

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.04.24

基于 CO I 与 ITS 序列的杂鳞库蚊复组 (双翅目: 蚊科) 分子系统发育

赵文静, 张春林*, 陈汉彬, 张 晶, 刘 彬

(贵州医科大学生物学教研室, 贵阳 550004)

摘要: 使用杂鳞库蚊复组 CO I 部分序列和 ITS 序列构建分子发育树, 并基于 CO I 序列计算该复组种内和种间的 Kimura-two-Parameter (K2P) 距离, 探讨环带库蚊的分类地位和杂鳞库蚊复组内各亲缘种的系统发育关系。环带库蚊和杂鳞库蚊的种间 K2P 距离为 0.24%–0.72%, 支持“环带库蚊是杂鳞库蚊的同物异名”这一观点; 杂鳞库蚊(环带库蚊)和伪杂鳞库蚊、三带喙库蚊的种间 K2P 距离为 4.41%–9.68%, 同时分子系统树显示各个种分别聚类, 互为姐妹群, 再次证明三者互为独立的种; 环带库蚊和杂鳞库蚊聚类的分支最接近树的端部, 三带喙库蚊分支最接近树的基部, 提示三带喙库蚊最早发生分化, 而杂鳞库蚊(环带库蚊)最晚发生分化; 采集自日本的三带喙库蚊种内 K2P 距离为 0.48%–2.68%, 而它们与采集自中国、印度的该种 K2P 距离为 4.17%–6.76%, 日本产三带喙库蚊聚集成一支, 并与中印产地的聚类分支互为姐妹群, 这些结果提示日本的三带喙库蚊有种下, 甚至种级分化的趋势。

关键词: 杂鳞库蚊复组; 核酸序列; K2P 距离; 分子系统发育

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 04-0821-10

Molecular phylogeny of *Culex vishnui* complex (Diptera: Culicidae) based on CO I and ITS sequences

ZHAO Wen-Jing, ZHANG Chun-Lin*, CHEN Han-Bin, ZHANG Jing, LIU Bin (Department of Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: Discussions about the classification status of *Culex annulus* and the relationship of *C. vishnui* complex were held with the Kimura-two-Parameter (K2P) distances based on CO I and phylogenetic trees based on CO I and ITS. The K2P distance between *C. annulus* and *C. vishnui* was 0.24%–0.72%, which supported “*C. annulus* is a synonym of *C. vishnui*”. The interspecific K2P distance among *C. vishnui* (containing *C. annulus*), *C. pseudovishnui* and *C. tritaeniorhynchus* were 4.41%–9.68%. From the view of the phylogenetic trees, each species respectively gathered and became sister group each other, which demonstrated again their being independent species of one another. *C. annulus* and *C. vishnui* being at the top of the phylogenetic trees indicated that they differentiated later, while *C. tritaeniorhynchus* being at the root indicated that differentiated earlier. The intraspecific K2P distance of *C. tritaeniorhynchus* mined in Japan was 0.48%–2.68%, and the interspecific K2P distances among those mined in Japan, China and India was 4.17%–6.76%. Furthermore, according to the phylogenetic trees, *C. tritaeniorhynchus* from Japan formed a branch themselves, then became the sister group with the branch formed by those from China and India. These results implied that Japanese *C. tritaeniorhynchus* had the trend to differentiate at

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字(2006)2077); 贵州医科大学青年基金项目(K2010-30)。

作者简介: 赵文静, 女, 硕士, 主要从事昆虫分子学研究, E-mail: ellenzhwj@foxmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zcl@gmc.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-10-18; 接受日期 Accepted: 2015-12-16

subspecies or even species level.

Key words: *Culex vishnui* complex; nucleotide sequences; K2P distance; phylogeny

杂鳞库蚊复组 *Culex vishnui* complex 隶属于库蚊属海滨库蚊组 *Culex sitiens* group, 主要分布于东洋界, 并向古北界延伸。目前记载有 4 个种: 环带库蚊 *C. annulus* Theobald, 1901, 杂鳞库蚊 *C. vishnui* Theobald, 1901, 伪杂鳞库蚊 *C. pseudovishnui* Colless, 1957 和三带喙库蚊 *C. tritaeniorhynchus* Giles, 1901。其共同特征是: 阳茎侧板内叶 (复支) 密生小刺; 中叶分 4–5 个指环突; 外叶的背、腹齿约等大; 载肛突基内侧有侧楔; 喙和附有淡色环。其中三带喙库蚊已经被多次证实是日本脑炎病毒 (*Japanese encephalitis virus*) 的主要传病媒介。该复组与医学关系密切, 因此自报道以来, 便引起国内外学者的关注。但是由于杂鳞库蚊复组的各亲缘种在形态上较相近, 各个种的变异幅度较大, 所以它的分类历史上一直存在着不同的观点和鉴定困难。譬如环带库蚊在头顶正中的竖鳞颜色、翅长、幼虫头毛 1-C 等均有不同程度的变异, 因此在对变异规律未加研究的情况下, 很可能把种内居群或个体误定为新种——谢麟阁和廖定西 (1956) 报告的混同库蚊 *Culex permixtus* Hsieh & Liao, 1956 就属于这种情况。我国杂鳞库蚊复组曾报告过 7 个种和 1 个亚种, 分类比较混乱, 后经陈汉彬 (1980) 进行系统整理和澄清, 认为杂鳞库蚊复组在我国境内只有 3 种, 即环带库蚊、伪杂鳞库蚊和三带喙库蚊。不过遇到形态变异较大的情况, 仍然不易于分辨。另外, 对于“环带库蚊是杂鳞库蚊的同物异名”这一说法, 一直存在着争议。自 Theobald (1901) 对环带库蚊描述后, Colless (1957)、Bram (1967)、Reuben (1969)、Miyagi 和 Iha (1970)、Sirivanakarn (1975, 1976)、陈汉彬 (1980) 先后从形态学上对其再描述, 但没有达成统一意见。例如, Reuben (1969) 根据印度马德拉斯 (杂鳞库蚊的模式标本产地) 标本, 认为杂鳞库蚊和环带库蚊的幼虫没有差别, 建议将环带库蚊作为杂鳞库蚊的同物异名处理。随后 Sirivanakarn (1975) 也基于同样理由建议把环带库蚊作为杂鳞库蚊的亚种或地理型。然而陈汉彬 (1980) 认为, 幼虫的同一性并不能排除成虫的差异性, 杂鳞库蚊成虫喙、翅和腿上具浓密的淡鳞麻点是它与环带库蚊的重要鉴别特征, 因此建议将“环带库蚊是杂

鳞库蚊的同物异名”这一说法做存疑处理, 在我国继续沿用环带库蚊这一名称。

自核酸序列被广泛应用于蚊科的系统发育研究以来, 其呈现的分子多态性和构建的分子树, 成为分类学研究的有力依据, 同时也为鉴别杂鳞库蚊复组的近缘种提供了便利。例如 Dhananjeyan 等 (2010) 提取并扩增印度地区杂鳞库蚊、伪杂鳞库蚊和三带喙库蚊的虫卵、幼虫和成虫的 ITS 2 序列, 根据它们的 ITS 2 凝胶电泳条带位置差异, 实现简单、快速的种间鉴别。Kumar 等 (2007) 测定印度地区蚊类 22 个种的 mtDNA CO I 序列, 构建 NJ 树, 这种方法成功鉴别出绝大部分蚊类, 包括杂鳞库蚊、伪杂鳞库蚊和三带喙库蚊。Toma 等 (2000) 利用 PCR 法扩增杂鳞库蚊、伪杂鳞库蚊、三带喙库蚊等蚊类的 ITS 1–5.8S–ITS 2 序列, 有效的鉴别出杂鳞库蚊的这 3 个近缘种。Miller 等 (1996) 测定 14 种库蚊 (其中包含三带喙库蚊和伪杂鳞库蚊) 的 ITS 序列, 并基于此构建分子树, 能够区分出三带喙库蚊和伪杂鳞库蚊。遗憾的是, 这些文献都缺乏环带库蚊的样本, 不能够解决“环带库蚊是否为杂鳞库蚊的同物异名”这一关键问题。反之, 涉及到环带库蚊的分子系统发育研究又缺乏杂鳞库蚊的样本。例如杨明等 (2003) 利用 RAPD–PCR 技术获得环带库蚊、伪杂鳞库蚊和三带喙库蚊 ITS 2 序列, 根据它们的长度和数量成功鉴别出三者。

随着生物信息公共数据库的推广和应用, 利用互联网整合现有资源并进行二次分析的做法, 既可以克服人力物力缺乏带来的标本采集困难, 又可以避免重复性实验, 能够利用更广泛的数据获得更全面的结论。鉴于此, 本研究从 GenBank 数据库中收集大部分杂鳞库蚊复组 mtDNA CO I 和 ITS 序列, 并基于这些序列进行分子系统发育研究, 讨论杂鳞库蚊复组内各亲缘种的分类地位和系统发育关系。另外, 由于公共数据库缺乏环带库蚊相关序列, 所以进行补充测定。

1 材料与方法

1.1 环带库蚊 mtCO I 序列, rDNA ITS 序列的获取

GenBank 数据库缺乏环带库蚊 CO I 序列和

ITS 1 序列, 所以根据现有杂鳞库蚊复组序列的长度和覆盖区域, 进行补充测定。数据库中的 CO I 序列均为部分序列, 本文设计扩增的环带库蚊 CO I 片段完全覆盖并远远大于数据库中被使用的最短序列。另外由于含 ITS 1 的序列均以“18S 部分序 - ITS 1 - 5.8S - ITS 2 - 28S 部分序列”的形式存在, 为获得同一个样本的 ITS 序列 (包含 ITS 1 和 ITS 2 序列), 进行同样区域的扩增。

环带库蚊于 2010 年 8 - 9 月和 2013 年 7 月, 自贵阳三江农场稻田内采集到幼虫, 经羽化、鉴定后, 置无水乙醇, -20°C 保存。采用常规酚 - 氯仿法提取环带库蚊 4 龄幼虫线粒体 DNA, 并调整浓度为 50 ng/mL 。

PCR 扩增 mtDNA CO I 部分基因, 沿用 Kumar 等 (2007) 设计的引物。引物序列为 CO I-For: $5'\text{-GGATTTGGAAATGATTAG TTCCTT-3'}$; CO I-Rev: $5'\text{-AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC-3'}$ 。PCR 反应体系为: $1 \times \text{PCR Buffer}$, 1.25 mM Mg^{2+} , 0.4 mM dNTPs , 0.08 pM 引物, $4\text{ ng}/\mu\text{L}$ 总 DNA 模板, $0.02\text{ U}/\mu\text{L}$ TaKaRa Taq 酶。扩增条件依次为: 95°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 40 s , 51°C 退火 1 min , 72°C 延伸 1 min ; 循环 35 次后, 72°C 延伸 10 min ; 4°C 保温。

PCR 扩增 rDNA ITS 序列, 结合软件 Primer premier 6.0 和 Oligo 7.27 设计引物。引物序列为: ITS-For: $5'\text{-ATTTGAATCG CTGAAGTTG-3'}$; ITS-Rev: $5'\text{-GTAGTCACACATTATTTGAGGC-3'}$, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为: $1 \times \text{PCR Buffer}$, 1.25 mM Mg^{2+} , 0.4 mM dNTPs , 0.08 pM 引物, $4\text{ ng}/\mu\text{L}$ 总 DNA 模板, $0.02\text{ U}/\mu\text{L}$ TaKaRa Taq 酶。扩增条件依次为: 95°C 预变性 5 min ; 94°C 变性 40 s , 54°C 退火 1 min , (此后 9 个循环每个循环递减 0.5°C , 至第 11 个循环维持 48°C 的退火温度), 72°C 延伸 1 min ; 共循环 35 次后, 72°C 再延伸 7 min ; 4°C 保温。

所有 PCR 产物都经 1% 琼脂糖凝胶电泳、纯化、回收后送至上海生物工程技术服务有限公司测序。测序结果经 NCBI Blastn 检验, 确定为杂鳞库蚊复组的基因。它们的登录号见表 1。

1.2 序列信息

序列信息详见见表 1。

1.3 序列处理

为确保序列的有效性, 作者逐条校对、查阅

了表 1 中所有序列的登录信息和支撑文献, 并做 BLASTn 比对; 其次, 在 Barcode of Life Data System 网站 (<http://www.boldsystems.org/>) 进行验证。最后选用 BioEdit 软件编辑序列。

对于本次所获得环带库蚊 CO I 部分序列, 首先根据测序峰值进行人工校对, 切除序列两端不可信区域。然后使用 Clustal W 对所有 CO I 序列进行多重比对, 切齐序列两端; 以高保守区 $5'\text{-GCAATAAATAATATAAGTTTTGAATA-3'}$ 为起始端, 切齐 $5'$ 端, 根据所用的最短序列切齐 $3'$ 端。对于 ITS 序列, 除去编码 rDNA 18S、5.8S 和 28S 的序列, 再拼接 ITS 1 和 ITS 2 序列, 得到同一个样本的 ITS 全序列。

1.4 系统发育分析

选用 MAGE 6.0 分析 DNA 序列的组成及变异情况, 并用 Kimura-two-Parameter (K2P) 模型估计分化距离 (K2P 距离); 使用 Model test 3.7 估算构建 ML 树的最优模型, 再以此模型建 ML 树; 使用 Jukes-Cantor 模型对平均 K2P 距离进行检测, 若平均距离 $P < 1$, 则表示适合构建 NJ 建树; 使用 PAUP 4.0 构建 ML 树。

2 结果与分析

2.1 环带库蚊 CO I 部分序列和 ITS 全序列

环带库蚊 4 个个体 CO I 部分基因, GenBank 登陆号为 KC876676 - KC876679, 长度为 $649 - 672\text{ bp}$, GC 含量为 $31.6\% - 32.0\%$, G 含量为 $16.2\% - 16.3\%$, 表现出很强的反 G 偏倚, 符合昆虫 mtDNA 的特点。种内 4 个个体仅 1 个个体第 530 位碱基较其他序列发生转换 $\text{A} \rightarrow \text{G}$ 。环带库蚊 2 个个体 SJ - N1 和 SJ - N2 的“18S 部分序列 ITS 1 - 5.8S - ITS 2 - 28S 部分序列”序列, GenBank 登陆号分别为 KF499144, KF499145, 长度均为 903 bp , 其中 ITS 1 为 380 bp , ITS 2 为 253 bp , 它们与早期登录的环带库蚊 rDNA 序列 AF453488 所推测的 ITS 1 和 ITS 2 相比, SJ - N1 样本在 ITS 2 序列的第 190, 191 位 GC 碱基上发生缺失; SJ - N2 样本在 ITS 1 序列的第 250 位碱基上发生转换 $\text{T} \rightarrow \text{C}$, 在 ITS 2 序列的第 248、249 位 AC 碱基上发生缺失。环带库蚊 CO I 和 ITS 序列的碱基组成见表 2。

表 1 杂鳞库蚊复组序列信息
Table1 The information of *Culex vishnui* complex

种类 Species	采集地点 Locality	GenBank 序列号 Accession No.	文献出处 Reference
环带库蚊 <i>C. annulus</i>	CO I China: Guizhou	KC876676	自测
	China: Guizhou	KC876677	自测
	China: Guizhou	KC876678	自测
	China: Guizhou	KC876679	自测
	ITS China: Guizhou	AF453488	Unpublished
	China: Guizhou	KF499144	自测
	China: Guizhou	KF499145	自测
杂鳞库蚊 <i>C. vishnui</i>	CO I India: Aimcombu , Kerala	HM769287	Unpublished
	India: Mahananda , West Bengal	HM769286	Unpublished
	India: Pondicherry	AY729973	Kumar , <i>et al.</i> (2007)
	India: Pondicherry	AY917214	Kumar , <i>et al.</i> (2007)
	India: Rameswaram , Tamil Nadu	HM769285	Unpublished
	ITS Japan: Ryukyu Archipelago	AF165900	Toma , <i>et al.</i> (2000)
	Japan: Ryukyu Archipelago	AF165899	Toma , <i>et al.</i> (2000)
伪杂鳞库蚊 <i>C. pseudovishnui</i>	CO I India: Aimcombu , Kerala	HM769284	Unpublished
	India: Malankara , Kerala	HM769283	Unpublished
	India: Pondicherry	AY834248	Unpublished
	India: Tezpur , Assam	HM769282	Kumar , <i>et al.</i> (2007)
	India: Wynad Kerala	EU259303	Unpublished
	ITS Japan: Ryukyu Archipelago	AF165894	Toma , <i>et al.</i> (2000)
	Japan: Ryukyu Archipelago	AF165895	Toma , <i>et al.</i> (2000)
三带喙库蚊 <i>C. tritaeniorhynchus</i>	CO I Japan	AB690856	Unpublished
	Japan: Miyagi Prefecture , Numata City , Koyachi , Shimonogou	AB690845	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Niigata Prefecture , Niigata City , Nishiku , Akatsuka	AB690846	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Ibaraki Prefecture , Kitasoumagun , Tone , Fukawa	AB690847	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Chiba Prefecture , Chiba City , Wakabaku , Noro	AB690848	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Chiba Prefecture , Chiba City , Wakabaku , Noro	AB690849	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Chiba Prefecture , Chiba City , Wakabaku , Noro	AB690850	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Shimane Prefecture , Izumo City , Hirata	AB690851	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Tokushima Prefecture , Komatsushima City , Tatsue , Nogami	AB690852	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Nagasaki Prefecture , Isahaya City , Ogawa	AB690853	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Kumamoto Prefecture , Koshi City , Suya	AB690854	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	Japan: Kagoshima Prefecture , Minamikyushu City	AB690855	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)

续上表

种类 Species	采集地点 Locality	GenBank 序列号 Accession No.	文献出处 Reference
	Japan: Okinawa Prefecture , Ishigaki City , Nosoko	AB690857	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	India: Pondicherry	AY729975	Unpublished
	India: Pondicherry	AY917206	Unpublished
	India: Tamil Nadu	DQ424952	Kuwata , <i>et al.</i> (2007)
	India	FJ372984	Unpublished
	India: Rameswaram , Tamil Nadu	HM638220	Unpublished
	India: Dibru Saikhowa , Assam	HM638221	Unpublished
	India: Dudhiya , West Bengal	HM638222	Unpublished
	India: Garden Reach , West Bengal	HM638223	Unpublished
	India: Aimcombu , Kerala	HM638224	Unpublished
	India: Tezpur , Assam	HM638225	Unpublished
	India: Tezpur , Assam	HM638226	Unpublished
	India: Kumarakom , Kerala	HM638227	Unpublished
	China: Longtang , southern Yunnan Province	JQ728031	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: middle Hainan Province	JQ728059	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: northern Hainan Province	JQ728060	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: middle Hainan Province	JQ728061	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: southern Hainan Province	JQ728062	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: Longtang , southern Yunnan Province	JQ728238	Wang , <i>et al.</i> (2012)
	China: Gaoli , western Yunnan Province	JQ728346	Wang , <i>et al.</i> (2012)
ITS	China: Taiwan	CTU33041	Miller , <i>et al.</i> (1996)
	China: Taiwan	CTU33042	Miller , <i>et al.</i> (1996)
	Japan: Ryukyu Archipelago	AF165896	Toma , <i>et al.</i> (2000)
	Japan: Ryukyu Archipelago	AF165897	Toma , <i>et al.</i> (2000)
	China: Guizhou	EF545204	Unpublished
	China: Guizhou	EF545205	Unpublished
(outgroup)			
<i>Anopheles sinensis</i>	CO I China: Shandong	AY768950	Unpublished
<i>Armigeres subalbatus</i>	India	DQ424958	Unpublished
<i>Culex quinquefasciatus</i>	India	DQ267689	Unpublished
<i>Anopheles albimanus</i>	Unspecified	KC354824	Unpublished
<i>Aedes albopictus</i>	ITS (Stratagene , La Jolla , CA , USA offered)	L22060	Kjer , <i>et al.</i> (1994)
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Mexico: Nuevo Leon State	U49735	Miller , <i>et al.</i> (1997)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	USA: California , San Diego Co	GU562872	Kent , <i>et al.</i> (2010)
<i>Anopheles albimanu</i>	Unspecified	L78065	Unpublished

表 2 环带库蚊 CO I 和 ITS 序列的碱基组成

Table 2 The base composition of CO I and ITS sequences of *Culex annulus*

序列	GC 含量 (%)	转换率 (%)	颠换率 (%)	保守位点	变异位点	简约信息位点
Nucleotide	GC content	Transitions pairs	Transversions pairs	Conserved sites	Variable sites	Parsimony informative sites
CO I	32.6	11.0	8.0	351	69	52
ITS	55.7	23.0	18.0	553	115	84

2.2 分子系统发育树

使用 Jukes - Cantor 模型分别估算 CO I 和 ITS 序列的平均 K2P 距离, P 值结果分别为 0.052 和 0.354, $P < 1$, 表示三组核酸序列数据均适合构建

NJ 树。使用 Model test 3.7 估算构建 ML 树的最优模型, 基于 CO I 和 ITS 序列的最优建树模型均为 GTR + I + G, 所以以此模型构建 ML 树。Bootstrap = 1000。结果如图 1、图 2 所示。

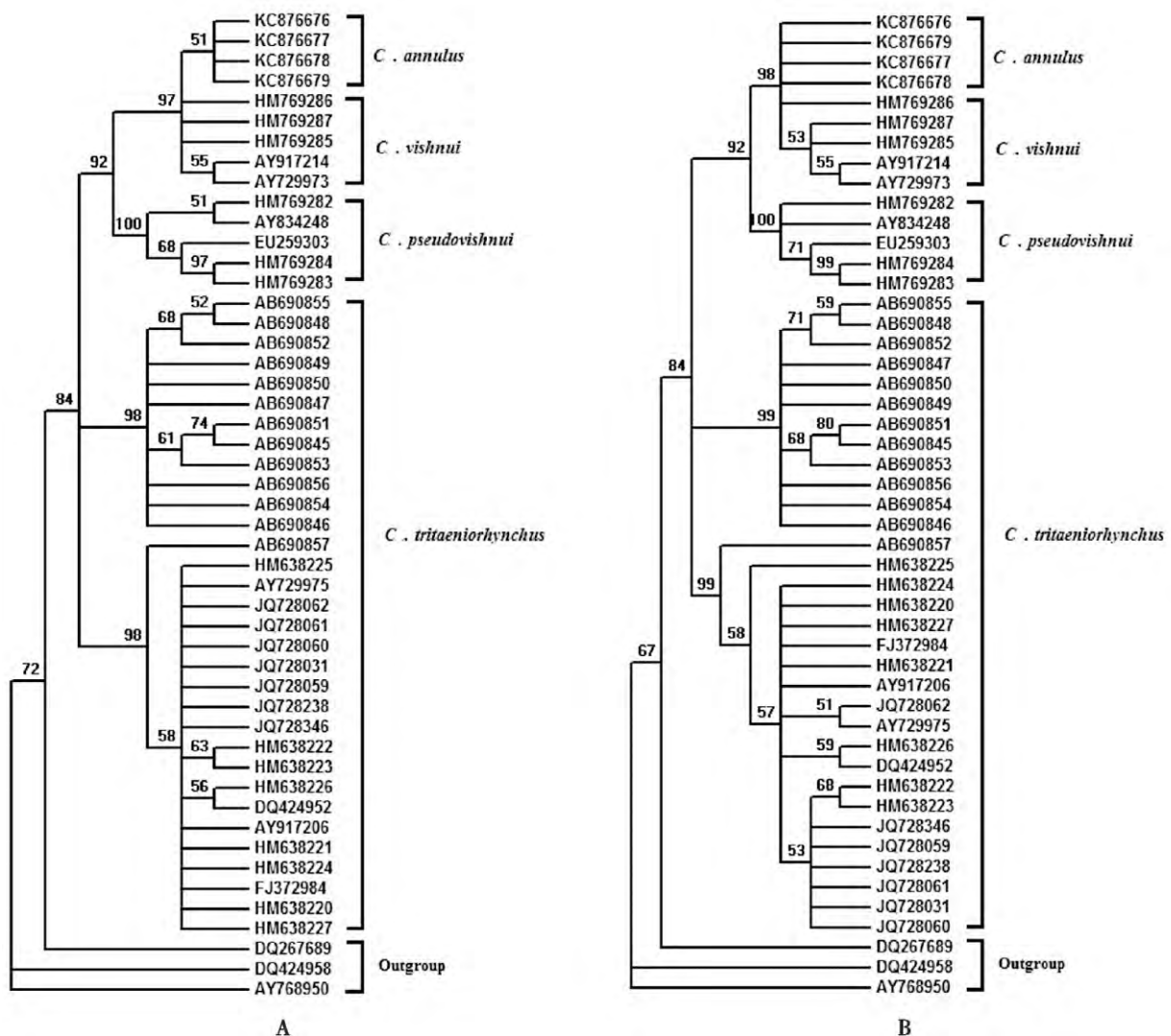


图 1 基于 CO I 序列构建的杂鳞库蚊复组系统发育树, 图 A 最大似然法 (ML)、图 B 邻接法 (NJ), 置信度为 50%

Fig. 1 Maximum-likelihood (phylogenies A) and Neighbor-Joining (phylogenies B) trees for the *Culex vishnui* complex are based on CO I gene, with cut-off value of 50%

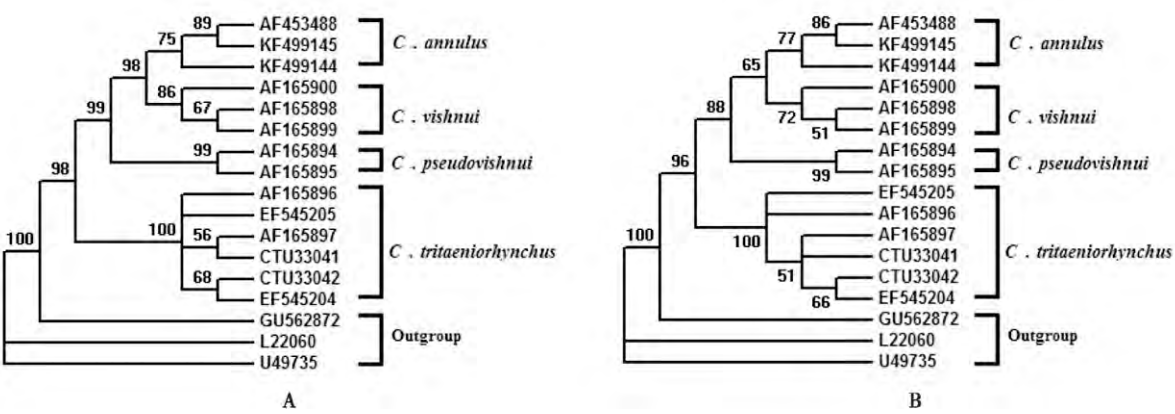


图2 基于 ITS 序列构建的杂鳞库蚊复组系统发育树，图 A 最大似然法（ML）、图 B 邻接法（NJ），置信度为 50%
Fig. 2 Maximum-likelihood (phylogenies A) and Neighbor-Joining (phylogenies B) trees for the *Culex vishnui* complex are based on ITS sequence, with cut-off value of 50%

2.3 基于 CO I 序列的杂鳞库蚊复组的 K2P 距离

使用 CO I 序列计算杂鳞库蚊复组的 K2P 距离

并生成表格，随后以种为单元统计数据，结果如表 3 所示。

表 3 基于 CO I 序列的杂鳞库蚊复组的 K2P 距离（%）
Table 3 K2P distance base on CO I sequences of *Culex vishnui* complex

物种 Species	环带库蚊 <i>C. annulus</i>	杂鳞库蚊 <i>C. vishnui</i>	伪杂鳞库蚊 <i>C. pseudovishnui</i>	三带喙库蚊 <i>C. tritaeniorhynchus</i>
环带库蚊 <i>C. annulus</i>	0			
杂鳞库蚊 <i>C. vishnui</i>	0.24 – 0.72	0 – 1.45		
伪杂鳞库蚊 <i>C. pseudovishnui</i>	4.41 – 5.96	4.67 – 6.74	0.48 – 1.94	
三带喙库蚊 <i>C. tritaeniorhynchus</i>	4.92 – 6.73	5.17 – 7.26	6.98 – 9.68	0 – 6.76

2.4 基于 CO I 序列的三带喙库蚊的 K2P 距离

三带喙库蚊的 CO I 序列采集自日本、中国和印度各地区，计算它们之间的 K2P 距离，结果如表 4。

3 结论与讨论

3.1 关于分子发生树

使用 CO I 和 ITS 序列构建的 ML 树和 NJ 树（见图 1、图 2），具有基本一致的拓扑结构。总的来看，杂鳞库蚊复组构成一单系群，各个种分别聚集，互为独立的种，这与形态学分类的结果一致。其中环带库蚊和杂鳞库蚊总能聚成一支，该分支与伪杂鳞库蚊分支互为姐妹群，前三者形成的分支与三带喙库蚊分支互为姐妹群。可见环带库蚊和杂鳞库蚊享有更近的节点，这说明它们享有更近的假想祖先，拥有更近的亲缘关系。同理，它们与伪杂鳞库蚊的亲缘关系较近，而与三带喙

库蚊较远。
其次，环带库蚊与杂鳞库蚊聚类的分支更接近树的端部，说明它们发生分化的时间较晚；三带喙库蚊分支最接近树的基部，说明三带喙库蚊是杂鳞库蚊复组内最早发生分化的种。

再次，CO I 分子系统树显示三带喙库蚊分为两个大支，一支由登录号为 AB690845 – AB690855 的样本构成，采集于日本各地区，另一支采集于中国和印度。这两大支与杂鳞库蚊复组的其他三个种的分支互为姐妹群，提示日本的三带喙库蚊有种下，甚至种级分化的趋势。

3.2 关于种间 K2P 距离

Hebert 等（2002），通过统计 7 属共 200 种鳞翅目昆虫 CO I 序列的 K2P 距离，提出在分子水平上界定鳞翅目的种间 K2P 距离是 >3%。这一结果在他们的实践中得到 100% 的成功，因此他们认为这种方法可以推广用于其他物种的种的鉴定。Wang 等（2012）出于同样的思路，使用 CO I 序

Table 4 K2P distance base on CO I sequences of *Culex tritaeniorhynchus*[illegible]

列对中国常见蚊类进行鉴定。他们统计了 15 属 122 种蚊类 CO I 序列的 K2P 距离, 并绘制分子发生树 (分为按蚊属、库蚊属和其他蚊类三棵树)。结果表明, 超过 98% 的蚊类遵循种间 K2P 距离 $> 2\%$, 而种内 K2P 距离 $< 2\%$ 的规律, 其中包括隶属于杂鳞库蚊复组的三带喙库蚊。综上我们推测, CO I 序列的种间 K2P 距离 2% , 可以作为杂鳞库蚊复组在分子水平上的定种阈值。

如表 3 所示, 杂鳞库蚊和环带库蚊的 K2P 距离是 $0.24\% - 0.72\%$, 远小于 2% (低了一个数量级), 结果支持“环带库蚊是杂鳞库蚊的同物异名”这一观点。由于杂鳞库蚊与环带库蚊报告于同一期期刊, 但因为报告杂鳞库蚊的篇幅 (355 页) 略前于环带库蚊的 (358 页) (Reuben, 1969), 所以依照国际命名法规, 将环带库蚊改称为杂鳞库蚊是可取的。

此外, 就种间 K2P 距离来说, 杂鳞库蚊 (含环带库蚊) 与伪杂鳞库蚊、三带喙库蚊的 K2P 距离分别为 $4.41\% - 6.74\%$ 、 $4.92\% - 7.26\%$; 伪杂鳞库蚊和三带喙库蚊的 K2P 距离为 $6.98\% - 9.68\%$, 结果均大于 2% 两倍以上, 再次证明杂鳞库蚊复组 3 个亲缘种互为独立的种。

就种内 K2P 距离而言, 杂鳞库蚊样本采集于印度大陆多处, 环带库蚊样本采自于中国贵阳, 它们的种内 K2P 距离分别为 0.53% 和 0 ; 伪杂鳞库蚊采自于印度大陆和日本各岛, 它的种内 K2P 距离为 1.36% 。上述两个种的种内 K2P 距离都未超过 2% 。

例外的是三带喙库蚊 (如表 4 所示), 它们采集于中国、印度和日本, 种内 K2P 距离在 $0 - 6.76\%$, 整体来看并不遵守“ 2% 规律”, 但实际上主要是来自于日本的三带喙库蚊打破了这一规律。按照 CO I 分子树的结构, 将三带喙库蚊划分为日本产地和中、印产地两个类群, 两个类群内部的 K2P 距离分别为 $0.48\% - 2.68\%$, 和 $0 - 2.68\%$, 基本遵循“ 2% 规律”, 属于种内的变化范围。但是日本产地的类群, 与中、印产地的 K2P 距离, 即两个类群之间的 K2P 距离为 $4.17\% - 6.76\%$ 。这一数值近似于杂鳞库蚊 (含环带库蚊) 与伪杂鳞库蚊之间的 K2P 距离 ($4.41\% - 6.74\%$), 即种间的分化距离。综上, 我们推测日本的三带喙库蚊有种下, 甚至种级分化的趋势。形成这一结果的可能原因是, 日本列岛地处欧亚大陆板块、北美洲板块、太平洋板块及菲律宾板

块 4 个板块的交界处, 地形地貌比较复杂, 此外它与中国、印度所处的欧亚大陆有海洋间隔, 为适应环境, 三带喙库蚊在扩散的途中产生较大的变异, 甚至发生种下或种级的分化。不过更确凿的结论还需要进一步调查和实验研究才能获得。

参考文献 (References)

- Bram RA. Contributions to the mosquito fauna of southeast Asia - II. The genus *Culex* in Thailand (Diptera: Culicidae) [J]. *Contributions of the American Entomological Institute* (Ann Arbor), 1967, 2 (1): 1 - 296.
- Colless DH. Note on the culicine mosquitoes of Singapore [J]. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 1957, 51: 87 - 101.
- Chen HB. Study on the *Culex vishnui* subgroup in China with discussions on the taxonomic status of *C. neovishnui* Lien, *C. permixtus* Hsieh & Liao and *C. cheni* Ho. [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1980, 23 (4): 434 - 440. [陈汉彬. 我国杂鳞库蚊亚组的初步研究 [J]. 昆虫学报, 1980, 23 (4): 434 - 440]
- Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Tewari SC, et al. Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium [J]. *Trop. Biomed.*, 2010, 27 (1): 47 - 53.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *The Royal Society*, 2002, 270: 313 - 321.
- Kent RJ, Deus S, Williams M, et al. Development of a multiplexed polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) assay to identify common members of the subgenera *Culex* (*Culex*) and *Culex* (*Phenacomyia*) in Guatemala [J]. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010, 83 (2): 285 - 291.
- Kjer KM, Baldrige GD, Fallon AM. Mosquito large subunit ribosomal RNA: Simultaneous alignment of primary and secondary structure [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1217 (2): 147 - 155.
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, et al. DNA barcodes can distinguish species of indian mosquitoes (Diptera: Culicidae) [J]. *J. Med. Entomol.*, 2007, 44 (1): 1 - 7.
- Kuwata R, Hoshino K, Isawa H, et al. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2012, 48 (6): 369 - 376.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA [J]. *Insect Mol. Biol.*, 1996, 5 (2): 93 - 107.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences. (Diptera: Nematocera) [J]. *Insect Mol. Biol.*, 1997, 6 (2): 105 - 114.
- Miyagi I and Iha S. Notes on *Culex* (*Culex*) *neovishnui* Lien, 1968 from the Ryukyus and Japan proper (Diptera: Culicidae) [J]. *Trop. Med. (Nagasaki)*, 1970, 12: 71 - 78.

- Reuben R. A re-description of *Culex vishnui* theo with notes on *C. psedovishnui* Colless and *C. tritaeniorhynchus* Giles from southern India [J]. *Bull. Entomol. Res.*, 1969, 58: 643–652.
- Sirivanakarn S. The systematics of *Culex vishnui* complex in southeast Asia with the diagnosis of three common species (Diptera: Culicidae) [J]. *Mosquito Systematics*, 1975, 7 (1): 69–85.
- Sirivanakarn S. Medical Entomology Studies – III. A Revision of the Subgenus *Culex* in the Oriental Region (Diptera: Culicidae) [C]. *Contributions of the American Entomological Institute*, 1976, 12 (2): 1–186.
- Toma T, Miyagi I, Crabtree MB, et al. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: Development of a species – diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers [J]. *J. Med. Entomol.*, 2000, 37 (4): 554–558.
- Wang G, Li C, Guo X, et al. Identifying the main mosquito species in china based on DNA barcoding [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (10): 1–11.
- Xie LG, Liao DX. A list of amoy mosquitoes with the description of a new species and a new variety [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1956, 6 (1): 123–128. [谢麟阁, 廖定西. 厦门蚊虫名录及一新种和变种的描述. 昆虫学报, 1956, 6 (1): 123–128]
- Yang M, Chen HB. Research on 5' end sequences of 28S rRNA gene of *Culex vishnui* complex [J]. *Guizhou Science*, 2003, 21 (1–2): 185–187. [杨明, 陈汉彬. 杂鳞库蚊复组 28S rRNA 基因 5'端序列研究 [J]. 贵州科学, 2003, 21 (1–2): 185–187]