

基于 rDNA-ITS2 序列的中国按蚊属按蚊亚属 部分种类的系统发育关系研究 (双翅目:蚊科)

马颖, 马雅军, 林琳, 王琰

第二军医大学热带传染病学教研室, 上海 200433

摘要: **目的** 阐明中国按蚊属按蚊亚属蚊种的亲缘关系。**方法** 根据核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区(rDNA-ITS2)序列, 采用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、最小进化法(ME)和最大似然法(ML), 对采自中国的按蚊亚属 22 种(分子型)蚊虫进行系统发育关系重建。**结果** rDNA-ITS2 序列的长度范围为 340~1754 bp, 种内的 p 遗传距离均小于 0.004, 种间为 0.009~0.420, 平均值为 0.224。各种方法重建的系统发育树均显示分为 3 大支, 分别对应赫坎按蚊种团和须喙按蚊种团各一支, 以及林氏按蚊与五斑按蚊种团聚为的一支, 三者为并系关系; 赫坎按蚊种团成员种分为主要的 4 支, 其种间关系与形态分类结果一致, 但分子型 spLL1 和 spLL2 的聚类位置不稳定。**结论** 重建的分子系统发育树客观地阐明了中国按蚊属按蚊亚属各种团及蚊种之间的亲缘关系, ITS2 序列具有足够的信息贡献量。

关键词: 按蚊属; 按蚊亚属; 核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区; 系统发育

中图分类号: R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)05-0382-07

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2013.05.002

Phylogenetic relationship among some species of genus *Anopheles* subgenus *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in China: based on rDNA-ITS2 sequences

MA Ying, MA Ya-jun, LIN Lin, WANG Yan

Department of Tropical Infectious Diseases, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: MA Ya-jun, Email: yajun_ma@163.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China-Yunnan Joint Fund (No. U0932604)

Abstract: Objective To clarify the interspecific phylogenetic relationship among the species of genus *Anopheles* subgenus *Anopheles* in China. **Methods** The phylogenetic relationship among 22 species (molecular forms) of subgenus *Anopheles* collected from China was reconstructed based on ribosomal DNA second internal transcribed spacer (rDNA-ITS2) sequences using neighbour joining, maximum parsimony, minimum evolution and maximum likelihood methods. **Results** The length range of rDNA-ITS2 was 340-1754 bp; the intraspecific genetic distances (p distance) were below 0.004, and the range of pairwise genetic distances among *Anopheles* mosquitoes was 0.009-0.420 (mean 0.224). All the reconstructed phylogeny trees showed that there were three clades, i.e., *An. hyrcanus* group, *An. barbirostris* group and *An. lindesayi* with *An. maculipennis* group and that the group clades were paraphyletic. There were four major clusters in *An. hyrcanus* group, and the interspecific relationship in each cluster was the same as the morphological taxonomy. However, the cluster positions of spLL1 and spLL2 were unstable. **Conclusion** The molecular phylogenetic tree reconstructed in this study objectively shows the interspecific phylogenetic relationship among the groups and species of genus *Anopheles* subgenus *Anopheles* in China. The rDNA-ITS2 sequences have sufficient contribution to the reconstruction of phylogeny of *Anopheles* species.

Key words: Genus *Anopheles*; Subgenus *Anopheles*; Ribosomal DNA second internal transcribed spacer; Phylogeny

按蚊亚属(*Anopheles*)隶属于双翅目(Diptera), 蚊科(Culicidae), 按蚊亚科(Anophelinae), 按蚊属(*Anopheles*), 中国已记录 30 余种^[1-3], 其中部分种类可以传播严重危害人类健康的疾病^[1]。按蚊的系统发育

关系探讨由来已久, 但依据形态特征的后续研究尚难深入推进。近年的研究表明分子标志具有客观的进化信息特征, 包括: 线粒体 DNA 和核糖体 DNA 部分基因序列, 据此重建的系统发育关系可以极大程度地符合真实的种间关系^[4-9], 并可有助于澄清形态相似的蚊种分类地位^[4]。笔者已基于线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚单位 II 和核糖体 DNA 28S 编码区第 3 结构域, 以及核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区(ribosomal DNA

基金项目: 国家自然科学基金委员会-云南省人民政府联合基金(U0932604)

作者简介: 马颖(1983-), 女, 动物学硕士, 主要从事媒介生物学研究工作。

Email: m_y_1001@yahoo.cn

通讯作者: 马雅军, Email: yajun_ma@163.com

second internal transcribed spacer, rDNA-ITS2) 对中国的按蚊属塞蚊亚属部分种类进行分子系统发育关系重建^[10-11]。本研究拟对中国按蚊亚属部分种类的 rDNA-ITS2 序列进行测定和分析,并阐明其种间的亲缘关系,为蚊媒分类和蚊媒病防控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料 成蚊采集采用诱蚊灯或人工捕捉法,将蚊麻醉处死后自然干燥,单只置离心管带回实验室;种类鉴定依据陆宝麟等^[1]的检索表,赫坎按蚊种团(*Hyrcanus Group*)的隐种进行分子鉴定^[12]。本研究涉及的种类和标本信息见表 1。

1.2 目的基因扩增和测序 按 Collins 等^[13]的方法,提取单蚊基因组 DNA。扩增 rDNA-ITS2 的引物参照文献设计、合成^[14],正向引物 5.8S: 5' -GAA CTG CAG GAC ACA TGA AC-3', 反向引物 28S: 5' -GGG GTA GTC ACA CAT TAT TTG AGG-3'。反应体系含 2 μ l DNA 模板、1 \times PCR 缓冲液、0.1 mmol/L dNTPs、1.7 mmol/L MgCl₂、1.25 U DNA Taq 聚合酶和 0.2 μ mol/L 成对引物。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 45 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环。扩增产物经 1% 琼脂糖(含 0.5% Goldview)凝胶电泳检测后,割胶回收 PCR 产物,四色荧光标记的双脱氧链终止法测序(ABI 3730 测序仪,上海博尚生物技术有限公司),测序引物同扩增引物,采用正、反向测序以保证序列的完整性。

1.3 数据分析 测序结果以 BioEdit 5.0.9 软件进行核对,必要时手工调整。采用 Clustal X 1.8 比对所获序列,参数为默认值,将比对结果输入 Mega 5.0 软件进行序列组成分析,包括变异位点(variable sites)、简约信息位点(parsimony information sites)、碱基组成(nucleotide composition)和碱基替换饱和度分析等,并计算各蚊种间的 p 遗传距离。在 Mega 5.0 软件中进行系统发育分析,分别采用最大似然法(maximum likelihood, ML)、邻接法(neighbor joining, NJ)、最小进化法(minimum evolution, ME)和最大简约法(maximum parsimony, MP)重建系统发育树,在重建 ML 树之前,选择最优的核苷酸替换模型。系统发育树的各分支置信水平用自举检验(Bootstrap test)估计,重复 500 次。

2 结果

2.1 ITS2 序列特征 本研究比对获得的按蚊属按蚊亚属的 18 种和 4 个分子型的 78 条 rDNA-ITS2 序列,统计和分析序列的特征显示,其长度范围为 340 bp(傅氏按蚊)~1754 bp(须喙按蚊),平均长度为 476 bp,包括部分 5.8S 和 28S 编码区和完整的 ITS2 区, C、A、G、T 的

平均含量为 20.5%、28.3%、25.9% 和 25.4%(表 2)。

对所有序列进行比对结果显示各蚊种内序列保守,除未定名种 spLL3 和筠连接蚊 >0.01 外,其余种内的 p 遗传距离均 <0.004; 种间的 2025 个比对位点中,存在 500 个变异位点,465 个简约信息位点。各成对蚊种间的 p 遗传距离范围为 0.009(八代按蚊/筠连接蚊)~0.420(林氏按蚊/须喙按蚊),平均值为 0.224(表 3)。以碱基转换/颠换数目为纵坐标, p 遗传距离为横坐标建立的二维坐标图估计序列碱基替换饱和度,可以看出两者均已达到饱和。

2.2 系统发育树 依据 ITS2 序列,分别采用 4 种方法重建系统发育树,ML 树是依据序列进化的最优模型 K2+G 重建,ME 树/NJ 树/MP 树的拓扑结构完全相同(图 1),ML 树的部分分支与之差别较大(图 2)。但各系统发育树均显示不同序列类型的同种均首先聚在一起,所有蚊种分为 3 个大支,对应赫坎按蚊种团和须喙按蚊种团各一支,以及林氏按蚊与五斑按蚊种团聚为的一支,各支间为并系关系。在须喙按蚊种团中傅氏按蚊与朝鲜按蚊亲缘关系近,与须喙按蚊远。

本研究蚊种中绝大多数隶属赫坎按蚊种团成员种,在各系统发育树中其亲缘关系相同的分支包括:①(((贝曼按蚊, spLL3)中华按蚊)克莱按蚊)(雷氏按蚊, sp1);②(((凉山按蚊, 昆明按蚊)贵阳按蚊)拟中华按蚊);③((八代按蚊, 筠连接蚊)赫坎按蚊);④(克劳按蚊, 带足按蚊)。上述分支间的亲缘关系相似,唯有未定名的分子型 spLL1 和 spLL2 的聚类位置不稳定,ME 树/NJ 树/MP 树为:((((①, ②)spLL1)③)④)spLL2), 其中 spLL1 和 spLL2 分支的置信值均 >0.75(图 1); ML 树为:((((③, spLL2), ④)spLL1), ②, ①), spLL1 和 spLL2 的置信值不高,分别为 0.32 和 0.41(图 2)。

3 讨论

rDNA 是生物遗传信息的宝贵来源,功能区产生的核糖体高度保守,转录间隔区序列又具有较高的种间和种内变异。本研究依据 rDNA 的第 2 内转录间隔区序列在中国按蚊亚属蚊种中具有较好的种内保守性和种间解析度^[15],是重建按蚊亚属蚊种系统发育关系理想的分子标志。

依据形态特征研究按蚊属按蚊亚属蚊种的系统发育关系多有报告^[16-19],主要的类群划分已基本达成共识,可分为 7 个种团 30 余种^[1-3]。本研究涉及中国按蚊亚属 4 个种团 22 种(分子型),各种团合理分开,其间为并系关系,种间亲缘关系在各系统树中拓扑结构基本相同,该结果与中国塞蚊亚属分子系统发育关系结合分析^[10-11],则可客观评价现存的按蚊分类系统,为进一

表1 中国按蚊亚属蚊种的信息

Table 1 Data on species of subgenus *Anopheles* mosquitoes in China

类群 ^a	种名	采集地	采集时间	个体数
按蚊亚属 Subgenus <i>Anopheles</i>				
赫坎按蚊种团 <i>Hyrceanus</i> Group	比伦按蚊 <i>An. belenrae</i>	中国辽宁兴城 韩国	2008-08 1998-08	3 2
	克劳按蚊 <i>An. crawfordi</i>	中国山东济宁	2007-07-2012-07	66
	赫坎按蚊 <i>An. hyrcanus</i>	中国云南普洱	2005-08	3
	筠连按蚊 <i>An. junlianensis</i>	中国新疆伊宁	1999-08	2
	克莱按蚊 <i>An. kleini</i>	中国四川筠连	1995-07	11
		中国云南盐津	2006-07-2006-08	2
		中国辽宁彰武	2008-08	10
		中国辽宁绥中	2008-08	10
		中国辽宁兴城	2008-08	10
		中国辽宁铁岭	2009-08	3
		中国辽宁阜新	2009-08	1
	贵阳按蚊 <i>An. kweiyangensis</i>	中国贵州关岭	1987-08	2
		中国云南盐津	2006-07-2006-08	3
	昆明按蚊 <i>An. kunmingensis</i>	中国云南腾冲	1997-07	2
	雷氏按蚊 <i>An. lesteri</i>	中国辽宁法库	1999-08	4
		中国辽宁庄河	1999-08	3
		中国辽宁彰武	2008-08	3
		中国辽宁北镇	2008-08	3
		中国云南威信	1999-08	2
		中国河南信阳	1999-07	2
		中国辽宁东港	1997-07	2
		中国广西 ^b	-	2
		中国海南文昌	2010-08	3
		中国江苏 ^b	-	-
	凉山按蚊 <i>An. liangshanensis</i>	中国四川洪雅	1997-07	4
	带足按蚊 <i>An. peditaeniatus</i>	中国云南勐腊	2009-10	4
		中国西藏林芝	2004-08	3
		中国海南儋州	2012-06	2
	中华按蚊 <i>An. sinensis</i>	中国辽宁绥中	2008-08	3
		中国浙江临安	2004-07	4
		中国辽宁兴城	2008-08	2
		中国河南唐河	2001-07	3
		中国山东临沂	2001-07	4
		中国江苏 ^b	-	2
	拟中华按蚊 ^c <i>An. sineroides</i>	韩国	-	-
	八代按蚊 <i>An. yatsushiroensis</i>	中国辽宁台安	2008-08	1
		韩国	1998-08	2
		中国四川高县	1993-08	1
		中国山东荣成	2004-08	3
		中国河南桐柏	2007-08	3
	未定名种 ^d <i>An. sp1</i>	中国山东荣成	1991-07	2
	未定名种 ^d <i>An. spLL1</i>	中国贵州从江	2007-08	8
	未定名种 ^d <i>An. spLL2</i>	中国贵州从江	2007-08	7
		中国河南桐柏	2007-08	1
	未定名种 ^d <i>An. spLL3</i>	中国河南桐柏	2007-08	1
须喙按蚊种团 <i>Barbirostris</i> Group	须喙按蚊 <i>An. barbirostris</i>	中国云南勐腊	2009-10	3
		中国海南陵水	2012-06	2
	傅氏按蚊 <i>An. freyi</i>	中国四川名山	1994-07	7
	朝鲜按蚊 <i>An. koreicus</i>	中国辽宁东港	1998-08	2
五斑按蚊种团 <i>Maculipennis</i> Group	米赛按蚊 <i>An. messeae</i>	中国新疆伊宁	1999-08	2
林氏按蚊种团 <i>Lindesayi</i> Group	林氏按蚊 <i>An. lindesayi</i>	中国陕西安康	2006-07	10

注: a. 此类群参照文献[1,3]; b. 实验室品系的采集地和采集时间不详; c. 参照文献[20]; d. 尚未定名的种类。sp1. 误定为八代按蚊; spLL1~3. 均误定为中华按蚊。

表 2 中国按蚊亚属蚊种的 ITS2 序列特征
Table 2 ITS2 sequence information of subgenus *Anopheles* mosquitoes in China

蚊种	GenBank 登录号	长度 (bp)	含量 (%)			
			C	A	G	T
比伦按蚊	AF145464/AY187728	451	21.1	27.5	25.1	26.4
克劳按蚊	AF261949	436	23.9	21.3	29.4	25.5
赫坎按蚊	AF261149	436	21.8	28.4	24.8	25.0
筠连接蚊	AY316155	453	24.1	21.4	30.2	24.3
	AY170921	453	23.8	21.4	30.5	24.3
	KC808758	453	24.1	21.2	30.0	24.7
	KC808759	453	24.1	21.2	30.2	24.5
	KC808760/KC808761	453	24.1	21.2	30.5	24.3
	KC808762/KC808765	453	24.1	21.2	30.2	24.5
	KC808763	453	24.1	21.2	30.5	24.3
	KC808764	453	24.1	21.2	30.2	24.5
	KC808766	453	24.1	21.2	30.7	24.1
克莱按蚊	FJ875072/FJ875074	451	18.6	30.4	25.7	25.3
贵阳按蚊	AF261150	443	19.9	29.3	26.0	24.8
昆明按蚊	AY170920	446	20.6	29.4	26.2	23.8
雷氏按蚊	AY803797/AY803796/AY803792/ AF384172/AY803801/AY803799/ AY803800/AY803798/AY803795/ AY803794/AY803793/AJ004941	448	20.1	29.2	25.9	24.8
凉山按蚊	AY170922	446	20.0	30.0	26.2	23.8
	AF146750	446	20.0	30.3	26.0	23.8
带足按蚊	AY129958/KC808755/KC808756	457	24.3	20.8	29.8	25.2
	KC808757	457	24.1	20.8	29.8	25.4
中华按蚊	GQ161923/AY316154/AY316156	469	19.2	29.9	25.6	25.4
	AJ004942	468	19.2	29.7	25.6	25.4
拟中华按蚊	EU789795	439	19.1	28.2	26.4	26.2
八代按蚊	AY186791/AY170924	453	21.0	28.9	24.9	25.2
	AY170925	453	21.0	29.1	24.9	24.9
	AY170923	453	21.0	29.1	24.7	25.2
	AF146749/AY186792	453	21.0	29.4	24.7	24.9
未定名种 <i>An. sp1</i>	AY306128	455	19.1	28.6	26.6	25.7
未定名种 <i>An. spLL1</i>	JX944692	450	18.4	30.7	25.6	25.3
	JX944701	450	18.4	30.7	25.6	25.3
	JX944698	450	18.4	30.4	25.8	25.3
	JX944700	450	18.7	30.4	25.8	25.1
	JX944699	450	18.4	30.4	25.8	25.3
	JX944691	450	18.4	30.7	25.6	25.3
	JX944697	450	18.2	30.7	25.6	25.6
	JX944694	450	18.9	30.9	25.6	24.7
	JX944695	450	18.4	30.9	25.6	25.1
	JX944693	451	18.4	30.8	25.5	25.3
	JX944696	451	18.4	30.8	25.3	25.5
	JX944702	451	18.6	30.8	25.3	25.3
	JX944703	464	18.3	31.3	25.0	25.4
	JX944689	450	18.7	30.7	25.6	25.1
	JX944690	450	18.4	30.7	25.6	25.3
	JX944687	450	18.4	30.7	25.3	25.6
	JX944688	450	18.4	30.7	25.3	25.6
未定名种 <i>An. spLL2</i>	JX944704	480	17.5	28.8	26.9	26.9
未定名种 <i>An. spLL3</i>	JX944705	451	19.3	29.5	25.1	26.2
	JX944706	450	19.3	29.6	25.1	26.0
	JX944707	450	19.6	29.3	25.3	25.8
须喙按蚊	KC878681/KC878682	1754	24.2	16.3	31.8	27.7
傅氏按蚊	KC808752	340	21.2	25.9	21.2	31.8
	KC808753/KC808754	340	21.2	25.9	21.2	31.8
朝鲜按蚊	AY523635	336	22.3	26.5	22.9	28.3
米赛按蚊	AF305556	364	27.2	24.2	25.3	23.4
林氏按蚊	JX944708	310	28.7	21.3	28.7	21.3

表 3 中国按蚊属按蚊亚属成对蚊种间的 ITS2 序列遗传距离

Table 3 Pairwise genetic distances for ITS2 sequences among species of genus *Anopheles* subgenus *Anopheles* in China

蚊种代号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2	0.109																				
3	0.182	0.167																			
4	0.200	0.156	0.089																		
5	0.189	0.157	0.082	0.016																	
6	0.213	0.171	0.096	0.041	0.052																
7	0.197	0.166	0.092	0.050	0.057	0.059															
8	0.212	0.177	0.103	0.103	0.117	0.102	0.100														
9	0.206	0.177	0.110	0.104	0.109	0.094	0.087	0.049													
10	0.201	0.172	0.114	0.099	0.109	0.098	0.086	0.049	0.033												
11	0.202	0.168	0.091	0.099	0.113	0.096	0.084	0.047	0.052	0.040											
12	0.207	0.178	0.088	0.101	0.099	0.090	0.098	0.102	0.116	0.108	0.092										
13	0.229	0.203	0.112	0.128	0.131	0.118	0.127	0.104	0.121	0.119	0.096	0.046									
14	0.200	0.178	0.129	0.147	0.140	0.157	0.139	0.164	0.164	0.159	0.150	0.136	0.164								
15	0.200	0.182	0.131	0.152	0.144	0.162	0.141	0.164	0.168	0.159	0.150	0.138	0.166	0.009							
16	0.206	0.193	0.138	0.145	0.134	0.154	0.143	0.166	0.164	0.161	0.147	0.137	0.165	0.056	0.058						
17	0.232	0.224	0.186	0.179	0.180	0.174	0.192	0.214	0.218	0.218	0.194	0.174	0.203	0.204	0.200	0.191					
18	0.386	0.342	0.360	0.362	0.365	0.370	0.362	0.370	0.351	0.377	0.364	0.342	0.357	0.347	0.352	0.364	0.359				
19	0.312	0.292	0.281	0.282	0.289	0.281	0.254	0.277	0.273	0.290	0.272	0.279	0.286	0.296	0.293	0.309	0.320	0.215			
20	0.373	0.372	0.381	0.382	0.381	0.380	0.388	0.380	0.399	0.407	0.395	0.372	0.365	0.381	0.382	0.379	0.372	0.352	0.383		
21	0.370	0.372	0.371	0.363	0.366	0.368	0.380	0.370	0.386	0.395	0.383	0.363	0.351	0.380	0.382	0.371	0.368	0.364	0.393	0.039	
22	0.389	0.382	0.349	0.359	0.359	0.350	0.355	0.371	0.374	0.380	0.362	0.338	0.354	0.364	0.362	0.354	0.381	0.407	0.420	0.283	0.277

注：1. 带足按蚊_AY129958; 2. 克劳按蚊_AF261949; 3. 未定名种 LL1_JX944692; 4. 凉山按蚊_AY170922; 5. 昆明按蚊_AY170920; 6. 贵阳按蚊_AF261150; 7. 拟中华按蚊_EU789795; 8. 中华按蚊_GQ161923; 9. 比伦按蚊_AF145464; 10. 未定名种 LL3_JX944705; 11. 克莱按蚊_FJ875074; 12. 雷氏按蚊_AY803797; 13. 未定名种 sp1_AY306128; 14. 筠连按蚊_AY316155; 15. 八代按蚊_AY186791; 16. 赫坎按蚊_AF261149; 17. 未定名种 LL2_JX944704; 18. 米赛按蚊_AF305556; 19. 林氏按蚊_JX944708; 20. 傅氏按蚊_KC808752; 21. 朝鲜按蚊_AY523635; 22. 须喙按蚊_KC878681。

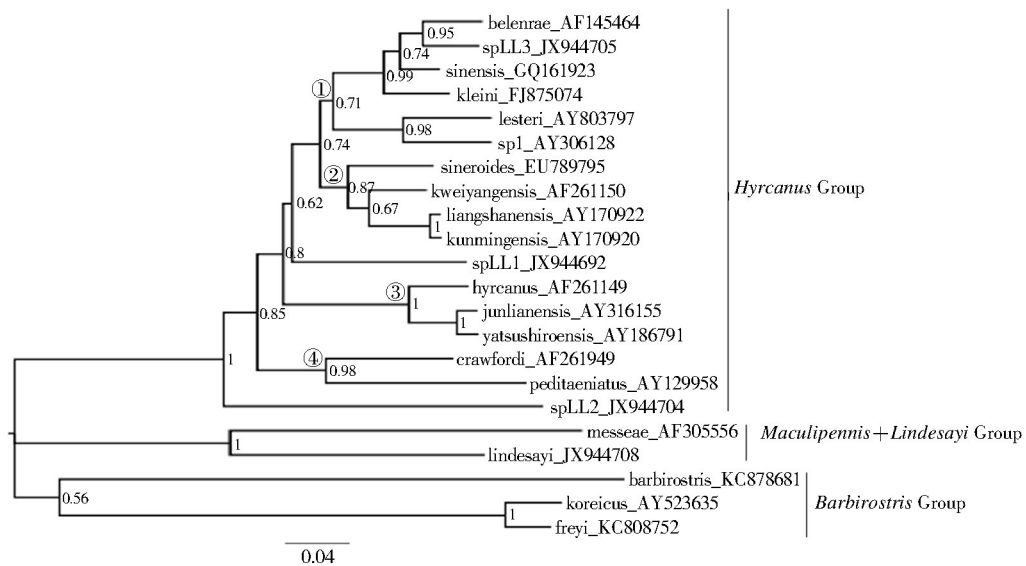


图 1 依据 rDNA-ITS2 序列重建的按蚊亚属蚊种的 ME 树

Figure 1 The ME tree of subgenus *Anopheles* mosquitoes based on rDNA-ITS2 sequences

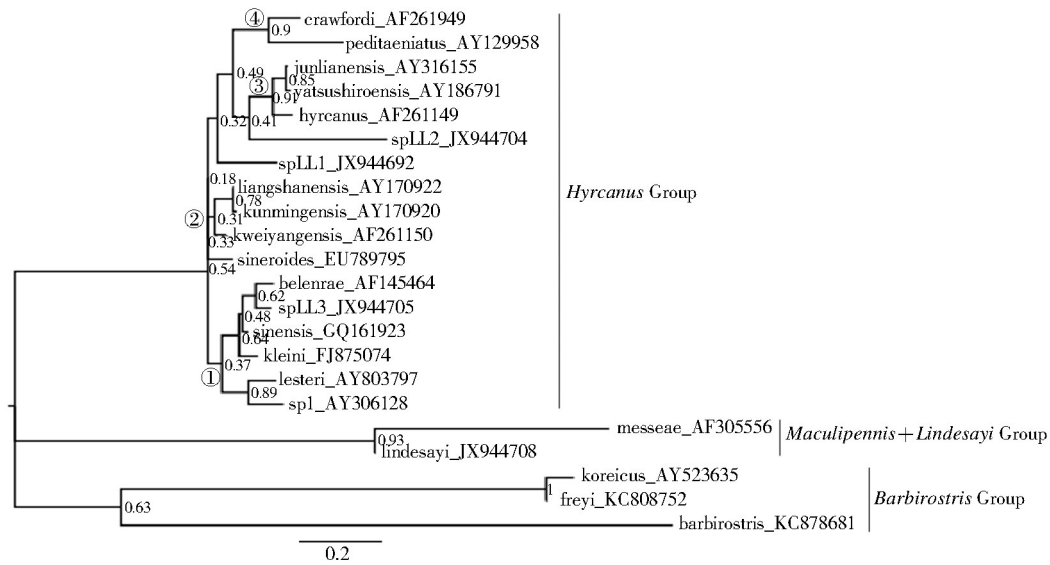


图 2 依据 rDNA-ITS2 序列重建的按蚊亚属蚊种 ML 系统发育树

Figure 2 The ML tree of subgenus *Anopheles* mosquitoes based on rDNA-ITS2 sequences

步全面阐明蚊科的种间亲缘关系奠定重要基础。

赫坎按蚊种团是非常复杂而重要的按蚊类群,全世界纪录的成员共 27 种(有些种类的分类地位仍待确认)^[3],其隐种的正确鉴定几乎不可能根据生活史中一个或几个时期的形态进行,故此多位学者基于分子特征进行研究^[12, 21-23],澄清了一些混淆的问题。中国按蚊亚属蚊种中超过 50% 隶属于赫坎按蚊种团,综合分析近年的分子鉴别结果,目前在中国分布的成员种为 19 种,以及 4 个分子型^[21]。本研究对其中 12 种和 4 个分子型的亲缘关系进行了分析,4 个分支中的种间关系与成蚊外部形态的相似程度对应性好,如:分支②中的 4 种,翅脉 V6 均有 3 个暗斑;分支②中的昆明按蚊与凉山按蚊、分支③中筠连按蚊与八代按蚊的成蚊形态特征极为近似。至于未定名的 4 个分子型,sp1 与雷氏按蚊、spLL3 与比伦按蚊的亲缘关系近,而 spLL1 与 spLL2 的聚类位置不稳定,有待进一步描述其形态后确定。曾多有学者对赫坎按蚊种团成员种进行种间关系研究^[24-26],虽然应用的种类不同,但结果相似。有学者将所有种类归为雷氏按蚊亚群、最黑按蚊 (*An. nigerrimus*) 亚群和其他亚群^[3, 27],而本研究的雷氏按蚊却未与克劳按蚊、带足按蚊聚为一支对应于雷氏按蚊亚群,其他种类的聚类关系也与亚群归类关联性不大。

为避免由蚊种分类带来的误差,本研究对每个蚊种的特异性 ITS2 序列确定,均应用多个个体反复比较和核对;隐种的定名结合地理分布、形态与分子特征确定,如:中华按蚊、雷氏按蚊和八代按蚊等。按蚊亚属中的须喙按蚊较为复杂,已证实其为复合体 (complex),包括 3~5 个隐种^[28-32]。本研究的须喙按蚊

样本采自海南和云南省,其 ITS2 序列与泰国的 B 和 C 型(染色体核型)相似性均为 100%,在中国是否存在其他隐种需进一步扩大样本检测。另外,须喙按蚊的 ITS2 序列存在大片段(100 bp 左右)的重复,且重复次数在隐种间存在差异^[33],该现象在其他按蚊中也有发现,其在进化中的意义需进一步探讨。

志谢 承蒙云南省寄生虫病防治所周红宁、顾云安、王丕玉和姜进勇,海南省疾病预防控制中心(CDC)赵伟和曾林海,辽宁省 CDC 张稷博和孟祥梅,辽宁省东港市 CDC 陈哲,第二军医大学樊勇、杨曼尼、吴静和李翔宇等协助采集样本,一并致谢

参考文献

- [1] 陆宝麟,许锦江,俞渊,等. 中国动物志. 昆虫纲. 第 9 卷. 双翅目: 蚊科(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1-62.
- [2] Harbach RE, Howard TM. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae)[J]. Eur Mosq Bull, 2007, 23: 1-66.
- [3] Harbach RE. Mosquito taxonomic inventory[EB/OL]. [2012-09-28] *Anopheles* classification. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/anopheles-classification>.
- [4] Mohanty A, Swain S, Kar SK, et al. Analysis of the phylogenetic relationship of *Anopheles* species, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) and using it to define the relationship of morphologically similar species[J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(6): 1204-1224.
- [5] Dixit J, Srivastava H, Sharma M, et al. Phylogenetic inference of Indian malaria vectors from multilocus DNA sequences [J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(6): 755-763.
- [6] Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, et al. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. Acta Trop, 2010, 114(2): 88-96.
- [7] Krzywinski J, Grushko OG, Besansky NJ. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipterans mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of

- mosquito evolution [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39 (2) : 417-423.
- [8] Logue K, Chan ER, Phipps T, et al. Mitochondrial genome sequences reveal deep divergences among *Anopheles punctulatus* sibling species in Papua New Guinea[J]. *Malaria J*, 2013, 12:64.
- [9] Ambrose L, Riginos C, Cooper RD, et al. Population structure, mitochondrial polyphyly and the repeated loss of human biting ability in anopheline mosquitoes from the southwest Pacific[J]. *Mol Ecol*, 2012, 21:4327-4343.
- [10] 吴静, 马雅军, 马颖. 基于 mtDNA 和 rDNA 基因序列的中国按蚊属塞蚊亚属种类的系统发育研究[J]. *昆虫学报*, 2011, 53(9): 1030-1038.
- [11] 马雅军, 吴静, 马颖. 基于 rDNA-ITS2 序列的中国按蚊属塞蚊亚属部分种类的系统发育研究[J]. *昆虫分类学报*, 2011, 33(4): 245-256.
- [12] 马颖, 马雅军, 孟祥梅, 等. 我国辽宁省赫坎按蚊种团的分子鉴别研究[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2009, 16(4): 224-227.
- [13] Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, et al. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1987, 37(1):37-41.
- [14] Porter CH, Collins FH. Species diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae)[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1991, 45(2):271-279.
- [15] 伍桐, 马雅军. rDNA-ITS2 序列作为中国按蚊分子鉴别特征的评述: I. 按蚊亚属[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2013, 20(1): 16-24.
- [16] Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships[J]. *Bull Entomol Res*, 2004, 94:537-553.
- [17] Foley DH, Bryan JH, Yeates D. Evolution and systematics of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1998, 9(2):262-275.
- [18] Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of *Anophelinae* (Diptera: Culicidae) based on morphological characters [J]. *Ann Entomol Soc Am*, 2000, 93(4):745-775.
- [19] Harbach RE, Kitching LJ. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data[J]. *Syst Biodivers*, 2005, 3(4):345-374.
- [20] Park MH, Choochote W, Junkum A, et al. Reproductive isolations of *Anopheles sinensis* from *Anopheles lesteri* and *Anopheles sineroides* in Korea[J]. *Genes Genomics*, 2008, 30(3):245-252.
- [21] Ma YJ, Xu JN. The Hyrcanus group of *Anopheles* (*Anopheles*) in China (Diptera: Culicidae): species discrimination and phylogenetic relationships inferred by ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 sequences[J]. *J Med Entomol*, 2005, 42(4): 610-619.
- [22] 陈锡欣, 李石柱, 邓绪礼, 等. 山东省赫坎按蚊复合体成员种的分子鉴别研究[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2003, 16(4): 232-234.
- [23] 林琳, 杨曼尼, 南春燕, 等. 中国部分地区赫坎按蚊种团的分子鉴别研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2013, 24(2):93-98.
- [24] 马雅军, 瞿逢伊. 我国赫坎按蚊复合体成员种的 rDNA-ITS2 区序列差异及系统发育分析[J]. *昆虫知识*, 2002, 39(3):209-214.
- [25] Hwang UW. Revisited ITS2 phylogeny of *Anopheles* (*Anopheles*) *hyrcanus* group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified ITS2 sequences [J]. *Parasitol Res*, 2007, 101: 885-894.
- [26] Paredes-Esquivel C, Harbach RE, Townson H. Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia[J]. *Med Vet Entomol*, 2011, 25: 348-352.
- [27] Harrison BA, Scanlon JE. The subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae)[J]. *Contr Am Entomol Inst*, 1975, 12:1-307.
- [28] Paredes-Esquivel C, Donnelly MJ, Harbach RE, et al. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2009, 50(1):141-151.
- [29] Suwannamit S, Baimai V, Otsuka Y, et al. Cytogenetic and molecular evidence for an additional new species within the taxon *Anopheles barbirostris* (Diptera: Culicidae) in Thailand[J]. *Parasitol Res*, 2009, 104(4):905-918.
- [30] Saeung A, Otsuka Y, Baimai V, et al. Cytogenetic and molecular evidence for two species in the *Anopheles barbirostris* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand[J]. *Parasitol Res*, 2007, 101(5): 1337-1344.
- [31] Saeung A, Baimai V, Otsuka Y, et al. Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* form A (Diptera: Culicidae) in Thailand[J]. *Parasitol Res*, 2008, 102(3): 499-507.
- [32] Townson H, Dyer N, Meakister E, et al. Systematic of *Anopheles barbirostris* van der Wulp and a sibling species of the Barbirostris Complex (Diptera: Culicidae) in eastern Java, Indonesia[J]. *Syst Entomol*, 2013, 38:180-191.
- [33] Otsuka Y. Variation in number and formation of repeat sequences in the rDNA ITS2 region of five sibling species in the *Anopheles barbirostris* complex in Thailand[J]. *J Insect Sci*, 2011, 11:137.

收稿日期:2013-05-20