

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.05.004

PCR-RFLP 鉴定我国黑热病流行区 6 种常见蛉种

周正斌¹, 张 仪¹, 朱淮民², 施文琦¹, 金长发¹, 危芙蓉¹, 兰勤娴¹

摘要:目的 建立鉴定我国黑热病流行区 6 种常见蛉种的 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphisms) 方法。方法 使用一对通用引物扩增线粒体 COI 基因, 比较中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉和歌乐山司蛉线粒体 COI 基因序列, 寻找合适的限制性内切酶酶切位点, 使用 *TaqI*、*PstI* 内切酶双酶切, 通过电泳片段大小鉴别上述 6 种蛉种。结果 长管白蛉、中华白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉和鳞喙司蛉酶切片段呈现长度不同的种特异条带, 可以将上述我国常见的 6 种蛉种区分开来。结论 基于 COI 基因序列差异建立的 PCR-RFLP 方法简便易行可靠, 具有较高的灵敏度和特异性, 可用于我国黑热病流行区 6 种常见蛉种的分类鉴定。

关键词: PCR-RFLP; 白蛉; 黑热病; 媒介

中图分类号: R382

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2014)05-0448-05

Typing 6 common sandflies species from endemic areas of leishmaniasis in China by PCR-RFLP method

ZHOU Zheng-bin¹, ZHANG Yi¹, ZHU Huai-min², SHI Wen-qi¹,
JIN Chang-fa¹, WEI Fu-rong¹, LAN Qin-xian¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention / Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH / WHO Collaborating Center of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China;
2. Department of Pathogenic Biology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: A PCR-RFLP method typing the prevalent sandflies from leishmaniasis endemic areas in China was established in our study. We designed a pair of universal primer for 6 species of sandflies. Species-specific differences encountered in the nucleotide sequences of the COI gene were used to design a PCR-RFLP assay for the identification of *Phlebotomus chinensis*, *Phlebotomus longiductus*, *Phlebotomus alexandri*, *Phlebotomus wui*, *Sergentomyia koloshanensis* and *Sergentomyia squamirostris*. The specific patterns were developed by double digesting amplified COI gene with *TaqI* and *PstI*. The PCR-RFLP assay based on COI gene diversity to distinguish 6 species of sandflies was found to be highly specific, sensitive and simple.

KEY WORDS: PCR-restriction fragment length polymorphisms; *Phlebotomus*; leishmaniasis; vector

Supported by the 12th Five-Year Plan for National Major Program (No. 2012ZX10004219)

Corresponding author: Zhang Yi, Email: zhang1972003@yahoo.com.cn

白蛉属双翅目毛蛉科白蛉亚科 (*Phlebotomi-nae*), 是一类体小多毛的吸血昆虫, 全世界已知 800 多种, 其中约 10% 蛉种已被证实可传播利什曼病等多种疾病^[1]。特定的蛉种只能传播特定种类的利什曼原虫, 因此在流行区及周边调查蛉种分布是预测黑热病的传播和扩散风险非常重要指标^[2]。黑热

病是我国重要的寄生虫病之一, 通过 50 年代的大规模防治, 东部平原地带的黑热病达到清除标准。而西部 6 省、区 (新疆、甘肃、四川、山西、陕西、内蒙古) 的新发病例从未间断。近 5 年内, 每年新发生的病例数大致在 400 例左右, 主要集中在南疆和陇南川西北地区^[3]。

我国已知黑热病媒介白蛉有 4 种, 即中华白蛉 (*Phlebotomus chinensis* Newstead, 1916)、长管白蛉 (*Phlebotomus longiductus* Nitzulescu, 1931)、吴氏白蛉 (*Phlebotomus wui* Yang & Xiong, 1965)、亚历山大白蛉 (*Phlebotomus alexandri* Sinton,

国家十二五重大专项 (No. 2012ZX10004219) 资助

通讯作者: 张仪, Email: zhang1972003@163.com

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025;
2. 第二军医大学病原生物教研室, 上海 200433

1928)。歌乐山司蛉(*Sergentomyia koloshanensis* Yao et Wu, 1946)和鳞喙司蛉(*Sergentomyia squamirostris* Newstead, 1923)均为野栖蛉种,偶尔可飞往居民点的院外墙面上活动,主要吸取蟾蜍、蜥蜴等冷血动物的血液,不传播黑热病。传统蛉种鉴别方法是基于成蛉外部形态内部结构特征。白蛉个体微小不易解剖,而且个体间形态具有高度的变异度^[4],因此要求镜检人员具有较高的技能和丰富的经验。目前我国白蛉形态学分类人才青黄不接,而分子生物学鉴定方法简单准确,近年来得到了快速发展。

1 材料与方 法

1.1 白蛉样本来源 所用白蛉样本均为人工光诱捕法采集,中华白蛉采自甘肃省文县马营村山洞 2♀、17♂,以及四川省九寨沟县永丰乡海拔 1 520 m 山洞 2♀、18♂;歌乐山司蛉采自甘肃省文县马营村山洞 2♂;长管白蛉采自新疆喀什市郊伯什克拉木乡人房外墙 1♀、20♂;吴氏白蛉采自新疆喀什市郊伯什克拉木乡人房外墙 3♀、9♂,以及新疆喀什伽师县三乡人房外墙 1♀、10♂;亚历山大白蛉采自新疆库尔勒哈满沟 1♀、1♂;鳞喙司蛉采自江西彭泽县野外山洞 5♀、7♂。

1.2 试剂与主要仪器 Veriti™ PCR 仪(ABI 公司);Tanon-2500 全自动数码凝胶成像仪(上海天能科技有限公司);SUB2CEI IGT 电泳槽、Universal 型电泳仪(Bio-Rad 公司);德国 Qiagen DNA 提取试剂盒(DNeasy Tissue kit)、DNA Marker 为北京天根公司产品;ExTaq DNA 聚合酶、10×buffer、dNTPs 均购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *TaqI*、*PstI* 及 buffer 购自 fermentas 公司;EB 替代品染料 GoodView 购自北京鼎国生物技术有限公司;琼脂糖(Bio-west Agarose)为西班牙 Biowest 公司产品;引物由上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 白蛉形态学鉴定 取白蛉的头部和尾部,以 10% KOH 消化后,根据白蛉的咽甲、受精囊或者雄性尾器特征鉴定其种类^[5-6]。余下部分用于提取基因组 DNA。

1.4 白蛉样本 DNA 提取扩增与测序 按照 Krueger 等^[7]方法单只白蛉提取基因组 DNA,扩增线粒体 COI 基因按照 Hebert 等^[8]方法。对采自鳞喙司蛉进行扩增,PCR 产物割胶纯化(凝胶回收试剂盒 Qiagen 公司),用四色荧光标记双脱氧链终止法测序(ABI 3730XL 全自动测序仪,上海生工公司)。

1.5 引物设计 为提高实验灵敏度和特异性,本研究利用 DNASTar 软件对 Hebert 等^[8]使用引物进行了优化,上游引物为 Spf1-28: 5'-ATTCAACTAATCATAAAGATATTG-GAAC-3', 下游引物为 Spr720-6954: 5'-TAAACTTCTG-GATGTCTAAAAAATCA-3'。

1.6 限制性内切酶酶切位点 用 DNSP 软件包筛选单倍型,获得鳞喙司蛉 9 种基因单倍型。并从 Gene Bank 中获取

中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉 COI 基因序列,序列号为 KF137543-KF137560。用 DNASTar 软件比对中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉 COI 基因序列进行序列比对,并在中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉、鳞喙司蛉种间差异区寻找合适的酶切位点以鉴别上述 6 种蛉种。

1.7 蛉种鉴别 PCR-RFLP 经优化实验条件,确定 PCR 50 μL 扩增体系:10×PCR 缓冲液 5 μL(含 Mg²⁺),2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,上游引物(Spf1-28)1.5 μL(10 μmol/L),下游引物(Spr709-684) 1.5 μL(10 μmol/L),牛血清白蛋白(40 mg/mL) 1 μL,0.36 μL ExTaq 聚合酶(5 U/μL),DNA 模板 1.5 μL,用 ddH₂O 补足体积至 50 μL。置于 PCR 仪上按以下程序进行扩增:95℃ 3 min;95℃ 25 s, 45℃ 25 s, 72℃ 50 s,共 40 个循环;72℃ 延伸 7 min。酶切体系:ddH₂O 6 μL,10×PCR 缓冲液 2 μL,PCR 产物 10 μL,*PstI* 1 μL,37℃ 水浴 20 min,之后加入 *TaqI* 1 μL,65℃ 水浴 30 min。经 2% 浓度琼脂糖凝胶电泳,观察扩增结果。

2 结 果

2.1 限制性内切酶酶切位点筛选结果 经 DNASTar 软件比对中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉 COI 基因序列进行序列比对,在中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉、鳞喙司蛉种间差异区寻找到合适的酶切位点,见表 1。

2.2 蛉种鉴别 PCR-RFLP 方法的结果 中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉和鳞喙司蛉 6 蛉种具有不同的 *TaqI*、*PstI* 双酶切酶切位点,经 PCR-RFLP 6 蛉种产生长度不同特异性限制性酶切片段,2% 浓度琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

2.3 两种方法蛉种鉴定结果比较 对采自上述不同采样点的 6 种共 99 只白蛉进行了形态学鉴定方法与 PCR-RFLP 方法鉴定比较。结果 PCR-RFLP 准确区分了中华白蛉、长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉、歌乐山司蛉和鳞喙司蛉,两种方法蛉种鉴定结果见表 2。

3 讨 论

目前我国黑热病仅有新疆、甘肃、四川、山西、陕西、内蒙古等 6 省、区有新病例发生^[3]。

新疆南疆地区包括巴音郭楞蒙古自治州、克孜勒苏柯尔克孜自治州、阿克苏地区、喀什地区、和田地区、图木舒克市等。从 50 年代至今新疆共发现白蛉 2 属 10 种,其中分布于南疆的蛉种有白蛉属的长管白蛉、吴氏白蛉、亚历山大白蛉以及司蛉属的微小司蛉新疆亚种(*Sergentomyia sinkiangensis* Ting

表 1 限制性内切酶酶切位点信息

Tab. 1 Information of restriction digested cutting sites

蛉种 Sandflies species	<i>TaqI</i> 酶切片段位点 <i>TagI</i> position of cutting sites	<i>PstI</i> 酶切片段位点 <i>PstI</i> position of cutting sites	酶切片段长度 Length of restriction digested fragments bp	可见片段长度与条数 No. bands observed in 2% (wt: vol) agarose gel
中华白蛉	90, 264, 332, 516, 616	NO	68, 90, 100, 104, 174, 184	2 bands of 100 and 184 bp
长管白蛉	90, 264, 516, 616	NO	90, 100, 104, 174, 252	3 bands of 100, 174 and 252 bp
吴氏白蛉	NO	NO	720	1 band of 720 bp
亚历山大白蛉	90, 264, 616	NO	90, 104, 174, 352	3 bands of 104, 174 and 352 bp
歌乐山司蛉	90, 264, 616	555	61, 90, 104, 174, 291	3 bands of 104, 174 and 291 bp
鳞喙司蛉	90, 516	NO	90, 204, 426	3 bands of 90, 204 and 426 bp

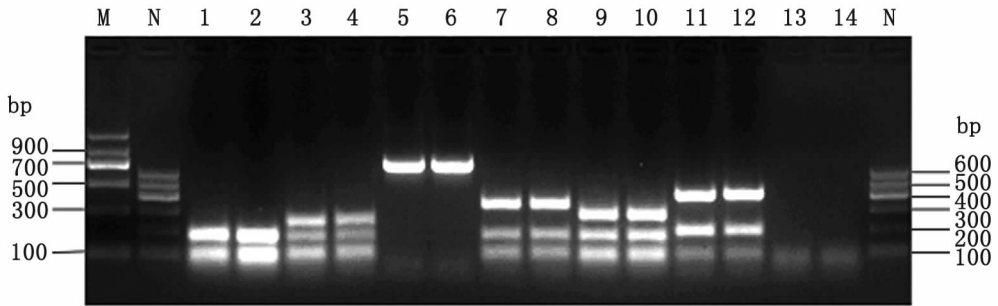


图 1 PCR-RFLP 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 PCR-RFLP results of agarose gel electrophoresis

M: DNA Marker II; N: DNA Marker I; 1-2: *Ph. chinensis*; 3-4: *Ph. longiductus*; 5-6: *Ph. wui*; 7-8: *Ph. alexandri*; 9-10: *S. koloshanensis*; 11-12: *S. squamirostris*; 13-14: Negative control (ddH₂O).

表 2 形态学鉴定方法与 PCR-RFLP 方法蛉种鉴定结果比较

Tab. 2 Identification result of sandflies species by morphologic method and PCR-RFLP assay

序号 Serial no.	形态学鉴定 Morphological identification	鉴定数量 Nos. identified	PCR 鉴定 PCR identification
1	中华白蛉	(4 ♀, 35 ♂)	39 中华白蛉
2	长管白蛉	(1 ♀, 20 ♂)	21 长管白蛉
3	吴氏白蛉	(4 ♀, 19 ♂)	23 吴氏白蛉
4	亚历山大白蛉	(1 ♀, 1 ♂)	2 亚历山大白蛉
5	歌乐山司蛉	(2 ♂)	2 歌乐山司蛉
6	鳞喙司蛉	(5 ♀, 7 ♂)	12 鳞喙司蛉

et Ho, 1962)^[9]。微小司蛉新疆亚种为野生野栖种类,很少进入居民点,数量很少^[10-11],故不做常见蛉种研究。

管立人等^[12]研究发现新疆不同的地理景观地带,有 1-2 种对该区环境有较强适应性的代表蛉种。但南疆地理景观之间分布复杂,如南疆塔里木盆地无论新老绿洲都处于荒漠景观的环绕之中。在新开垦的绿洲内部农田之间还保留着暂时无法开垦的大片荒漠景观。在古老的绿洲中虽然村庄毗邻、人口密集,但也存在着由河床、丘陵地和一些因地势

高亢而无法灌溉的荒漠景观。因此在新老绿洲中都存在着不同生境的镶嵌现象^[13]。

陇南和川西北地区,管立人等^[14]报告在甘肃文县和四川南坪的中华白蛉存在 2/III-XV 和 2/IX-VIII,1/IX-XV 两种触角列式类型,但其它形态均无差异,前者暂称为中华白蛉甲型,后者称为中华白蛉乙型。并指出中华白蛉乙型随海拔高度递增,其比例逐步增大。冷延家等于 1983 年将中华白蛉乙型定为四川白蛉新种 (*Phlebotomus sichuanensis*)^[15]。之后,熊光华等观察到无论从自然界捕获

还是实验室孵出的两型中华白蛉都可以相互交配。并且发现采自海拔 2 000 m 以上的中华白蛉,经饲养羽化的第 2 代雄蛉,触角列式有的呈 2//Ⅲ-XV,有的则呈 2/Ⅲ-VIII,1/IX-XV,表明该形态特征并不稳定,无分类意义^[16],赵嘉惠等用随机扩增多态性 DNA—聚合酶链反应(RAPD-PCR)方法对山西吉县、陕西宜川以及四川南坪甲、乙两型的中华白蛉作了比较研究,结果表明四川南坪甲、乙两型中华白蛉两者亲缘关系最近^[17]。近年,张丽等通过核糖体 DNA 第二转录隔 2 区(rDNA-ITS2)和线粒体 DNA 细胞色素 B(mtDNA-cytb)基因部分序列的分析,认为采自河南、陕西、甘肃和四川的中华白蛉,其中也包括了分布在高海拔地带的“四川白蛉”,虽在形态和分子水平已出现明显遗传分化,但未达到新种的分化水平^[18]。综上研究结果表明,四川白蛉是中华白蛉的同物异名。

鳞喙司蛉是我国分布最广的一种司蛉,在陇南山地 2 县有分布。歌乐山司蛉在陇南 3 县均有分布,其中该蛉在文县数量颇多,占捕获总数的 13.4% (758/5 653),武都县和舟曲县则仅有少量分布^[19]。由于在陇南和川西北地区没能采集到鳞喙司蛉,试验中使用了江西彭泽采集的鳞喙司蛉样本。熊光华等对甘肃文县四川南坪县白蛉进行了调查采集,共采集到 3 属 4 种,中华白蛉为绝对优势种占 95.7%,其余 3 种都是司蛉属司蛉,数量少,鳞喙司蛉 1.7%,孙氏司蛉 2.1%,歌乐山司蛉 0.5%^[20]。

土门白蛉、孙氏司蛉为野栖蛉种,90 年代之前在陇南和川西北地区曾有零星报道,但数量较少,加之生态环境变化,已很难采集到,在此不做常见蛉种研究。

从预防医学的角度来讲,研究白蛉的主要目的是确定黑热病传播媒介种类以及它的分布规律和生态,为防制奠定基础。传统白蛉形态学分类以成蛉外部形态与内部结构为依据,其中白蛉腹部背面第 2~6 节的毛簇形式,雌蛉的口甲和色板、咽甲、受精囊,雄蛉的口甲及色板、咽甲、雄外生殖器均为蛉种鉴定的重要依据。但目前我国黑热病是被严重忽略的热带病之一,防治经费不足,白蛉形态学分类人才培养周期长难度大,随着老一辈形态学分类工作者的陆续退休,传统形态学分类人才青黄不接。这给黑热病防治工作带来许多困难。

近年来分子生物学鉴定方法得到了快速发展,国外 Alam 等^[21]以 18S rRNA 基因为靶基因,采用 PCR-RFLP 方法成功鉴别了孟加拉国麦门辛地区的 *P. argentipes*、*P. papatasi* 和 2 种司蛉。Ti-

wary 等^[22]同样以 18S rRNA 基因为靶基因,采用 PCR-RFLP 方法成功鉴别了印度墨沙发坡地区的 *P. argentipes*、*P. papatasi*、*S. babu* 3 种蛉种。Aransay 等^[23]使用 PCR-RFLP 方法成功区分了希腊和塞浦路斯的 7 种蛉种。本研究使用的 TaqI、PstI 两种内切酶均为常用限制性内切酶,价格低廉,大大降低了实验成本。本研究建立的 PCR-RFLP 方法可鉴别我国黑热病流行区的 6 种常见蛉种,该方法可靠、简便、易行,可作为传统形态学分类方法的有益补充。

参考文献:

- [1]Latrofa MS, Annoscia G, Dantas-Torres F, et al. Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region[J]. *Vet Parasitol*, 2012, 184(2-4): 267-270. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.08.031
- [2]Bates PA. Transmission of *Leishmania metacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies[J]. *Int J Parasitol*, 2007, 37(10): 1097-1106. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- [3]Gu DA, Jin CF, Zhang Y. Present situation and perspective of leishmaniasis and its vector sandfly control[J]. *Int J Med Parasit Dis*, 2006, 33(5): 236-238. (in Chinese)
顾灯安,张仪,兰勤嫻. 我国 4 种白蛉的核糖体内转录间隔 2 区 PCR-RFLP 多态性分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012,30(2): 100-108.
- [4]Kumar NP, Srinivasan R, Jambulingam P. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India[J]. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12(3): 414-420. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2012.03117.x
- [5]Chai JJ, Guan LR. *Leishmaniasis and Phlebotomine Sandflies in Xinjiang Uygur Autonomous Region, People's Republic of China* [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House, 2006: 293-348. (in Chinese)
柴君杰,管立人. 新疆维吾尔自治区的利什曼病与白蛉[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,2006: 293-348.
- [6]Xiong GH, Jin CF. Sandfly fauna in north-west China[J]. *Entomotaxonomia*, 1981, 3(4): 287-296. (in Chinese)
熊光华,金长发. 中国西北白蛉区系[J]. *昆虫分类学报*, 1981,3(4): 287-296.
- [7]Krueger A, Hennings IC. Molecular phylogenetics of blackflies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(1): 83-90. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.11.007
- [8]Hebert PD, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(41): 14812-14817. DOI: 10.1073/pnas.0406166101
- [9]Zuo XP, Chai JJ, Guan LR. Forty-year research of Phlebotomine sandflies in Xinjiang, China (1958-1998) [J]. *End Dis Bull*, 1998, 13(4): 97-102. (in Chinese)
左新平,柴君杰,管立人. 四十年来新疆维吾尔自治区白蛉的调

- 查研究[J]. 地方病通报, 1998, 13(4): 97-102.
- [10] Wang G, Chai JJ, Lin JS, et al. A Study on the Bionomics of sandflies in oasis Area of Kaxgar, Xinjiang[J]. End Dis Bull, 1992, 7(1): 72-76. (in Chinese)
王革, 柴君杰, 李建设, 等. 新疆喀什绿洲地区白蛉生态学的进一步研究[J]. 地方病通报, 1992, 7(1): 72-76.
- [11] Gu DA, Zuo XP, Yisilayin O, et al. Investigation on transmitting vectors of visceral leishmaniasis in Jiashi country, Xinjiang [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2010, 28(4): 280-283. (in Chinese)
顾灯安, 左新平, 伊斯拉音·乌斯曼, 等. 新疆伽师县内脏利什曼病媒介白蛉调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(4): 280-283.
- [12] Guan LR, Chai JJ, Yang LP. Relationship between geographical distribution of sandflies and landscape features in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1996, 5(1): 26-32. (in Chinese)
管立人, 柴君杰, 杨利普. 新疆维吾尔自治区白蛉的地域分布与地理景观的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 5(1): 26-32.
- [13] Chai JJ. A comment on some epidemiological problems in Kala-azar control in South Xinjiang[J]. End Dis Bull, 1997, 12(2): 64-66. (in Chinese)
柴君杰. 新疆南部地区黑热病防治中的若干流行病学问题[J]. 地方病通报, 1997, 12(2): 64-66.
- [14] Guan LR, Wang J, Liu PZ, et al. The bionomics of *Phlebotomus chinensis* in the mountainous regions of southern Kansu and the loess plateau of northern Shansi [J]. Acta Entomol Sin, 1980, 23(1): 25-31. (in Chinese)
管立人, 王捷, 刘丕宗, 等. 甘肃南部山区及陕北黄土高原地区中华白蛉生态的研究[J]. 昆虫学报, 1980, 23(1): 25-31.
- [15] Leng YJ, Yin ZC. The taxonomy of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Sichuan Province, China, with descriptions of two species, *Phlebotomus* (*Adlerius*) *sichuanensis* sp. n. and *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *zhengjiani* sp. n [J]. Ann Trop Med Parasitol, 1983, 77(4): 421-431.
- [16] Xiong GH, Jin CF, Hong YM, et al. Further study on the type of sandfly *P. chinensis* in southern Gansu and northern Sichuan [J]. End Dis Bull, 1990, 5(1): 53-60. (in Chinese)
熊光华, 金长发, 洪玉梅, 等. 陇南川北中华白蛉种型的进一步研究[J]. 地方病通报, 1990, 5(1): 53-60.
- [17] Zhao JH, Qiao ZD, Yin GR, et al. The effect of random amplified polymorphic DNA of *Phlebotomus chinensis* by geographical position[J]. Chin J Zoonoses, 1998, 14(6): 27-30. (in Chinese)
赵嘉惠, 乔忠东, 殷国荣, 等. 地理位置对中华白蛉基因组 DNA 随机扩增多态性的影响[J]. 中国人兽共患杂志, 1998, 14(6): 27-30.
- [18] Zhang L, Ma YJ. Identification of *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) inferred by morphological characters and molecular markers[J]. Entomotaxonomia, 2012, 34(1): 71-80. (in Chinese)
张丽, 马雅军. 基于形态和分子特征的中华白蛉分类研究(双翅目: 毛蠓科)[J]. 昆虫分类学报, 2012, 34(1): 71-80.
- [19] Chen SB, Guan LR, Li F, et al. The fauna of *Phlebotomus* sandflies in Gansu Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(5): 314-315. (in Chinese)
陈生帮, 管立人, 李凡, 等. 甘肃省的白蛉区系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(5): 314-315.
- [20] Xiong GH, Jin CF, Chen XZ, et al. Studies on the bionomics of sandfly, *Phlebotomus chinensis* Newstead, 1916, and relation to the visceral leishmaniasis in southern Gansu and northern Sichuan, China [J]. Wuyi Sci J, 1992, 9: 7-18. (in Chinese)
熊光华, 金长发, 陈信忠, 等. 陇南川北中华白蛉生物学及其与人、犬内脏利什曼病关系的研究[J]. 武夷科学, 1992, 9: 7-18.
- [21] Alam MS, Kato H, Fukushige M, et al. Application of RFLP-PCR-based identification for sand fly surveillance in an area endemic for Kala-Azar in Mymensingh, Bangladesh [J]. J Parasitol Res, 2012, 2012: 467821. DOI: 10.1155/2012/467821
- [22] Tiwary P, Kumar D, Rai M, et al. PCR-RFLP based method for molecular differentiation of sand fly species *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, and *Sergentomyia babu* found in India [J]. J Med Entomol, 2012, 49(6): 1515-1518.
- [23] Aransay AM, Scoulica E, Chaniotis B, et al. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene [J]. Insect Mol Biol, 1999, 8(2): 179-184.

收稿日期: 2013-07-15; 修回日期: 2013-12-21