

# 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

(鳞翅目: 蛱蝶科)

王戎疆, 万 宏, 龙 玉, 雷光春, 李绍文

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要:** 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。结果表明, 在尾蛱蝶属 5 个种的 12 个样品中, 405 bp 长的 COII 片段有 11.4% 的位点为多态性位点, 大部分的碱基改变是转换。各物种内不同个体间的差异明显小于不同物种间的差异, 种内个体间的差异一般为 0.5% ~ 1.5%, 各物种间的差异绝大多数在 4% 以上。利用最大似然性法构建的尾蛱蝶属聚类关系图显示, 尾蛱蝶属蝴蝶分为两大分支, 一支包括大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶, 另外一个分支包括窄斑凤尾蛱蝶和黑凤尾蛱蝶聚在一起。在大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶这一分支中, 大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的亲缘关系较近, 而二尾蛱蝶较远。这些分子系统学的结果均与形态学的结果相一致, 是对形态分类的有力支持。

**关键词:** 鳞翅目; 蛱蝶科; 尾蛱蝶; 线粒体 COII; 系统发育分析; 中国

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)02-0243-05

## Phylogenetic analysis of *Polyura* in China inferred from mitochondrial COII sequences (Lepidoptera: Nymphalidae)

WANG Rong-Jiang, WAN Hong, LONG Yu, LEI Guang-Chun, LI Shao-Wen (College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** Phylogenetic analysis of 5 Chinese species of the genus *Polyura* was conducted based on mitochondrial COII sequences. The results showed that there were 11.4% polymorphic loci in 405 bp length of partial COII in 12 specimens of the 5 species of *Polyura*, and most of them were transformed through transition. The difference among individuals within species (0.5% - 1.5%) was almost all lower than the difference among species (> 4%), except that the difference between 2 individuals of *P. athamas* was higher than that between *P. eudamippus* and *P. nepenthes*. The dendrogram of the Chinese *Polyura* inferred by maximum likelihood method showed that there are 2 distinct clusters in the Chinese *Polyura*, in which one includes *P. narcaea*, *P. eudamippus* and *P. nepenthes*, and the other includes *P. schreiber* and *P. athamas*. The topological structure of the dendrogram is consistent with the morphological result. Therefore, the results of molecular phylogenetic analysis support the morphological results in genus *Polyura*.

**Key words:** Lepidoptera; Nymphalidae; *Polyura*; mitochondrial COII; phylogenetic analysis; China

随着分子生物学的迅速发展, 多种 DNA 分析方法被用来研究不同类群、物种和种群间的遗传差异, 从而服务于系统发生、物种分类和种群遗传分化等领域的研究。DNA 分析已成为许多传统研究领域的重要辅助手段之一。在各种方法中, DNA 序列分析能够直接反应出碱基的差异, 而序列分析的商业化也大大降低了实验成本, 因此 DNA 序列分析被越来越多地应用于各项研究之中(陈永久等, 1999; 李

正西和沈佐锐, 2002; 罗晨等, 2002)。线粒体基因是常用的目的基因, 这主要是因为线粒体基因组分子量小, 拷贝数多, 符合严格的母系遗传方式, 比核基因组有更高的进化速率等(Brown, 1983)。我们应用线粒体细胞色素氧化酶 II (COII) DNA 序列的比较来研究我国尾蛱蝶属蝴蝶的系统分化关系。

尾蛱蝶是中大型蝶类, 属鳞翅目 Lepidoptera, 蛱蝶科 Nymphalidae, 尾蛱蝶属 *Polyura*。在中国已知有

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830050)

作者简介: 王戎疆, 男, 1970 年 1 月生, 博士, 主要从事分子生态学和种群生态学的研究, E-mail: rjwang@bio.pku.edu.cn

收稿日期 Received: 2003-04-18; 接受日期 Accepted: 2003-11-10

8 种尾蛱蝶, 主要分布于我国南方的广大地区(周尧, 1994)。和我国大多数蝴蝶的状况一样, 尾蛱蝶的基础研究十分缺乏, 其系统分化和分子生物学等方面的研究更是空白。另外, 大二尾蛱蝶 *P. eudamippus* Doubleday 有 5 个亚种, 在我国南方由西向东分布, 利用 COII 序列分析将会揭示地理变迁与生物分布格局间的关系。由于同一基因的变异速率在不同物种中会有所不同, 对同一属内近缘种的研究将有助于其种内分化的研究。因此, 对尾蛱蝶属系统分化的研究不仅就是对其基础研究的补充, 也将有助于我们对大二尾蛱蝶生物地理格局的研究。

表 1 所用尾蛱蝶属 *Polyura* 蝴蝶标本的来源以及 COII 序列在 EMBL 核酸序列库中的接受号

Table 1 The collection locations, date, and collectors of the studied specimens of *Polyura* and the accession number of COII in EMBL GenBank

| 物种<br>Species                            | 标本编号<br>Specimen code | 采集地点<br>Collection location     | 采集时间<br>Collection date | 采集者<br>Collector      | COII 序列 GenBank 登录号<br>GenBank accession number of COII |
|--|-----------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|---|
| 大二尾蛱蝶<br><i>P. eudamippus</i> Doubleday  | 9                     | 台湾南山溪<br>Nanshanxi, Taiwan      | 1984.8.10               | 陈丽珍<br>CHEN Li-Zhen   | AJ515566  |
|  | 38                    | 云南西双版纳<br>Xishuangbanna, Yunnan | 1998.5                  | 吴云<br>WU Yun          | AJ515588  |
|  | 55                    | 广东北部<br>North Guangdong         | 1995.5.5                | 陈锡昌<br>CHEN Xi-Chang  | AJ515602  |
| 二尾蛱蝶<br><i>P. narcaea</i> Hewitson       | E9                    | 湖南壶瓶山<br>Hupingshan, Hunan      | 1999.7.6                | 姚锦仙<br>YAO Jin-Xian   | AJ507636  |
|  | E16                   | 四川宝兴<br>Baoping, Sichuan        | 1999.7.26               | 孙楷<br>SUN Kai         | AJ507638  |
|  | E36                   | 台湾台东县<br>Taidong, Taiwan        | 2000.3.25               | 徐培峰<br>TSU Yu-Feng    | AJ507641  |
| 窄斑凤尾蛱蝶<br><i>P. athamas</i> Drury        | Z1                    | 广东梅县<br>Meixian, Guangdong      | 1999.8.7                | 万宏<br>WAN Hong        | AJ515232  |
|  | Z5                    | 广东梅县<br>Meixian, Guangdong      | 1999.8.7                | 万宏<br>WAN Hong        | AJ515233  |
|  | Z6                    | 广西百色<br>Bose, Guangxi           | 2000.7                  | 万宏<br>WAN Hong        | AJ515234  |
| 黑凤尾蛱蝶<br><i>P. schreiber</i> Godart      | H                     | 云南西双版纳<br>Xishuangbanna, Yunnan | 1998.5                  | 吴云<br>WU Yun          | AJ515235  |
| 忘忧尾蛱蝶<br><i>P. nepenthes</i> Grose-Smith | W1                    | 江西九连山<br>Jiulianshan, Jiangxi   | 1998.6                  | 丁冬荪<br>DING Dong-Sun  | AJ515236  |
|  | W2                    | 海南霸王岭<br>Bawangling, Hainan     | 2002.4                  | 张春兰<br>ZHANG Chun-Lan | AJ534842  |

## 1.2 DNA 提取

提取参照 Zimmermann 等(2000)的方法, 略做改进。取下蝴蝶的一只足, 加入 250  $\mu$ L 提取缓冲液(50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L pH 8.0 EDTA, 0.1 % SDS), 用塑料小杵将蝴蝶足捣碎。加入 2  $\mu$ L 20 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀,

## 1 材料与方法

### 1.1 实验昆虫

本研究共选取尾蛱蝶属蝴蝶 5 种 12 个标本, 其中大二尾蛱蝶 *P. eudamippus* Doubleday、二尾蛱蝶 *P. narcaea* Hewitson 和窄斑凤尾蛱蝶 *P. athamas* Drury 各为 3 个标本, 忘忧尾蛱蝶 *P. nepenthes* Grose-Smith 为 2 个标本, 黑凤尾蛱蝶 *P. schreiber* Godart 为 1 个标本, 材料的来源和采集时间见表 1。所有标本都是用常规方法干制, 常温保存。

60 $^{\circ}$ C 保温至少 3 h。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 50  $\mu$ L TE, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 COII 的扩增、纯化及测序

PCR 扩增的目的片段为线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 II(COII)5'端一段 405 bp 的 DNA 片段。引物

选用 Simon 等(1994)设计的通用引物 C2-N-3494 和由通用引物 TL2-J-3037 改进的 TLL(Wang and Long, 2003)。20  $\mu$ L PCR 扩增体系包括 1 U Taq 酶, 1 $\times$  反应缓冲液, 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.25 mmol/L dNTP, 2 个引物各 40 ng, 1  $\mu$ L DNA 溶液。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行以下 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.6% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物后, 用 Promega 的 DNA 纯化试剂盒纯化, 送上海博亚公司和军事医学科学院用自动测序仪直接测序。

#### 1.4 有关数据分析

得到 DNA 序列后, 使用 ClustalW(Thompson 等, 1994)软件进行排序。使用 PHYLIP 3.5c 软件包(Felsenstein, 1993)进行有关分析。另外从 EMBL 核酸序列库中选取柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* L. 的相应片段作为参照(AF043999, Caterino and Sperling, 1999)。

## 2 结果

### 2.1 COII 序列的变异

根据所选用引物的位置, 可以估计所扩增片段的大小约为 500 bp。电泳检测结果显示, 所有标本的 PCR 产物均为 500 bp, 与预计的相符。产物经纯化后由 DNA 自动测序仪测定其序列, 去除 5' 端部分

tRNA-Leu 片段后, 即可得到 COII 基因由 5' 端开始的长度为 405 bp 的片段的 DNA 序列。所得各序列在 EMBL 核酸序列库中的接受号见表 1。在尾蛱蝶属 5 个种的 12 个样品中, 有 46 个位点为多态性位点, 占全部位点的 11.4%。表 2 列出了尾蛱蝶 12 个样品以及柑橘凤蝶两两之间的碱基转换(transition)和颠换(transversion)的数目及差异总数。在大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶种内个体间碱基差异在 1~6 个, 窄斑凤尾蛱蝶种内个体间碱基差异最多的为 11 个, 而种间的差异除了大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶之间的差异为 9~11 个碱基, 其它的在 15~24 个碱基之间。基本上说, 尾蛱蝶属内各物种内不同个体间的差异也明显小于不同物种间的差异。和尾蛱蝶属相比, 柑橘凤蝶的这段 COII 基因在 381 位和 384 位之后各有 3 个碱基的插入, 刚好是插入了 2 个氨基酸。我们在进行比较时暂且不考虑这 6 个插入的碱基。柑橘凤蝶和尾蛱蝶差异的碱基总数在 54~58 个, 占全部的 13.3%~14.3%, 远远大于尾蛱蝶属内部的碱基差异(0.5%~5.9%)。从碱基差异的形式上看, 柑橘凤蝶与尾蛱蝶的碱基差异主要是颠换, 约占总差异的 60%; 而尾蛱蝶属内部有 81.5% 的碱基改变是转换。

### 2.2 系统分化

利用最大似然性法(maximum likelihood method)

表 2 尾蛱蝶属蝴蝶 COII 基因的差异(上三角为转换数/颠换数, 下三角为差异的碱基总数, PX 为柑橘凤蝶)

Table 2 The divergence of mitochondrial COII among butterflies of *Polyura* (upper triangle: number of transition / transversion; lower triangle: total number of divergent base; PX: *Papilio xuthus*)

| 标本编号<br>Specimen code | 9  | 38  | 55  | E9   | E16  | E36  | Z1   | Z5   | Z6   | H    | W1   | W2   | PX    |
|-----------------------|----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 9                     |    | 3/1 | 2/0 | 14/2 | 15/2 | 15/2 | 18/5 | 18/5 | 19/4 | 18/4 | 8/1  | 9/1  | 22/35 |
| 38                    | 4  |     | 5/1 | 15/3 | 16/3 | 14/3 | 18/6 | 18/6 | 18/5 | 16/5 | 8/2  | 9/2  | 19/36 |
| 55                    | 2  | 6   |     | 14/2 | 15/2 | 15/2 | 18/5 | 18/5 | 19/4 | 18/4 | 9/1  | 10/1 | 22/35 |
| E9                    | 16 | 18  | 16  |      | 1/0  | 3/0  | 15/4 | 15/4 | 15/4 | 15/2 | 17/1 | 18/1 | 25/33 |
| E16                   | 17 | 19  | 17  | 1    |      | 4/0  | 16/4 | 16/4 | 16/4 | 16/2 | 18/1 | 19/1 | 26/33 |
| E36                   | 17 | 17  | 17  | 3    | 4    |      | 14/5 | 14/5 | 14/4 | 14/2 | 16/1 | 17/1 | 24/33 |
| Z1                    | 23 | 24  | 23  | 19   | 20   | 19   |      | 0/0  | 8/3  | 11/5 | 16/6 | 17/6 | 18/38 |
| Z5                    | 23 | 24  | 23  | 19   | 20   | 19   | 0    |      | 8/3  | 11/5 | 16/6 | 17/6 | 18/38 |
| Z6                    | 23 | 23  | 23  | 19   | 20   | 18   | 11   | 11   |      | 11/4 | 16/5 | 17/5 | 17/37 |
| H                     | 22 | 21  | 22  | 17   | 18   | 16   | 16   | 16   | 15   |      | 20/3 | 21/3 | 22/32 |
| W1                    | 9  | 10  | 10  | 18   | 19   | 17   | 22   | 22   | 21   | 23   |      | 1/0  | 20/34 |
| W2                    | 10 | 11  | 11  | 19   | 20   | 18   | 23   | 23   | 22   | 24   | 1    |      | 20/34 |
| PX                    | 57 | 55  | 57  | 58   | 59   | 57   | 56   | 56   | 54   | 54   | 54   | 54   |       |

分析这段 COII 基因序列,从而得到尾蛱蝶属蝴蝶的聚类关系图(图 1)。用 Bootstrap 做 500 次重取样分析,得到各分支的置信度在 49~100。由图 1 可以看出,柑橘凤蝶很清楚地与尾蛱蝶属蝴蝶区分开,在尾蛱蝶属中,同一种的不同个体首先聚在一起,形成该

种的分支丛。大二尾蛱蝶先与忘忧尾蛱蝶聚在一起,而后和二尾蛱蝶形成一个分支,而窄斑凤尾蛱蝶和黑凤尾蛱蝶聚在一起成为另外一个分支,两个分支之间存在很明显的区分。

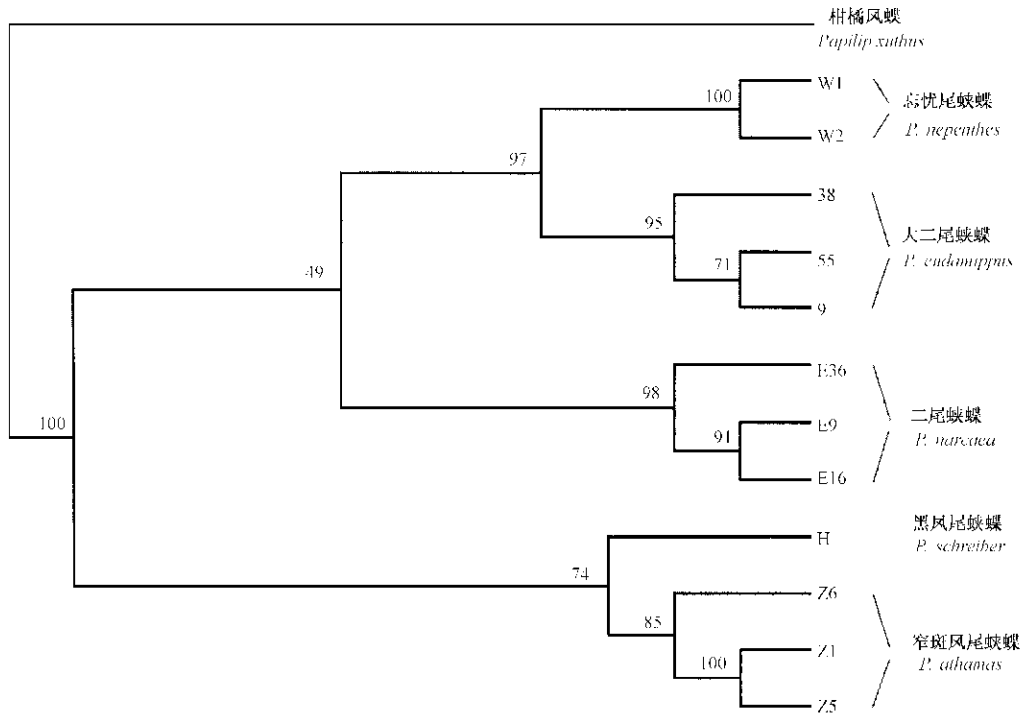


图 1 最大似然性法分析线粒体 COII 基因序列得到的尾蛱蝶属 5 个种之间的聚类关系图(柑橘凤蝶为外群)

Fig. 1 The dendrogram of 5 species of *Polyura* butterfly based on mitochondrial COII sequence by maximum likelihood method (*Papilio xuthus* as outgroup)

各分支上的数字表示该分支 Bootstrap 检验的支持度。

Support for each branch is given by bootstrap replicate.

### 3 讨论

在线粒体基因组中,细胞色素氧化酶 II 基因(COII)是在昆虫系统进化研究中使用最多的蛋白质编码基因之一(Liu and Beckenbach, 1992; Brower and DeSalle, 1998; Nice and Shapiro, 2001)。根据已有的研究,COII 基因序列种内差异一般为 1%~2% (Sperling and Hickey, 1994),近缘种之间的差异在 4%左右(Sperling *et al.*, 1996)。我们所分析的大二尾蛱蝶和二尾蛱蝶种内个体间的差异为 0.5%~1.5%,而尾蛱蝶属内各物种间的差异绝大多数在 4%以上,这与上面提到的研究结果基本一致。但是,窄斑凤尾蛱蝶的 2 个个体间的差异却达到了 2.7%,甚至大于大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的种间差异(2.2%~2.5%)。这一结果有两种可能的解释,

其一,尾蛱蝶属内不同支系 COII 基因分化速率有所不同;其二,现在认为的窄斑凤尾蛱蝶已经分化为两个种,只是形态学特征尚不明显或不为人所重视。这都有待于进一步深入的研究。Brower(1994)推算出 COII 在纯蛱蝶属 *Heliconius* 中每百万年有 2% 的序列差异,据此计算,大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的分化大约发生在 120 万年前,而和二尾蛱蝶则在 210 万年前就产生了分化,黑凤尾蛱蝶和窄斑凤尾蛱蝶的分化约在 190 万年前,而尾蛱蝶属的两大支系在大约 280 万年前就已分化了。

我们根据线粒体 COII 基因序列构建的尾蛱蝶属系统分化关系,与形态学分类的结果基本一致。黑凤尾蛱蝶和窄斑凤尾蛱蝶在翅面颜色和图案上都有较大的相似性,大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的翅面颜色和图案也十分接近,而两者之间却有着明显的不同(Smiles, 1982)。基于 COII 基因序列

的聚类关系图(图 1)也显示出黑凤尾蛱蝶和窄斑凤尾蛱蝶一支与大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶一支之间明显的遗传分化。在大二尾蛱蝶、二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶这一分支中,二尾蛱蝶在形态上与大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶有较多的不同,如大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶前翅正面亚外缘都有 2 列白斑,而二尾蛱蝶则只有 1 列,二尾蛱蝶后翅反面眼点的形状和颜色也与大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶有明显的不同(Smiles, 1982; 周尧, 1994)。而大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的差别主要在于大二尾蛱蝶前翅腹面都有“Y”形条纹,忘忧尾蛱蝶则是“1”形条纹。因此,大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的亲缘关系更近一些,而二尾蛱蝶则较早分出(Smiles, 1982)。本研究中 COII 基因序列分析的结果也表明,大二尾蛱蝶和忘忧尾蛱蝶的序列差异要比和二尾蛱蝶的小,聚类关系图的分支结构也与形态学的相吻合。在尾蛱蝶属的系统学研究中,由于种间生殖器的差别不大,而采用了翅的颜色和图案来作为分类依据(Smiles, 1982),本研究分子系统学的结果则支持了形态学的研究结果。

**致谢** 承蒙表 1 中所列各位协助采集或提供标本,中国军事医学科学院张京生在 DNA 测序上给予了大量的技术支持,特此鸣谢! 特别感谢匿名审稿人的宝贵意见。

### 参考文献 (References)

Brower AVZ, 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 6 491 - 6 495

Brower AVZ, DeSalle R, 1998. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as source characters for phylogenetic inference. *Insect Mol. Biol.*, 1: 73 - 82.

Brown WM, 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehn RK eds. *Evolution of Genes and Proteins*. Sunderland.

Caterino MS, Sperling FAH, 1999. *Papilio* phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11(1): 122 - 137.

Chen YJ, Zhang YP, Shen RF, Zhang YW, Yang DR, Nie L, Yang YX, 1999. The phylogeny of 5 Chinese peculiar *Parnassius* butterflies using noninvasive sampling mtDNA sequences. *Acta Genetica Sinica*, 26(3): 203 - 207. [陈永久, 张亚平, 沈发荣, 张云武, 杨大荣, 聂龙, 杨跃雄, 1999. 中国 5 种珍稀绢蝶非损伤取样的 mtDNA 序列及系统进化. *遗传学报*, 26(3): 203 - 207]

Chou I, 1994. *Monograph of Chinese Butterflies*. Zhengzhou: Henan Scientific and Technological Publishing House. [周尧, 1994. 中国蝶类志(上、下册). 郑州: 河南科学技术出版社]

Felsenstein J, 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Li ZX, Shen ZR, 2002. Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomol. Sin.*, 45(5): 559 - 566. [李正西, 沈佐锐, 2002. 赤眼蜂分子鉴定技术研究. *昆虫学报*, 45(5): 559 - 566]

Liu H, Beckenbach AT, 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1: 41 - 52.

Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt COI) sequences for identification biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomol. Sin.*, 45(6): 759 - 763. [罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 2002. 线粒体细胞色素氧化酶 I 用于烟粉虱生物型的鉴定. *昆虫学报*, 45(6): 759 - 763]

Nice CC, Shapiro AM, 2001. Population genetic evidence of restricted gene flow between host races in the butterfly genus *Mitoura* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Ann. Ent. Soc. Am.*, 94(2): 257 - 267.

Simon C, Frati F, Beckenbach B, 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. Ent. Soc. Am.*, 87: 651 - 701.

Smiles RL, 1982. The taxonomy and phylogeny of the genus *Polyura* Billberg (Lepidoptera: Nymphalidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology series*, 44(3): 115 - 237.

Sperling FAH, Hickey DA, 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.*, 11: 656 - 665.

Sperling FAH, Landry JF, Hickey D, 1996. Mitochondrial DNA sequence variation among pheromotypes of the dingy cutworm, *Feltia jaculifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Can. J. Zool.*, 74: 2 109 - 2 117.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4 673 - 4 680.

Wang RJ, Long Y, 2003. An improved COII primer specific for lepidopteran. *Biochemical Genetics*, 41(1/2): 57 - 60.

Zimmermann M, Wahlberg N, Descimon H, 2000. Phylogeny of *Euphydryas* checkerspot butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on mitochondrial DNA sequence data. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93: 347 - 355.