, Ma EB, 2013. Analysis of complete mitochondrial genome of *Timelaea maculata* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Acta Zootaxon. Sin.*, 38(3): 468–475. [曹天文, 王菊平, 宣善滨, 张敏, 郭亚平, 马恩波, 2013. 猫蛱蝶线粒体基因组全序列分析. *动物分类学报*, 38(3): 468–475]
- Chen M, Tian LL, Shi QH, Cao TW, Hao JS, 2012. The complete mitogenome of the lesser purple emperor *Apatura ilia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Apaturinae) and comparison with other nymphalid butterflies. *Zool. Res.*, 33(2): 191–201.
- Chou I, 1994. Monograph of Chinese Butterflies. Henan Scientific and Technological Publishing House, Zhengzhou. 505–511. [周尧主编, 1994. 中国蝶类志. 郑州: 河南科学技术出版社. 505–511]
- Chou I, 1998. Classification and Identification of Chinese Butterflies. Henan Scientific and Technological Publishing House, Zhengzhou. 139–140. [周尧主编, 1998. 中国蝴蝶分类与鉴定. 郑州: 河南科学技术出版社. 139–140]
- Clary DO, Wolstenholme DR, 1983. Genes for cytochrome oxidase subunit I, URF2 and three tRNAs in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, 11: 6859–6872.
- Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, Lewis LC, 2005. Partial mitochondrial genome sequences of *Ostrinia nubilalis* and *Ostrinia furnicalis*. *Int. J. Biol. Sci.*, 1: 13–18.
- De Bruijn MHL, 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code. *Nature*, 304: 234–241.
- Gene Codes Corporation, 2015. Sequencher, Version 5. 4. 1. Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan.
- Hong GY, Jiang ST, Yu M, Yang Y, Li F, Xue FS, Wei ZJ, 2009. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the cabbage butterfly, *Artogeia melete* (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 41(6): 446–455.
- Kim I, Lee EM, Seol KY, Yun EY, Lee YB, Hwang JS, Jin BR, 2006. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Insect Mol. Biol.*, 15(2): 217–225.
- Kim MJ, Wan X, Kim KG, Hwang JS, Kim I, 2010. Complete nucleotide sequence and organization of the mitogenome of endangered *Eumenis autonoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Afr. J. Biotechnol.*, 9(5): 735–754.
- Lee WJ, Kocher TD, 1995. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. *Genetics*, 139: 873–887.
- Liao F, Wang L, Wu S, Li YP, Zhao L, Huang GM, Niu CJ, Liu YQ, Li MG, 2010. The complete mitochondrial genome of the fall webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). *Int. J. Biol. Sci.*, 6(2): 172–186.
- Mao ZH, Hao JS, Zhu GP, Hu J, Si MM, Zhu CD, 2010. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(11): 1295–1304. [毛增辉, 郝家胜, 朱国萍, 胡静, 司曼曼, 朱朝东, 2010. 菜粉蝶线粒体基因组的全序列测定和分析. *昆虫学报*, 53(11): 1295–1304]
- Noack K, Zardoya R, Meyer A, 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order. *Genetics*, 144: 1165–1180.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 545–579.
- Singh VK, Mangalam AK, Dwivedi S, Naik S, 1998. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *BioTechniques*, 24: 318–319.
- Song F, Cao TW, Cao LM, Li H, Wang JP, Xuan SB, 2016. The mitochondrial genome of the butterfly *Polyura schreiber* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mitochondrial DNA*, 27(5): 3691–3692.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876–4882.
- Tzeng CS, Hui CF, Shen SC, Huang PC, 1992. The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variations among vertebrates. *Nucleic Acids Res.*, 20(18): 4853–4858.
- Wang JP, Cao TW, Xuan SB, Wang H, Zhang M, Ma EB, 2013. The complete mitochondrial genome of *Sasakia funebris* (Leech) (Lepidoptera: Nymphalidae) and comparison with other Apaturinae insects. *Gene*, 526(2): 336–343.
- Wang JP, Nie XP, Cao TW, Zhang M, Guo YP, Ma EB, Zhang XN, 2012. Analysis of complete mitochondrial genome of *Sasakia charonda coreana* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Acta Zootaxon. Sin.*, 37(1): 1–9. [王菊平, 聂新平, 曹天文, 张敏, 郭亚平, 马恩波, 张小楠, 2012. 大紫蛱蝶线粒体基因组全序列分析.

- 动物分类学报, 37(1): 1-9]
- Wang JP, Xuan SB, Cao LM, Hao JS, Cao TW, 2016a. The complete mitochondrial genome of the butterfly *Herona marathus* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mitochondrial DNA*, 27(6): 4399-4400.
- Wang JP, Xuan SB, Zhang YP, Yang J, Cao TW, Ma NB, 2015. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Chitoria ulupi* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 319-328. [王菊平, 宣善滨, 张育平, 杨静, 曹天文, 马恩波, 2015. 武铠蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 58(3): 319-328]
- Wang JP, Young JJ, Xuan SB, Cao TW, Yuan XQ, 2016b. The complete mitochondrial genome of the butterfly *Hasora anura* (Lepidoptera: Hesperidae). *Mitochondrial DNA*, 27(6): 4401-4402.
- Wu LW, Lin LH, Lees DC, Hsu YF, 2014. Mitogenomic sequences effectively recover relationships within brush-footed butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *BMC Genomics*, 15: 468.
- Xuan SB, Song F, Cao LM, Wang JP, Li H, Cao TW, 2016. The complete mitochondrial genome of the butterfly *Euripus nyctelius* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mitochondrial DNA*, 27(4): 2563-2565.
- Zhang DX, Hewitt GM, 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.*, 25(2): 99-120.
- Zhang M, Nie XP, Cao TW, Wang JP, Li T, Zhang XN, Guo YP, Ma EB, Zhong Y, 2012. The complete mitochondrial genome of the butterfly *Apatura metis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Mol. Biol. Rep.*, 39: 6529-6536.
- Zhang XY, Gao YN, 2004. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5. *China J. Bioinform.*, 2(4): 15-18. [张新宇, 高燕宁, 2004. PCR 引物设计软件使用技巧. 生物信息学, 2(4): 15-18]

(责任编辑: 马丽萍)