

中国部分地区赫坎按蚊种团的分子鉴别研究

林琳¹, 杨曼尼¹, 南春燕^{1,2}, 伍桐^{1,3}, 马颖¹, 李翔宇¹, 马雅军¹

1 第二军医大学基础医学部病原生物学教研室, 上海 200433; 2 陕西师范大学生命科学学院; 3 第二军医大学研究生管理大队临床 1 队

摘要: **目的** 阐明我国各地赫坎按蚊种团成员种的组成。**方法** 依据形态鉴定赫坎按蚊种团成员, 种类应用 PCR 法和分子特征确认, 分析的分子特征为 rDNA-ITS2 和 rDNA-28S-D3 序列。**结果** 对采自我国 12 个省 20 个地点的按蚊样本 ($n=1259$) 进行分子鉴别结果显示, 该研究样本中包括赫坎按蚊种团成员种 ($n=1237$) 和其它按蚊 3 种 ($n=22$); 其中赫坎按蚊种团的成员种为中华按蚊、雷氏按蚊、八代按蚊、贵阳按蚊、筠连接蚊、克莱按蚊、比伦按蚊, 以及 3 个未定名种 (LL1、LL2 和 LL3); 中华按蚊在大多数采集点密度最大。**结论** 赫坎按蚊种团非常复杂, 综合分析确定其成员种类和分布非常重要。

关键词: 赫坎按蚊种团; 分子鉴别

中图分类号: R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)02-0092-06

Molecular taxonomy of *Anopheles hyrcanus* group in some regions of China

LIN Lin¹, YANG Man-ni¹, NAN Chun-yan^{1,2}, WU Tong^{1,3}, MA Ying¹, LI Xiang-yu¹, MA Ya-jun¹

1 Department of Pathogen Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University; 3 Clinical Company 1, Graduate Administration Division, Second Military Medical University

Corresponding author: MA Ya-jun, Email: yajunm@yahoo.com.cn

Supported by the National Science and Technology Major Project for Infectious Disease in China (No. 2012ZX10004219-010)

Abstract: Objective To clarify the members of *Anopheles hyrcanus* group in some regions of China. **Methods** The members of *An. hyrcanus* group were identified by morphology, and the sibling species of *An. hyrcanus* group were determined by PCR and molecular identification. The molecular identification was based on the analysis of rDNA-ITS2 and rDNA-28S-D3 sequences.

Results A total of 1259 *Anopheles* samples were collected from 20 sites in 12 provinces of China. The molecular identification results showed that 1237 of the samples belonged to *An. hyrcanus* group, and the remaining 22 belonged to 3 other species of *Anopheles*. The members of *An. hyrcanus* group were *An. sinensis*, *An. lesteri*, *An. yatsushiroensis*, *An. kweiyangensis*, *An. junlianensis*, *An. kleini*, *An. belenrae*, and 3 unidentified species (LL1, LL2, and LL3). The population density of *An. sinensis* was the highest in most collection sites. **Conclusion** The *An. hyrcanus* group is complex. It is important to identify the members of this group and their distribution by comprehensive analysis.

Key words: *Anopheles hyrcanus* group; Molecular taxonomy

按蚊隶属昆虫纲(Insecta)、双翅目(Diptera)、蚊科(Culicidae), 有些种类可传播严重危害人体健康的疾病。众所周知, 按蚊中存在许多隐种, 种间为典型的近期分化, 共同分享祖先的多态性致使按蚊形态特征非常相似, 故经典方法分类时, 混淆和错订在所难免^[1]。分子特征的引入和应用为按蚊隐种的鉴别开辟了新的途径, 并愈来愈不可或缺。研究表明核糖体 DNA (Ribosomal DNA, rDNA) 第 2 内转录间隔区 (second internal transcribed spacer, ITS2) 序列和 28S 第 3 编码区 (Third domain, D3) 部分片段的序列在按蚊种内保守,

种间具有良好的解析度, 系按蚊客观、可靠的鉴别特征^[2-3]。基于 ITS2 和 D3 分子标志已被用来研究多个按蚊种团或复合体, 修订了成员种的分类地位; 发现新分子类型, 描述对应标本的形态特征, 记录新种^[4], 此研究模式(从分子到形态的反向分类学)已被愈来愈多的学者认可, 为分类学的发展提供了新的思路。

分子鉴别首先在冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*) 复合体中应用且较为集中^[5], 我国也相继进行研究赫坎按蚊(*An. hyrcanus*) 种团^[6-7]、多斑按蚊(*An. maculatus*) 种团^[8]、大劣按蚊(*An. dirus*) 复合体^[9]和微小按蚊(*An. minimus*) 种团^[10]等的部分种类, 并取得有益的进展。本研究依据 ITS2 和 D3 分子特征对采自我国部分地区的按蚊样本进行鉴别, 其结果可更新各地按蚊的种类组成, 为媒介的控制策略制定提供理论依据。

基金项目: 国家科技重大专项课题(2012ZX10004219-010)

作者简介: 林琳(1982-), 女, 硕士, 主要从事蚊媒分子生物学研究。现工作单位为同济大学医学院研究生管理办公室。

通讯作者: 马雅军, Email: yajunm@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 蚊虫样本 研究样本为 2004—2012 年采自我国 12 个省(直辖市、自治区)共 20 个地点的成蚊(表 1),在牲畜圈或人房内应用诱蚊灯和人工采集 2 种方法相结合,获得的按蚊样本用乙醚麻醉处死后,依据形态特征初步鉴定种类^[1],单蚊单管干燥保存或 70%乙醇浸泡带回实验室待用。

表 1 采集按蚊样本信息

Table 1 Collection sites and times of *Anopheles* samples

采集地点		采集时间
省份	县、乡	
云南	盐津县兴隆乡和普洱乡	2006 年 7—8 月
	勐腊县磨憨口岸	2009 年 10 月
湖北	广水市广庙乡和陈巷乡	2007 年 7 月
	随州市安居镇	
贵州	从江县下江镇	2007 年 8 月
河南	桐柏县淮源镇	2007 年 8 月
广东	珠海市横琴岛	2007 年 10 月
山东	济宁市唐口镇	2007 年 7 月
		2012 年 7 月
	荣成市郊区	2004 年 7 月
	曹县魏湾乡	2012 年 7 月
上海	嘉定区华亭镇	2012 年 8 月
陕西	宁陕县旬阳坝	2007 年 7 月
辽宁	东港市郊区	2004 年 8 月
	阜新市郊区	2008 年 8 月
	铁岭市郊区	
广西	天峨县下老村	2005 年 7 月
重庆	开县渠口镇	2008 年 7 月
江西	永修县吴城镇	2009 年 9 月

1.2 分子鉴别 参照文献方法抽提单蚊的基因组 DNA^[10],分子鉴别采用的策略和步骤如下。

1.2.1 种特异性 PCR 鉴别 本研究应用的 PCR 鉴别方法是由马雅军等^[11]于 2000 年建立,所应用的种特异引物是依据 rDNA-ITS2 的差异设计,并进行多年的验证和优化^[7,12],根据扩增片段的长度多态性可区分赫坎按蚊种团常见的 3 成员种,即中华按蚊(*An. sinensis*)、雷氏按蚊(*An. lesteri*)和八代按蚊(*An. yatsushiroensis*)^[7]。本研究对形态鉴别为赫坎按蚊种团成员种的个体,首先应用 PCR 法鉴别,反应体系和条件参照文献^[7]。

1.2.2 ITS2 和 D3 片段的扩增和序列测定 对上述部分 PCR 鉴别阳性的样本、所有 PCR 鉴别无扩增条带的样本和非赫坎按蚊种团成员种的样本,参照文献方法扩增 ITS2^[13]和 D3^[3],PCR 产物经 1%琼脂糖(含 0.002% Goldview)凝胶电泳后,纯化、回收扩增片段,用四色荧光标记双脱氧链终止法测序(ABI 3730 测序仪,上海铂尚生物技术有限公司)。

若 PCR 产物测序的峰图杂乱或存在套峰,则需对其克隆至 pGEMX-T 载体(北京艾德莱生物科技有限公司),转化 TOP10 感受态细胞[宝生物工程(大连)有限公司],每个样本至少挑取 5 个单克隆,通用引物测序。1.2.3 序列分析 所测序列用 Lasergene 软件包检查峰图,应用 Clustal X 比对所测序列,序列间的差异性在 Mega 5.0 软件中计算。在碱基完全一致的序列中选择 1 条在 GenBank 中以默认参数进行 Blast 搜索,若该序列仅与 1 种蚊种相同,即可确定该序列的按蚊种类;反之,需要结合样本的来源,并分析登记序列的信息,谨慎判断。

基于 ITS2 序列对我国赫坎按蚊种团的部分成员种在 Mega 5.0 软件中进行聚类分析,构建最大似然树,所用 ITS2 序列均采用本课题组在 GenBank 注册和登记的序列。

2 结果

分子鉴别各地按蚊样本 1259 只,包括 1237 只赫坎按蚊种团成员种,以及 22 只其它按蚊种。

2.1 PCR 鉴别赫坎按蚊种团成员种 3 种 将形态初步鉴别为赫坎按蚊种团成员种的个体数共 1237 只,进一步进行 PCR 鉴别,结果判定依据文献^[7],包括中华按蚊($n=810$)、八代按蚊($n=225$)、雷氏按蚊($n=108$)及无扩增产物的样本($n=94$)(表 2)。

表 2 按蚊样本 PCR 鉴别结果

Table 2 PCR identification results of *Anopheles* samples

采集省份	样本数(n)	中华按蚊	八代按蚊	雷氏按蚊	无扩增产物
云南	490	324	136	23	7
辽宁	71	0	15	52	4
湖北	83	79	2	2	0
河南	98	44	50	2	2
贵州	97	77	5	0	15
广东	119	89	1	29	0
山东	156	74	16	0	66
陕西	4	4	0	0	0
广西	18	18	0	0	0
重庆	25	25	0	0	0
江西	28	28	0	0	0
上海	48	48	0	0	0
合计	1237	810	225	108	94

2.2 序列分析

2.2.1 序列特征鉴别的按蚊种类 通过对蚊种的 ITS2 或 D3 序列特征进行比对和分析,确定上述 PCR 鉴别无扩增产物的个体中,包括赫坎按蚊种团的贵阳按蚊(*An. kweiyangensis*, $n=3$)、筠连接蚊(*An. junlianensis*, $n=4$)、克莱按蚊(*An. kleini*, $n=4$)、比伦按蚊(*An. belenrae*,

$n=66$), 以及未定名种 ($n=17$) (表 3)。另外, 通过分析 rDNA 序列鉴定了其它 3 种按蚊, 即微小按蚊

(*An. minimus*, $n=4$)、林氏按蚊 (*An. lindesayi*, $n=10$) 和帕氏按蚊 (*An. pattoni*, $n=8$) (表 3)。

表 3 按蚊样本依据序列特征鉴别结果

Table 3 Identification results of *Anopheles* samples by sequences analysis

采集省份和样本编号	样本数 (<i>n</i>)	分子特征/GenBank 登记号	
		ITS2	D3
云南 22-43/22-44/24-9	3	贵阳按蚊/AF261150	
24-1/26-16/28-38/28-41	4	筠连按蚊/AY170921	
min1-4	4		微小按蚊/AY737089
山东 SD45/SD56/SD63/CXA1201-03/BHL1201-24/BHA1201-36	66	比伦按蚊/GU384712	
辽宁 TL2-TL4	3	克莱按蚊/GU384716	
FX4	1		克莱按蚊/FJ875072
陕西 SX06-SX12	10	林氏按蚊/JX944708	
LI1-LI3			
PA01-PA08	8	帕氏按蚊/EU570060	
贵州 GK15/GK32/GK57/GK79/GK804/GK89/GK92/GK98	8	未定名种 sp. LL1/JX944687~JX944703	
GK03/GK35/GK40/GK66/GK71/GK81/GK97	7	未定名种 sp. LL2/JX944704	
河南 HN33	1	未定名种 sp. LL2/JX944704	
HN6	1	未定名种 sp. LL3/JX944705~JX944707	

2.2.2 未定名蚊种的 ITS2 序列分析 在进行序列比对和分析时, 发现 3 种新的 ITS2 序列类型, 无法定名, 暂时以 LL1、LL2 和 LL3 命名 (表 3)。

LL1 序列类型共有 8 个个体, 均采自贵州省, 序列比对结果显示在 465 bp 之前无差异, 但之后均为套峰 (图 1); 对 465 bp 长度的序列进行搜索, 显示与凉山按蚊 (*An. liangshanensis*) (AY170922) 的 ITS2 序列相似性约为 80%。克隆后获得 30 条序列, 比对后显示共 17 个类型 (JX944687~JX944703), 套峰是由于单碱基的缺失造成, 个体内序列除存在散在的单碱基突变外, LL1-17 与其他相比, 有一小片段 (13 个碱基) 插入 (图 2), 其间差异性的范围为 0.002~0.012 (p 距离)。

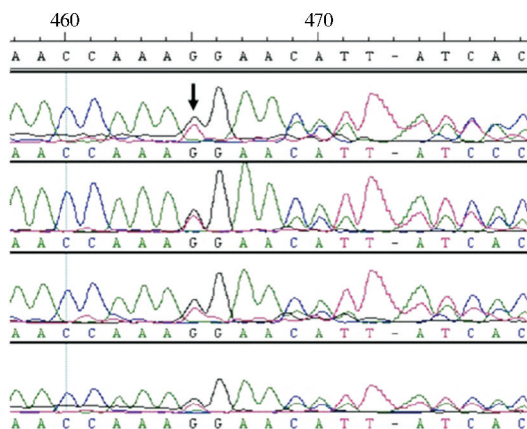


图 1 LL1 序列类型的比对峰图 (箭头之后均为双峰)

Figure 1 Alignment of LL1 sequences (double peaks after the arrow)

LL2 序列类型也有 8 个个体, 分别采自贵州和河南省 (表 3), 长度为 563 bp, 个体间无差异 (JX944704), Blast 搜索结果显示与 GenBank 登记号为 HM488272 的

序列同源性为 100%, 该序列的描述为来自泰国的赫坎按蚊种团成员未定名种 (*An. hyrcanus group sp. 3* CPE-2010 isolate TR3) ITS2 部分序列^[14]。LL3 序列来自河南省的 1 个个体, 其 4 个阳性克隆的序列比对结果显示为 3 个类型 (JX944705~JX944707), 其间有 1 处单碱基插入和 2 处突变, 与 GenBank 中的比伦按蚊 (GU384712) ITS2 序列相似性最高, 约为 93%, 该序列由韩国学者登记^[15]。

本研究构建了我国赫坎按蚊种团部分蚊种的最大似然树 (图 3), 确定未定名种与该种团成员种的亲缘关系, 拓扑结构显示分为 3 支。sp. LL2 与其它种的亲缘关系最远, 为独立的第 1 支; 第 2 支包括 5 种: 八代按蚊、筠连按蚊、赫坎按蚊、带足按蚊和克劳按蚊; 第 3 支共 10 种: 雷氏按蚊、sp. 1、比伦按蚊、sp. LL3、中华按蚊、克莱按蚊、昆明按蚊、凉山按蚊、贵阳按蚊和 sp. LL1。

3 讨论

由于许多按蚊存在隐种或种内形态变异, 故分子特征作为按蚊鉴别的重要依据, 已在多个复合体或种团中应用, 为其分类地位的确起到了关键性作用^[16]。现已证明, rDNA-ITS2 和 28S-D3 序列特征是理想的按蚊鉴别分子标志, 但笔者已发现 D3 序列在赫坎按蚊种团部分成员种间缺乏解析度, 故在按蚊亚属蚊种中应用时需要谨慎。

本研究对我国 20 个采集地的按蚊进行分子鉴别结果显示, 各地按蚊群体中主要是赫坎按蚊种团成员种, 除个别地点外, 比例最高的均为中华按蚊。赫坎按蚊种团是一个非常复杂而重要的按蚊类群, 广泛分布

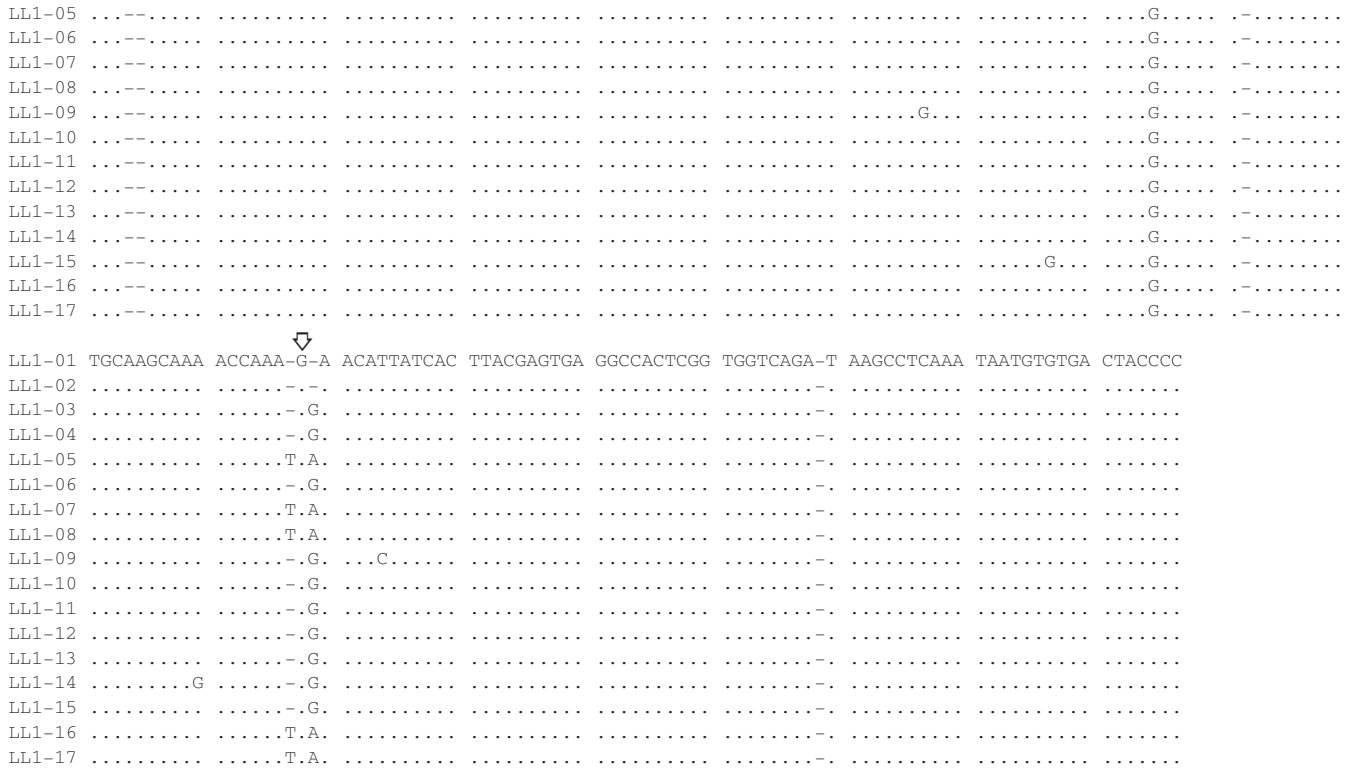


图2 赫坎按蚊种团未定名种 sp. LL1 的序列比对图(箭头为双峰出现位置,方框为 LL1-17 的插入片段)

Figure 2 Sequence alignment of *An. hyrcanus* group sp. LL1

(The arrow denotes double peaks; the box denotes the insert fragment of LL1-17)

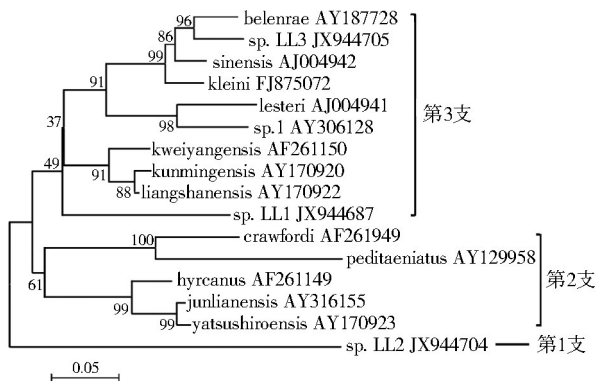


图3 基于 ITS2 序列的我国赫坎按蚊种团成员种间的聚类关系 (最大似然树)

Figure 3 Maximum-likelihood tree of *An. hyrcanus* group members in China based on ITS2 sequences

于古北界和东洋界,最新记录的成员种共 27 种(有些种类仍需确认)^[17]。赫坎按蚊种团有些成员种的正确鉴别几乎不可能根据生活史中 1 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,澄清一些混淆的问题,如:依据 ITS2 序列确定嗜人按蚊 (*An. anthropophagus*) 是雷氏按蚊的同物异名^[18];以新的 ITS2 序列类型描述并命名 2 个新种:比伦按蚊和克莱按蚊^[4];依据形态、染色体和分子特征质疑韩国八代按蚊的分类地位,认为应是暗灰按蚊 (*An. pullus*) 的同物异名等(因未对模式产地和分布我国的标本进行比

对,本研究仍沿用八代按蚊)^[19]。综合分析近年和本研究的分子鉴别结果^[6-7,20],目前我国分布的赫坎按蚊种团成员种为 19 种,以及 4 个序列类型。然而,赫坎按蚊种团的复杂程度远远超出了分类学家的预计,除已报告的多个新序列类型外^[14],还发现同种中不同的染色体核型(中华按蚊 A 和 B 型、暗灰按蚊 A 和 B 型、雷氏按蚊 PH1 和 CKJ 型)^[21-23],以及实验室的杂交不完全隔离现象^[22,24],并在韩国^[25]和我国辽宁省(笔者未发表资料)野外群体中发现中华按蚊与克莱按蚊的杂合子等,这些均有待进一步研究。

中国的赫坎按蚊种团成员种名录(*尚无分子特征):

- 银足按蚊* *An. argyropus* (Swellengrebel, 1914)
- 比伦按蚊 *An. belenrae* Rueda, 2005
- 克劳按蚊 *An. crawfordi* Reid, 1953
- 海拉尔按蚊* *An. hailarensis* Xu et Luo, 1998
- 黑河按蚊* *An. heiheensis* Ma, 1981
- 赫坎按蚊 *An. hyrcanus* (Pallas, 1771)
- 筠连按蚊 *An. junlianensis* Lei, 1996
- 昆明按蚊 *An. kunmingensis* Dong et Wang, 1985
- 贵阳按蚊 *An. kweiyangensis* Yao et Wu, 1944
- 雷氏按蚊 *An. lesteri* Baisas et Hu, 1936
- 凉山按蚊 *An. liangshanensis* Kang, Tan et Cao, 1984
- 克莱按蚊 *An. kleini* Rueda, 2005

最黑按蚊 * *An. nigerrimus* Giles, 1900

小洁按蚊 * *An. nitidus* Harrison, Scanlon et Reid, 1973

带足按蚊 *An. peditaeniatus* (Leicester, 1908)

八代按蚊 *An. yatsushiroensis* Miyazaki, 1951

中华按蚊 *An. sinensis* Wiedemann, 1828

拟中华按蚊 * *An. sineroides* Yamada, 1924

许氏按蚊 * *An. xui* Dong, Zhou, Dong et Mao, 2007

未定名 sp. 1/AY306128^[3]

未定名 sp. LL1(本研究)

未定名 sp. LL2(本研究)

未定名 sp. LL3(本研究)

马雅军等^[11]在 2000 年建立 PCR 法鉴别赫坎按蚊种团部分成员种时,因参考序列中无之后描述的新种比伦按蚊(原文雷氏按蚊)和克莱按蚊^[4],导致鉴别比伦按蚊时出现假阳性,而中华按蚊、雷氏按蚊(原文嗜人按蚊)和八代按蚊可获得准确鉴别。本研究还发现一些赫坎按蚊种团成员种群组成与以往调查不同的新问题。如:文献报告在河南省桐柏中华按蚊为绝对优势种群^[26],而本次采集的样本中八代按蚊与中华按蚊在群体中所占比例几乎相同,其他实验室也有类似结果(个人通讯);许锦江和王世平^[27]于 1993 年在山东省荣成首次记录八代按蚊,但其群体密度远低于中华按蚊,而本研究样本中未发现中华按蚊。出现上述问题的原因可能较为复杂,与采集地的环境变化、采集方法和时间关系密切,有待进一步扩大样本确定。

志谢 承蒙广西壮族自治区疾病预防控制中心黄亚铭赠送标本,诸多省(直辖市、自治区)疾病预防控制中心有关人员协助采集标本,包括王丕玉、顾云安、黄光全、李蓬、涂晓斌、徐友祥、黄利群、张稷博、陈哲和程鹏等,一并志谢

参考文献

- [1] 陆宝麟. 中国动物志. 昆虫纲. 双翅目: 蚊科[M]. 第 9 卷(下卷). 北京: 科学出版社, 1997: 12-38.
- [2] Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species[J]. Insect Mol Biol, 1996, 5(1): 1-9.
- [3] 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, 2010, 53(9): 1030-1038.
- [4] Rueda LM. Two new species of *Anopheles* (*Anopheles*) *Hyrceanus* group (Diptera: Culicidae) from the Republic of South Korea[J]. Zootaxa, 2005, 941: 1-26.
- [5] 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.
- [6] Ma YJ, Xu JN. The *Hyrceanus* 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.
- [7] 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.
- [8] Ma YJ, Li SZ, Xu JN. Molecular identification and phylogeny of the *Maculatus* group of *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences [J]. Acta Tropica, 2006, 99(2-3): 272-280.
- [9] 周水森, 汤林华, 夏明仪, 等. 核糖体 28S-D3 等位基因特异扩增鉴定微小按蚊亲缘种 A 和 C[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2003, 14(6): 408-410.
- [10] Xu JN, Qu FY. Ribosomal DNA difference between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes from China[J]. Med Vet Entomol, 1997, 11(2): 134-138.
- [11] 马雅军, 瞿逢伊, 曹毓存, 等. 我国雷氏按蚊和嗜人按蚊的分子鉴别鉴定和分类地位的探讨[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(6): 325-328.
- [12] 谭伟龙, 赵彤言, 董言德, 等. 不同地区不同生境按蚊种群的分子鉴定及 rDNA-ITS2 序列分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2011, 18(2): 84-89.
- [13] 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.
- [14] 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(3): 348-352.
- [15] Joshi D, Park MH, Saeung A, et al. Multiplex assay to identify Korean vectors of malaria [J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10(4): 748-750.
- [16] 李石柱, 马雅军. 分子鉴别技术在蚊虫分类中的应用[J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2004, 31(5): 198-201.
- [17] Harbach RE. Mosquito taxonomic inventory. *Anopheles* classification [EB/OL]. [2012-09-28]. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/anopheles-classification>.
- [18] Wilkerson RC, Li C, Rueda LM, et al. Molecular confirmation of *Anopheles* (*Anopheles*) *lesteri* from the Republic of South Korea and its genetic identity with *Anopheles anthropophagus* from China (Diptera: Culicidae)[J]. Zootaxa, 2003, 378: 1-14.
- [19] Shin EH, Hong HK. A new synonym of *Anopheles* (*Anopheles*) *pullus* Yamada, 1937-A. (*A.*) *yatsushiroensis* Miyazaki, 1951 [J]. Kor J Entomol, 2001, 31(1): 1-5.
- [20] 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.
- [21] Baimai V, Rattananarithikul R, Kijchalao U. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: I. The *Hyrceanus* group[J]. J Am Mosq Control Assoc, 1993, 9(1): 59-67.
- [22] Park SJ, Choochote W, Jitpakdi A, et al. Evidence for a conspecific relationship between two morphologically and cytologically different forms of Korean *Anopheles pullus* mosquito[J]. Mol Cells, 2003, 16(3): 354-360.
- [23] 马雅军, 杨频, 徐建农, 等. 应用形态、染色体和分子特征研究我国雷氏按蚊的分类鉴别[J]. 昆虫分类学报, 2005, 27(3): 199-208.
- [24] Min GS, Choochote W, Jitpakdi A, et al. Intraspecific hybridization of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) strains from Thailand and Korea[J]. Mol Cell, 2002, 14(2): 198-204.
- [25] Joshi D, Choochote W, Min GS. Short report: Natural hybrid between *Anopheles kleini* and *Anopheles sinensis* [J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 81(6): 1020-1022.
- [26] 钟元国, 庄建安, 李爱民, 等. 桐柏山疟疾暴发流行区传播媒介调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1999, 10(3): 208.
- [27] 许锦江, 王世平. 凶小库蚊应氏亚种在山东荣成市发现[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11(1): 57-59.

收稿日期: 2012-11-05