

中国寄生虫学与寄生虫病杂志

Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases

ISSN 1000-7423, CN 31-1248/R

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》网络首发论文

题目：我国赫坎按蚊种团的分子鉴别及中华按蚊的区系分布研究
作者：彭恒，陈翰明，陈辉莹，王琰，李翔宇，李基旭，杨振洲，马雅军
收稿日期：2019-06-13
网络首发日期：2019-11-22
引用格式：彭恒，陈翰明，陈辉莹，王琰，李翔宇，李基旭，杨振洲，马雅军. 我国赫坎按蚊种团的分子鉴别及中华按蚊的区系分布研究[J/OL]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1248.R.20191122.1114.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

文章编号：1000-7423(2019)-06-0000-00

【论 著】

我国赫坎按蚊种团的分子鉴别及 中华按蚊的区系分布研究

彭恒¹, 陈翰明², 陈辉莹², 王琰², 李翔宇¹, 李基旭³, 杨振洲⁴, 马雅军^{2*}

【摘要】 目的 改进赫坎按蚊种团部分成员种的多重 PCR 鉴别方法, 鉴别赫坎按蚊种团中的中华按蚊, 研究我国中华按蚊的区系分布及其影响因素。 **方法** 依据赫坎按蚊种团成员种中华按蚊、八代按蚊、雷氏按蚊、比伦按蚊和克莱按蚊的 rDNA-ITS2 序列差异设计种特异引物, 改进多重 PCR 分子鉴别方法。2013–2018 年, 在我国 8 个省(直辖市、自治区)共 18 个地点, 以诱虫灯和人工吸取相结合的方法采集按蚊, 依据形态特征初步鉴定为赫坎按蚊种团的成员种。提取单只蚊虫基因组 DNA, 使用改进的多重 PCR 方法鉴定种类。对多重 PCR 法无扩增产物的个体分析 rDNA-ITS2 序列, 在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 确定其种类。查找我国以及韩国和俄罗斯远东地区用分子特征鉴别为中华按蚊的文献, 结合本研究结果, 汇总中华按蚊采集地的地理位置和气候数据, 使用地理探测器模型计算影响决定力 q , 分析经度、纬度、年平均气温和年平均降雨量对中华按蚊分布的影响。 **结果** 改进的多重 PCR 法一次扩增即可依据扩增片段大小鉴别赫坎按蚊种团的 5 个成员种: 中华按蚊(490 bp)、雷氏按蚊(313 bp)、八代按蚊(216 bp)、克莱按蚊(386 bp)和比伦按蚊(165 bp)。在我国 18 个采集点共捕获赫坎按蚊种团按蚊 365 只, 多重 PCR 鉴别为中华按蚊 114 只(来自陕西、安徽与山东的采集点)、八代按蚊 34 只、雷氏按蚊 9 只、克莱按蚊 181 只和比伦按蚊 5 只。22 只多重 PCR 无扩增产物的蚊虫中, 经 rDNA-ITS2 序列分析鉴定为贵阳按蚊 2 只、类中华按蚊 1 只、朝鲜按蚊 8 只、林氏按蚊 7 只和帕氏按蚊 4 只。获取用分子特征鉴别为中华按蚊的文献 17 篇, 共汇总了 101 个采集地信息, 其中有中华按蚊分布的采集点 80 个, 无中华按蚊分布的 21 个地点。地理探测器软件计算获得的 q 值, 从大到小依次为 0.592 0(年平均气温)、0.507 2(纬度)、0.351 2(经度)和 0.214 4(年平均降雨量)。中华按蚊的分布与年平均气温关系最为密切, 其次是纬度。综合分析分布地的纬度和年平均温度等结果显示, 年平均气温 10 °C 可以作为划分中华按蚊在我国分布北界线的依据。我国中华按蚊的分布范围包括云南、贵州、重庆、河南、山东、天津、江苏、安徽、湖北、浙江、上海、福建、江西、广西、广东、海南、台湾、香港、澳门等省(直辖市、自治区、特别行政区)的全境, 以及西藏、四川、甘肃、陕西、山西、河北、北京、辽宁等省(直辖市、自治区)的南部部分地区。 **结论** 改进的赫坎按蚊种团多重 PCR 分子鉴定方法快速简单、客观可靠。综合分析显示划分中华按蚊在我国分布北界线的依据是年平均气温 10 °C 线, 中华按蚊在我国的分布应小于之前记载的范围。

【关键词】 赫坎按蚊种团; 中华按蚊复合体; 分子鉴别; 区系分布

中图分类号: R384.111

文献标识码: A

Molecular identification of *Hyrceanus* group and faunal distribution of *Anopheles sinensis* (Diptera : Culicidae) in China

PENG Heng¹, CHEN Han-ming², CHEN Hui-ying², WANG Yan², LI Xiang-yu¹,
LI Ji-xu³, YANG Zhen-zhou⁴, MA Ya-jun^{2*}

(1 Department of Medical Microbiology and Parasitology, 2 Department of Tropical Diseases, Navy Medical University, Shanghai 200433, China; 3 Division of Vectors and Parasitic Diseases, Yanbian Center for Disease Control and Prevention, Yanji 133001, China; 4 Institute of Disease Control and Prevention, People's Liberation Army of China, Beijing 100071, China)

基金项目: 国家科技重大专项 (No. 2017ZX10303404002001), 上海市自然科学基金 (No. 19ZR1469600)

作者单位: 中国人民解放军海军军医大学 1 病原生物学教研室, 2 热带病学教研室, 上海 200433; 3 吉林省延边州疾病预防控制中心病媒与寄生虫病防治科, 延吉 133001; 4 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

作者简介: 彭恒 (1982–), 男, 博士, 副教授, 主要从事病原生物学与媒介生物学研究。E-mail: pengheng0923@126.com

* 通讯作者, 马雅军, E-mail: yajun_ma@163.com

网络出版时间:

网络出版路径:

[Abstract] Objective To improve the multiplex PCR molecular methods to identify species of *Anopheles hyrcanus* group, and investigate the faunal distribution of *An. sinensis* in China and the factors influencing its distribution. **Methods** The species-specific primers were designed based on rDNA-ITS2 sequences of *Anopheles* (*An. sinensis*, *An. lesteri*, *An. yatsushiroensis*, *An. kleini* and *An. belenrae*) to improve the specificity and sensitivity of the multiplex PCR method to identify the *Anopheles* mosquito species. *Anopheles* mosquitoes were collected from 18 locations in 8 provinces (municipalities or autonomous regions) in China using light trap and entomological aspirator from 2013 to 2018. Those mosquitoes identified as members of *An. hyrcanus* group based on morphological characteristics were used for further analysis. The genomic DNA of individual mosquito was extracted, and the multiplex PCR assay was used to determine the species of *An. hyrcanus* group. For those mosquitoes without multiplex PCR products, the rDNA-ITS2 was amplified and sequenced, and the sequences were subjected to BLAST of the NCBI GenBank database to determine the species. Based on the results of this study and the review of 17 publications that identified *An. sinensis* using molecular biological methods in China, South Korea and the Far East of Russian, as well as the collected geographical location and climate data, the influence q value was calculated using the geo-detector software. The effects of longitude, latitude, annual average temperature and rainfall on the distribution of *An. sinensis* were analyzed. **Results** The improved multiplex PCR method was able to simultaneously identify five members of the *An. hyrcanus* group based on the size of the amplified fragments as *An. sinensis* (490 bp), *An. lesteri* (313 bp), *An. yatsushiroensis* (216 bp), *An. kleini* (386 bp) and *An. belenrae* (165 bp). In this study, the species of 365 *Anopheles* mosquitoes were identified by multiplex PCR, including *An. sinensis* ($n = 114$, collected from Shaanxi, Anhui and Shandong), *An. yatsushiroensis* ($n = 34$), *An. lesteri* ($n = 9$), *An. kleini* ($n = 181$), *An. belenrae* ($n = 5$). The 22 individuals without acquiring amplified products were identified as *An. kweiyangensis* ($n = 2$), *An. sineroides* ($n = 1$), *An. koreicus* ($n = 8$), *An. lindesayi* ($n = 7$) and *An. pattoni* ($n = 4$) by rDNA-ITS2 sequencing. The geographic and ecological data were collected from 101 sites, including 80 sites with *An. sinensis* and 21 sites without *An. sinensis* distribution. The calculated q values were 0.592 0 for annual average temperature, 0.507 2 for latitude, 0.351 2 for longitude and 0.214 4 for annual average rainfall. The results indicate that the most significant factor affecting the distribution of *An. sinensis* is temperature, followed by latitude. Comprehensive analysis of the impact of latitude and annual average temperature on the distribution of *Anopheles* revealed that the annual average temperature of 10 °C could be used as the reference to determine the northern boundary of *An. sinensis* distribution in China. *An. sinensis* was distributed in the entire provinces (municipalities or autonomous regions) of Yunnan, Guizhou, Chongqing, Henan, Shandong, Tianjin, Jiangsu, Anhui, Hubei, Zhejiang, Shanghai, Fujian, Jiangxi, Guangxi, Guangdong, Hainan, Taiwan, Hong Kong and Macao, and the southern parts of the Tibet, Sichuan, Gansu, Shaanxi, Shanxi, Hebei, Beijing and Liaoning. **Conclusion** The improved multiplex PCR assay used to identify *An. hyrcanus* group is fast, simple and reliable. The annual average temperature of 10 °C could be used as reference to determine the northern boundary for the geographical distribution of *An. sinensis* in China, and the distribution range is smaller than that in the previously recorded document.

[Key words] *Hyrcanus* group; *Anopheles sinensis* complex; Molecular identification; Faunal distribution

Supported by National Science and Technology Major Project (No. 2017ZX10303404002001) and Shanghai Natural Science Foundation (No. 19ZR1469600)

* Corresponding author, E-mail: yajun_ma@163.com

中华按蚊 (*Anopheles sinensis*) 隶属于蚊科 (Culicidae)、按蚊属 (*Anopheles*)、按蚊亚属 (*Anopheles*) 的赫坎按蚊种团 (*An. hyrcanus* group)。赫坎按蚊是一个非常复杂的按蚊类群, 广泛分布于古北界和东洋界。中国已记录的成员种共 22 种, 包括 3 个未定名的分子型^[1-2]。与其他许多按蚊种团类似, 赫坎按蚊种团中的某些成员种存在隐种^[3], 如 2005 年记录的模式产地在韩国的克莱按蚊 (*An. kleini*) 和比伦按蚊 (*An. belenrae*) 新种, 与中华

按蚊之间缺乏稳定的形态鉴别特征^[4], 三者之间的亲缘关系密切^[5-7], 组成了中华按蚊复合体 (*An. sinensis* complex)。

业已证明, 在用于蚊种鉴别的分子标志中, 核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区 (ribosomal DNA second internal transcribe spacer, rDNA-ITS2) 序列特征对于按蚊亚属的种类解析度较为理想^[8]。近年来, 依据 rDNA-ITS2 序列特征的研究使赫坎按蚊种团中易混淆的隐种分类问题逐步得到澄清, 如: 确

定了嗜人按蚊 (*An. anthropophagus*) 是雷氏按蚊 (*An. lesteri*) 的同物异名^[1,9-12]。笔者曾在 2000 年建立了赫坎按蚊种团 4 成员种的 PCR 分子鉴别方法^[13]，但由于新种的记录和分子特征数据的积累，导致该方法已无法准确鉴别中华按蚊复合体^[14]，因此需要更新分子鉴别方法。

基于形态鉴别，以往认为中华按蚊在中国的分布范围是除了青海省和新疆维吾尔自治区的所有地区^[2]。然而，随着近年来应用分子鉴别方法的研究增多，在我国山东省、辽宁省和吉林省逐渐发现比伦按蚊和克莱按蚊^[14-16]，并且分子鉴别的结果显示，在以往我国记录的分布地中，东北部分地区地区可能并无中华按蚊的分布^[14,15,16-18]。故此亟待广泛收集按蚊样本，在分子鉴别的基础上进一步阐明中华按蚊在我国的分布情况。本研究对赫坎按蚊种团部分成员种（包括中华按蚊复合体）的多重 PCR 鉴别方法进行了改进，应用该方法对我国北方部分地区的赫坎按蚊种团进行鉴别，并结合文献报告，研究中华按蚊在我国的分布及其影响因素，为我国疟疾消除后期的防控，以及防止输入性疟疾再传播管理策略的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 蚊虫采集

本研究所用的蚊虫为 2013–2018 年采自中国 8 个省（直辖市、自治区）的 18 个地点（表 1）。在牲畜圈或人房内以诱虫灯和人工吸取相结合的方法采集蚊虫，氯仿麻醉后，依据形态特征初步鉴定选出赫坎按蚊种团的成员种^[2]，单只干燥保存或 75% 乙醇浸泡，带回实验室进行分子鉴别。

1.2 主要试剂与仪器

吸血昆虫光谱诱捕装置 (MYFS-HJY-1 型) 购自深圳厚积电子科技有限公司；DNAzol 购自美国 Invitrogen Life Technologies 公司；*Taq* PCR 预混液和 DNA 标志物购自北京艾德莱生物科技有限公司；PCR 扩增仪 (SH901F 型) 购自美国 Applied Biosystem 公司；数码凝胶成像系统 (Tanon-2500) 购自北京陆希科技有限公司。

1.3 分子鉴别方法

单只成蚊置 60 μ L DNAzol 中，按照说明书步骤抽提基因组 DNA。

1.3.1 种特异引物设计 依据不同按蚊间的 rDNA-ITS2 序列差异设计种特异引物，在 GenBank 中下载本课题组登记的赫坎按蚊种团常见成员种的 ITS2 序列，即中华按蚊 (GenBank 登录号: AJ004942.2)、

雷氏按蚊 (AY803797.1)、八代按蚊 *An. yatsushiroensis* (AY186791.2)、克莱按蚊 (FJ875072.1) 和比伦按蚊 (AF145464.1)，应用 MEGA 软件包进行比对，从不同蚊种特异碱基的位置，同时考虑扩增产物的长度设计反向引物，以 5.8S 引物作为正向通用引物 (图 1，表 2)。

1.3.2 多重 PCR 分子鉴别方法 PCR 反应体系中包含 2 $\times$ *Taq* PCR 预混液 10 μ L，10 μ mol/L 正向引物 0.5 μ L、5 种反向引物各 0.5 μ L，模板 DNA 1 μ L，加双蒸水至 20 μ L。反应条件为：94 $^{\circ}$ C 2 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，45 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，共 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳，随机选择单一 阳性条带进行测序验证，序列正确者判断其相应引物具有种特异性，可依据扩增的阳性片段长度鉴别种类。

1.3.3 ITS2 序列分析 对于多重 PCR 法扩增无条带的样本，参照文献方法扩增 ITS2^[9]，PCR 产物经纯化后，用四色荧光标记双脱氧链终止法双向引物测序 (ABI 3730 测序仪，上海铂尚生物技术有限公司)。获得的序列在 GenBank 上以默认参数进行 BLAST 比对，依据序列相似性确定种类。

1.4 中华按蚊在中国的分布范围

收集以中国、韩国和俄罗斯远东地区为采集地，使用分子特征鉴别中华按蚊的文献。结合本研究的结果，统计各采集地的经度、纬度、年平均温度和降雨量（来源于中国气象共享网 <http://data.cma.cn>，其中包含中国 756 个基本基准地面气象观测站及自动站 1981–2010 年的日值数据集）。使用地理探测器模型 (<http://www.geodetector.org/>) 分析不同因素对中华按蚊分布的影响。将有无中华按蚊分布 y 设为 1、0，变量 x 分别为经度、纬度、年平均气温和年平均降雨量，计算不同变量对中华按蚊分布影响的决定力 q 。

1.5 伦理批准和患者知情同意

本研究不涉及伦理批准和患者知情同意。

2 结果

2.1 改进的多重 PCR 鉴别方法

本研究建立的多重 PCR 法，通过一次 PCR 扩增，依据阳性片段大小可同时鉴别赫坎按蚊种团的 5 个成员种。其中中华按蚊、雷氏按蚊和八代按蚊的种特异引物与笔者之前报告的相同^[14]，增加了中华按蚊复合体的比伦按蚊和克莱按蚊的种特异引物，可同时鉴别 5 种赫坎按蚊种团成员种 (图 2)。随机选择阳性扩增的片段共 20 条，进行测序验证。

地理探测器正确引用：

[1] Wang JF, Li XH, Christakos G, Liao YL, Zhang T, Gu X & Zheng XY. 2010. Geographical detectors-based health risk assessment and its application in the neural tube defects study of the Heshun region, China. *International Journal of Geographical Information Science* 24(1): 107-127.

[2] Wang JF, Zhang TL, Fu BJ. 2016. A measure of spatial stratified heterogeneity. *Ecological Indicators* 67: 250-256.

[3] 王劲峰, 徐成东. 2017. 地理探测器：原理与展望. *地理学报* 72(1): 116-134. [Wang JF, Xu CD. 2017. Geodetector: Principle and prospective. *Acta Geographica Sinica* 72(1):116-134.]

表1 中国8个省按蚊样本的采集信息
Table 1 Collection site information of *Anopheles* samples from 8 provinces of China

	采集地点 Collection site	经度/纬度 Longitude/latitude	采集时间 Date	生态环境 Habitant	采集按蚊数 No. of collected <i>Anopheles</i>	分子鉴别按蚊数 No. of <i>Anopheles</i> identified by molecular marker
陕西 Shaanxi	榆林市小纪汗乡 Xiaojihan Township, Yulin City	38.45°N, 109.58°E	2009-08	猪圈 Pigsty	23	23
			2013-08	猪圈 Pigsty	18	18
	宁陕县旬阳坝镇 Xunyangba Town, Ningshan County	33.56°N, 108.56°E	2013-07	牛圈 Cattle housing	130	42
安徽 Anhui	旌德县蔡家桥镇 Caijiqiao Town, Jingde County	30.35°N, 118.49°E	2013-07	猪圈 Pigsty	35	30
	黄山市屯溪区 Tunxi District, Huangshan City	29.70°N, 118.32°E	2013-07	猪圈 Pigsty	63	30
河南 Henan	陕县西张村镇 Xizhangcun Town, Shaanxi County	34.24°N, 110.10°E	2015-07	居室和院落 Room and courtyard	7	7
山西 Shanxi	武乡县大河西村和陌峪村 Dahexi Village and Mofu Village, Wuxiang County	36.47°N, 113.05°E	2017-08	羊圈、鸡圈 Goat housing, chicken housing	30	30
山东 Shangdong	济宁市唐口镇 Tangkou Town, Jining City	35.25°N, 116.45°E	2018-07	猪圈、牛圈 Pigsty, cattle housing	263	20
辽宁 Liaoning	宽甸满族自治县石湖沟乡 Shihugou Township, Kuandian Manchu Autonomous County	40.74°N, 124.71°E	2018-07	牛圈(含鸡、鸭等) Cattle housing (including chicken and ducks)	73	20
	东港市郊刘家泡村 Liujiabu Village, suburb of Donggang City	39.54°N, 124.81°E	2018-08	牛圈 Cattle housing	>2 000	10
吉林 Jilin	图们市月晴镇 Yueqing Town, Tumen City	42.90°N, 129.83°E	2018-08	养猪场 Pig farm	>5 000	20
	汪清县明月沟村 Mingyuegou Village, Wangqing County	43.30°N, 129.85°E	2018-08	猪圈、牛圈 Pigsty, cattle housing	>5 000	20
	珲春市英安镇 Ying'an Town, Hunchun City	42.91°N, 130.37°E	2018-08	猪圈 Pigsty	90	20
黑龙江 Heilongjiang	绥芬河市郊红花岭村 Honghualing Village, suburb of Suifenhe City	44.38°N, 130.99°E	2018-08	猪圈、牛圈 Pigsty, cattle housing	423	29
内蒙古 Inner Magnolia	扎鲁特旗郊区 Suburb of Zalute	44.50°N, 120.89°E	2018-08	养猪场 Pig farm	1	1
河北 Hebei	承德市双滦区西地镇 Xidi Town, Shuangyu District, Chengde City	40.94°N, 117.68°E	2018-08	养猪场 Pig farm	178	20
	隆化县隆化镇 Longhua Town, Longhua County	41.33°N, 117.74°E	2018-08	养猪场 Pig farm	50	20
	围场满族蒙古族自治县御道乡 Yudao Township, Weichang Manchu Mongolian Autonomous County	42.15°N, 116.98°E	2018-08	养牛场 Cattle farm	7	5

测序结果显示, 碱基序列和片段大小均与预计相同(图 2)。另外, 应用赫坎按蚊种团成员种的类中华按蚊 (*An. sineroides*) 和按蚊亚属的朝鲜按蚊 (*An. koreicus*) 进行了特异性验证, 均无特异性扩增产物。

共鉴别 365 只按蚊, 其中中华按蚊 114 只、八代按蚊 34 只、雷氏按蚊 9 只、克莱按蚊 181 只和比伦按蚊 5 只, 22 只无扩增条带(表 3)。

2.2 rDNA-ITS2 序列分析

22 只多重 PCR 无扩增产物的蚊虫经 rDNA-ITS2 序列分析, 鉴定为贵阳按蚊 (*An. kweiyangensis*) 2 只、类中华按蚊 1 只、朝鲜按蚊 8 只、林氏按蚊 (*An. lindesayi*) 7 只和帕氏按蚊 (*An. pattoni*) 4 只(表 3)。

2.3 中华按蚊在中国的分布

共汇总了在中国、韩国和俄罗斯远东地区进行赫坎按蚊种团分子鉴别的文献 17 篇, 采集地共 101 个, 其中 80 个有中华按蚊分布^[14,16,18,20-30],

	UP→
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	GAATGT GAACTGCAGG ACACAGTAAC ATGTATAAGT GAACACATAT
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	GAATGT GAACTGCAGG ACACAGTAAC ATGTATAAGT GAACACATAT
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	GAATGT GAACTGCAGG ACACAGTAAC ATGTATAAGT GAACACATAT
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	GAATGT GAACTGCAGG ACACAGTAAC ATGTATAAGT GAACACATAT
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	GAATGT GAACTGCAGG ACACAGTAAC ATGTATAAGT GAACACATAT
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	TGCACGTCGT GGGAACTTAC CATGACGTAC ACATACTTGA GCGCTTATAA
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	TGCACGTCGT GGGAACTTAC CATGACGTAC ACATACTTGA GCGCTTATAA
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	TGCACGTCGT GGGAACTTAC CATGACGTAC ACATACTTGA GCGCTTATAA
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	TGCACGTCGT GGGAACTTAC CATGACGTAC ACATACTTGA GCGCTTATAA
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	TGCACGTCGT GGGAACTTAC CATGACGTAC ACATACTTGA GCGCTTATAA
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	TTAGAAGTT- -GGAAACGCT GACTTACGCT GTGATTGGTG CTGGTCACCC
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	TTAGAAGTT- -GGAAACGCT GACTTACGCT GTGATTGGTG CTGGTCACCC
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	TTAGAAGTTT GGCAACAGA AAACACGCA GTGATTGGTG CTGGTCACCA
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	TTAGAAGT- -GGAAACGCT GACTTACGCA GTGATTGGTG CTGGTCACCA
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	TTGGATGTT- -ATACACAAT AAACACGCT GTGATTGGTG CCGTCACCA
	←BP
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	CGTCGC-AGT CGTGAAAAAT GATGTAAGAT GTTGTCTCGT CGACTCGCTT
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	CGTCAC-GGT CGTGAAAAAT GATGTAAGAT GGGTCACTG CGACCCGCTT
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	CGTCAC-AGT CGTGCAATAA GGTGTAAGAG AG-ATCTCGT CGATC-GCTT
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	CGTCAC-GGT CGTGAAATAT GATGTAAGAT GGGTCTCGT CGACCCGCTT
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	CGTCATTGGT CGTGCAATAA GATGTAAGAG GG-GTCACGC CGGCCCGCTT
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	GCATT-AAA ACGTGTGTT- -GATAA-CC GCCTAGGA- -CAGACAAGTA
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	GCATT-AAA ACGTGTGTT- -GAAAAACC GCTAAGGA- -CAGACAAGTA
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	GCATCTCGGA ACTTGTGTT- -GAAAGGCC GCGAAGA- -CAGACAAGTA
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	GCATT-AAA ACGTGTGTT- -GAAAAACC GCTAAGGA- -CAGACAAGTA
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	GCATTG-AAG AAACGCGGT- -GTTAAGCC ATGATAT- -CAAACTAGTA
	←YP
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	GAAAG- -GGCTGTGT TCCCGCGGAC GCGGAGGAA GTATTCTGAG
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	GAAAG- -GGCTGTGT TCCCGCGGAC GCGGAGGAA GTATTCTGAG
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	GTAACACGCA GCAGATGTGT TCCCGCGATT GCGGAGGAA- -TCTAGG
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	GAAAG- -GGCTGTGT TCCCGCGGAC GCGGAGGAA GTATTCTGAG
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	GTAAG- -GGCTGTGT TCCCGCGGAC GCGGAGGAA- -TCTAGG
	←LP
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	CAGGCGCGTC CT-TTGCCGT GTGTAGGTAT GGAACAGGTG TCTTCTCTT
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	CAGGAGCGTC CT-TTGCTGT GTGTAA-AT GGAGCAGGTG TCTTCTCTT
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	CAGGCGCGCC CTGACGCTGT GTGTAG-AT GGAGCAGGTG TCTTCTCTT
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	CAGGCGCGTC CT-TTGCTAT GTGTAGGTAT GGAACAGGTG TCTTCTCTT
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	CAGGCGCGTT CTGTTGCTGT GT-TAG-GT GGA-CAGGTG TCTTCTCTT
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	CTATTTTA- TTTTTTTAAA ATTGAGGTAA GGCACCA-A CGTTTCGATC
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	CTATTTTAA- TTTTTTTAAA ATTGAGGTAA GATTTC-A- AGGTTTCGTT
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	CTATTTT- ATT-TTAAAA ATTGAGGTAA GATTTC-A- CGTTTCT-TC
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	CTATTTTAAT TTTTTTTAAA ATTGAGGTAA GGCACCA-A CGTTTCGATC
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	CTATTT- ATTTATTAA ATTGAGGTAA GATTTC-A- CGTTTTCGATC
	←KP
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	GAGACG- -GCATGTACGC TAATA-ATCA TTA-TATGGA ACCCCTGAAC
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	GAGACA- -GTATGAGCGC AAATA-ATCA TTG-TATGGA ACCCCTGAAC
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	GAGATA-GTG GAATGGCTG CAAGA-GACT GGA-ATCGGA AG--TTGAAC
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	GAGATA- -GCATGTACGC AAATA-ATCA TTG-TATGGA ACCCCTGAAC
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	GAGACA-GT GGTGGGACGC AACGA-ATTG GAACATTGGA AA--CCAGAC
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	AACGGAACAC TTATGGCACT AGAGAACACT ACCCAG-AT TTGT-GCAT-
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	AACGGAACAC GAATAGCACA AGAGAACACT ACCCAG-AT TTGT-GTAT-
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	AACGGAACAC TC-TATTAGC A--AACACT ACCCAG-AA TCCGTGCAT-
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	AACGGAACAC TTATGGCACT AGAGAACACT ACCCAG-AT TTGTATGTT
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	AAGGGAACAC TAAACGCACC ATA-AACACT ACCCAGTTGT TGAGAGAGCG
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	GGCGGTCCTA ACGA--TAC --A-GCAAAC AACAAAGGTC AA--TTAT
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	AGCGGATG-G ACGA--TAC --AAGTTATC AACAAAGGTC AA--TTAT
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	AACGACTG-G AAGA--TGC --AAGTTCTA CCTGAGAATC A--TTAT
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	AGCGGCTGG ACAA--CAA TAATACGCA AACAAAGGTC AACAAATTAT
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	GACGAGCATC GCAAGCCTGC GAAAGCGTGG CATACAATTAT AT-CAATTAT
	←SP
AF145464.1 <i>Anopheles belenrae</i>	CACTC--ACG AGTGAGGCCA CTCG-GTGGT CATATAA
FJ875072.1 <i>Anopheles kleini</i>	CACTC--ACG AGTGAGGCCA CTCG-GTGGT CAAATAA
AY803797.1 <i>Anopheles lesteri</i>	CACTT--ACG AGTGAGGCCA CTCG-GTGGT CAAATAA
AJ004942.2 <i>Anopheles sinensis</i>	CACTCC-AAG AGTGAGGCCA CTCG-GTGGT CA-GTAA
AY186791.2 <i>Anopheles yatsushiroensis</i>	CACTTACAAA CATAGTGGGA CCGTACGGT CAAATAA

黄色标注为引物位置。UP: 通用引物; BP: 比伦按蚊引物; YP: 八代按蚊引物; LP: 雷氏按蚊引物; KP: 克莱按蚊引物; SP: 中华按蚊引物

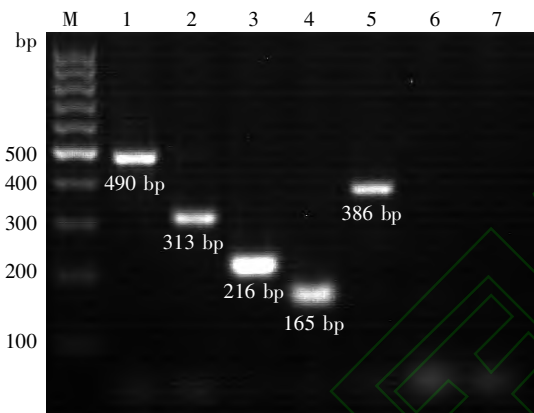
The primer position was marked in yellow. UP: universal primer; BP: *An. belenrae* primer; YP: *An. yatsushiroensis* primer; LP: *An. lesteri* primer; KP: *An. kleini* primer; SP: *An. sinensis* primer

图1 赫坎按蚊种团5个成员种的rDNA-ITS2序列比对

Fig. 1 rDNA-ITS2 sequence alignment of 5 members in *Anopheles hyrcanus* group

表2 多重PCR法分子鉴别赫坎按蚊种团5成员种的引物序列
Table 2 Universal primer and species-specific primers used in multiple PCR assay

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	片段长度/bp Fragment length /bp
通用引物 5.8s (UP) Universal primer	GAATGTGAACTGCAGGACAC	
比伦按蚊引物(BP) <i>An. belenrae</i> primer	TCATTTTTCACGACTGCGACGG	165
八代按蚊引物(YP) <i>An. yatsushiroensis</i> primer	GCTTAACACCGCGTTTCTTCA	216
雷氏按蚊引物(LP) <i>An. lesteri</i> primer	GCTCCATCTACACACAGCGT	313
克莱按蚊引物(KP) <i>An. kleini</i> primer	CATACTGTCTCAACGAAACCT	386
中华按蚊引物(SP) <i>An. sinensis</i> primer	GTTGTCCAGCCCGCTAACAT	490



M: DNA标志物; 1~7: 依次为中华按蚊、雷氏按蚊、八代按蚊、比伦按蚊、克莱按蚊、朝鲜按蚊、类中华按蚊
M: DNA marker; 1-7: *Anopheles sinensis*, *Anopheles lesteri*, *Anopheles yatsushiroensis*, *Anopheles belenrae*, *Anopheles kleini*, *Anopheles koreicus*, *Anopheles sineroides*

图2 多重PCR法鉴别赫坎按蚊种团5成员种
Fig. 2 Identification of the five members of *Anopheles hyrcanus* group by multiplex PCR assay

21 个地点无中华按蚊分布^[15,31,32]。应用地理探测器软件计算获得的 q 值从大到小依次为 0.592 0 (年平均气温)、0.507 2 (纬度)、0.351 2 (经度)、0.214 4 (年平均降雨量)。

有中华按蚊分布的地点中，最低年平均气温是 9.98 ℃，纬度最高的为 40°44'N，但 37°25'N~40°44'N 范围内有 4 个地点无中华按蚊分布。据此推断，年平均气温 10 ℃线可以作为划分中华按蚊在中国分布北界线的依据。对照中国地图的范围，提示中国中华按蚊的分布范围包括云南、贵州、重庆、河南、山东、天津、江苏、安徽、湖北、浙江、上海、福建、江西、广西、广东、海南、台湾、香港、澳门等省（直辖市、自治区、特别行政区）的全境，以及西藏、四川、甘肃、陕西、

中国地图



图3 中华按蚊在中国的分布范围（斜线区域）
Fig. 3 Distribution of *Anopheles sinensis* in China (italic lines region)

山西、河北、北京、辽宁（直辖市、自治区）的南部地区。

3 讨论

蚊媒种类的准确鉴别是蚊媒流行病学与防控研究的重要基础，更是研究其区系分布的保证。经典的分类鉴定通常依据形态特征，但许多按蚊存在复合体隐种，其形态分类鉴定非常困难且复杂，主要原因是种间为典型的近期分化，共同分享祖先的多态性。根据 DNA 序列的差异进行分子鉴定，可有效地弥补形态鉴定的不足。多项研究结果显示，rDNA-ITS2 序列特征是鉴别按蚊隐种尤其是赫坎按蚊种团成员种理想的分子标志^[8,15,16,18]。笔者课题组在 2000 年建立了多重 PCR 方法鉴别赫坎按蚊种团的 4 个成员种^[13]，但之后隐种经过了修订，使得上述方法中部分种特异引物的特异性不足^[4,14]。本研究综合分析了已建立的多重 PCR 方法^[14,15,33]，比对了所有已登记的赫坎按蚊种团成员种的 rDNA-ITS2 序列，重新设计了部分种特异引物，改进了多重 PCR 的方法。通过一次扩增，依据 PCR 产物的长度可以同时鉴别比伦按蚊、八代按蚊、雷氏按蚊、克莱按蚊和中华按蚊等 5 个成

表3 分子鉴别赫坎按蚊种团成员种的结果
Table 3 Molecular identification results of *Anopheles hyrcanus* group

采集地 Sampling site	样本数 No. of samples	赫坎按蚊种团 <i>Hyrcaus</i> group							其他蚊种 Others
		克莱按蚊 <i>An. kleini</i>	比伦按蚊 <i>An. belenae</i>	八代按蚊 <i>An. yatsushiroensis</i>	雷氏按蚊 <i>An. lesteri</i>	中华按蚊 <i>An. sinensis</i>	类中华按蚊 <i>An. sineroides</i>	贵阳按蚊 <i>An. kweiyangensis</i>	
陕西 Shaanxi									
榆林 Yulin	41	19	0	21	1	0	0	0	0
宁陕 Ningshan	42	0	0	0	0	36	0	2	帕氏按蚊 (n=4) <i>An. pattoni</i> (n=4)
安徽 Anhui									
旌德 Jingde	30	0	0	0	0	30	0	0	0
黄山 Huangshan	30	0	0	0	0	30	0	0	0
河南 Henan									
陕县 Shaanxi	7	0	0	0	0	0	0	0	林氏按蚊(n=7) <i>An. lindesayi</i> (n=7)
山西 Shanxi									
武乡 Wuxiang	30	21	0	9	0	0	0	0	0
山东 Shandong									
济宁 Jining	20	0	2	0	0	18	0	0	0
辽宁 Liaoning									
宽甸 Kuandian Manchu	20	11	0	0	0	0	1	0	朝鲜按蚊(n=8) <i>An. koreicus</i> (n=8)
东港 Donggang	10	0	2	0	8	0	0	0	0
吉林 Jilin									
图们 Tumen	20	17	0	3	0	0	0	0	0
汪清 Wangqing	20	20	0	0	0	0	0	0	0
珲春 Hunchun	20	19	0	1	0	0	0	0	0
黑龙江 Heilongjiang									
绥芬河 Suifenhe	29	29	0	0	0	0	0	0	0
内蒙古 Inner Mongolia									
扎鲁特 Zalute	1	1	0	0	0	0	0	0	0
河北 Hebei									
承德 Chengde	20	20	0	0	0	0	0	0	0
隆化 Longhua	20	19	1	0	0	0	0	0	0
围场 Weichang	5	5	0	0	0	0	0	0	0
总计 Total	365	182	4	34	9	114	1	2	19

员种。应用该方法，对多地的赫坎按蚊种团成员种进行了鉴别和验证，证实该方法快速简单、客观可靠。

自 1828 年中华按蚊新种发表以来，相关的分类鉴别研究屡见报道，并经过多次修订 [2]。近年，有学者报告泰国、日本和中国台湾地区的中华按蚊分为染色体核型 A 和 B [34]，两型的纯化品系在实验室杂交，显示子代可育 [34]，但未发现 ITS2 序列的固定差异 [8]。比伦按蚊与克莱按蚊是 2005 年在韩国记录的新种 [3]，随后在中国多地也有发现 [14,16,20]，基于线粒体和核糖体多个分子特征研究发现，三者的亲缘关系很近 [5-7]，组成中华按蚊复合体。笔者在中国辽宁省野外群体中发现了中华按蚊与克莱按蚊的杂合子（未发表资料），韩国也有类似报告 [36,37]，提示中华按蚊与克莱按蚊存在生殖不完

全隔离现象（属于交配后隔离）。这些研究说明中华按蚊目前应是从种内分化到新种形成的不同阶段，其间尚未形成稳定的可用于鉴别的表型特征。

中华按蚊广泛分布于亚洲，包括日本、韩国、朝鲜和中国 [2,38-39]，且是当地群体数量较大的种类，被认为是重要的传疟媒介。自中华按蚊的隐种记录后，韩国学者对克莱按蚊和比伦按蚊的生态习性和传疟作用进行了深入研究，提示 3 种均为分布地潜在的传疟媒介，克莱按蚊在现场的按蚊种群比例最高的时间是每年的春末和初夏，中华按蚊是夏末 [40-41]。从实验室感染的结果看，克莱按蚊的传疟能力超过中华按蚊 [30,40-43]。已有的研究表明，在韩国最重要的传疟媒介是雷氏按蚊和克莱按蚊 [29,41]。克莱按蚊与中华按蚊没有完全的生殖隔离，通过两蚊种在自然界的基因渗透机制是否影响传疟能力均亟待进一

步研究。

区系分布研究是蚊虫系统分类工作的重要内容之一,有学者将中国的按蚊分布分成 45°N 以北, 32°N~45°N, 25°N~32°N 和 25°N 以南等 4 个区域,按蚊区系自北至南逐渐变化,仅中华按蚊的分布遍及各区^[44-45]。严格地说,按蚊区系分布应该遵循以自然区划为基础,并综合蚊虫的生物学特点为原则,以纬度为惟一标准的划分方法不够合理。本研究基于分子鉴别的结果,汇总有或无中华按蚊分布的所有采集地,应用地理探测器软件分析其与经纬度、温度和降雨量的关系,结果提示,年平均气温是影响中华按蚊分布的最重要的变量指标,其次才是纬度。中华按蚊以成蚊越冬,温度是决定其能否顺利越冬的重要因素,分析有中华按蚊分布地点的年平均气温最低的是 9.98℃,说明中华按蚊在该温度下可以顺利越冬,故年平均气温 10℃以上地区应是中国中华按蚊的分布地区。

1997 年蚊虫志记载中华按蚊除青海省与新疆维吾尔自治区外均有分布^[2]。2017 年 Feng 等^[46]依据 332 个采集地的文献(1954 年 1 月-2016 年 9 月)进行综述,中华按蚊的分布范围与之前的记录一致。但上述研究均为基于形态分类的结果,对于形态上难以准确鉴别的赫坎按蚊种团部分成员种,尤其是中华按蚊复合体,其区系分布存在一定的偏差。本研究基于分子标志,进一步区分了中华按蚊及其隐种,发现中华按蚊在中国的分布应该小于之前记载的范围。按照行政区划,除了中国的青海、新疆、吉林、黑龙江、内蒙古和宁夏的全区,以及甘肃、西藏、四川、山西、陕西、河北和辽宁的北部,其他地区均是中华按蚊的分布区。依据目前初步记录的中国中华按蚊复合体的比伦按蚊和克莱按蚊的分布地,从南到北的基本趋势是克莱按蚊在按蚊群体中的比例越来越高,即在纬度高的地区,克莱按蚊是优势种,推测克莱按蚊可在更冷的环境下越冬,而比伦按蚊则相反。应用多重 PCR 法鉴别中华按蚊复合体,澄清克莱按蚊和比伦按蚊在中国的分布范围,并进一步研究其传疟作用,为中国疟疾消除后的媒介监测和防控策略制定提供理论依据。

志谢 感谢陈君(辽宁丹东),张婷婷(辽宁东港),黄海燕(黑龙江绥芬河),王玥(黑龙江哈尔滨),杨洋(内蒙古扎鲁特),卢国际、杜国军、石翔云(河北),程璟侠、赵俊英、代培芳(山西武乡),张红卫(河南陕县)等同志对本研究样本采集的帮助。感谢王劲峰教授在应用地理探测器软件分析方面的指导和帮助。

出版授权 作者同意以纸质版和网络版的形式同时出版。

数据和材料的可及性 本研究中的相关材料 and 数据可以向同行提供,如有需要,可与马雅军联系。

利益冲突 作者声明无利益冲突。

作者贡献 所有作者均参与样本采集,彭恒和马雅军负责实验设计、论文撰写及修改,马雅军负责蚊虫的形态鉴定,陈翰明、王琰和陈辉莹完成分子生物学实验,陈翰明、彭恒和马雅军完成数据分析。

参 考 文 献

- [1] 马雅军,徐建农. 中国按蚊的分类研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015, 26(5): 433-438.
- [2] 陆宝麟. 中国动物志 昆虫纲 第八卷 双翅目 蚊科(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [3] 方圆,施文琦,张仪. 赫坎按蚊种团(双翅目:蚊科)分类研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016, 34(6): 565-570.
- [4] Rueda LM. Two new species of *Anopheles* (*Anopheles*) *hyrcanus* group (Diptera: Culicidae) from the Republic of South Korea [J]. Zootaxa, 2005, 941: 26.
- [5] Fang Y, Shi WQ, Zhang Y. Molecular phylogeny of *Anopheles hyrcanus* group (Diptera: Culicidae) based on mtDNA COI [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6: 61.
- [6] 马颖,马雅军,琳琳,等. 基于 rDNA-ITS2 序列的中国按蚊属按蚊亚属部分的系统发育关系研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(5): 382-388.
- [7] 马颖,马雅军,王琰. 基于 mtDNA 和 rDNA 基因序列的我国按蚊属按蚊亚属系统发育研究[J]. 中国热带医学, 2015, 15(11): 1281-1288.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Gao Q, Beebe NW, Cooper RD. Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the *hyrcanus* group[J]. J Med Entomol, 2004, 41(1): 5-11.
- [11] Gao Q, Beebe NW, Cooper RD. Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the *hyrcanus* group[J]. J Med Entomol, 2004, 41(1): 5-11.
- [12] Hwang UW. Revisited ITS2 phylogeny of *Anopheles* (*Anopheles*) *hyrcanus* group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified ITS2 sequences[J]. Parasitol Res, 2007, 101(4): 885-894.
- [13] Min GS, Choochote W, Jitpakdi A, et al. Intraspecific hybridization of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) strains from Thailand and Korea [J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 198-204.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 李基旭,宋振海,朴光明. 吉林省延边地区图们江流域按蚊

- 形态学及基因特征分析 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2018, 29(1): 42-46.
- [17] 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.
- [18] 马雅军, 陈哲, 张立田, 等. 辽宁省东港市按蚊多样性和蚊虫种群动态变化研究 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(2): 57-60.
- [19] 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.
- [20] Shin EH, Lee WG, Chang KS, *et al.* Black light trap collections in Wangging County and Yanji City, Jilin Province, China, August 2006–2007 [J]. Entomol Res, 2011, 36-38.
- [21] Wang Y, Yu WQ, Shi H, *et al.* Historical survey of the kdr mutations in the populations of *Anopheles sinensis* in China in 1996–2014 [J]. Malar J, 2015, 14: 120.
- [22] Xu TL, Zhong DB, Tang LH, *et al.* *Anopheles sinensis* mosquito insecticide resistance: comparison of three mosquito sample collection and preparation methods and mosquito age in resistance measurements [J]. Parasit Vectors, 2014, 7: 54.
- [23] Chang XL, Zhong DB, Lo E, *et al.* Landscape genetic structure and evolutionary genetics of insecticide resistance gene mutations in *Anopheles sinensis* [J]. Parasit Vectors, 2016, 9: 228.
- [24] Ma YJ, Yang MN, Fan Y, *et al.* Population structure of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in China: two gene pools inferred by microsatellites [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22219.
- [25] Makhaw AM, Liu XB, Yang SR, *et al.* Genetic variations of ND5 gene of mtDNA in populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) malaria vector in China [J]. Parasit Vectors, 2013, 6: 290.
- [26] Zhang HW, Liu Y, Hu T, *et al.* Knockdown resistance of *Anopheles sinensis* in Henan province, China [J]. Malar J, 2015, 14: 137.
- [27] Zhu GD, Zhou HY, Li JL, *et al.* The colonization of pyrethroid resistant strain from wild *Anopheles sinensis*, the major Asian malaria vector [J]. Parasit Vectors, 2014, 7: 582.
- [28] Chang KS, Yoo DH, Ju YR, *et al.* Distribution of malaria vectors and incidence of vivax malaria at Korean army installations near the demilitarized zone, Republic of Korea [J]. Malar J, 2016, 15: 259.
- [29] Kang S, Jung J, Kim W. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) sensu stricto and evidence for possible introgression in the Republic of Korea [J]. J Med Entomol, 2015, 52(6): 1270-1281.
- [30] Foley DH, Klein TA, Lee IY, *et al.* Mosquito species composition and *Plasmodium vivax* infection rates on Baengnyeong-do (island), Republic of Korea [J]. Korean J Parasitol, 2011, 49(3): 313-316.
- [31] Kim HC, Rueda LM, Wilkerson RC, *et al.* Distribution and larval habitats of *Anopheles* species in northern Gyeonggi Province, Republic of Korea [J]. J Vector Ecol, 2011, 36(1): 124-134.
- [32] Khrabrova NV, Perevozkin VP, Andreeva YV, *et al.* Species composition of the mosquito *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) group in the Russian far east [J]. J Vector Ecol, 2012, 37(2): 450-452.
- [33] Khrabrova NV, Andreeva YV, Sibataev AK, *et al.* Mosquitoes of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) group: species diagnostic and phylogenetic relationships [J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 93(3): 619-622.
- [34] 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.
- [35] Baimai V, Rattanarithkul R, Kijchalao U. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: I. The hyrcanus Group [J]. J Am Mosq Control Assoc, 1993, 9(1): 59-67.
- [36] Park MH, Choochote W, Kim SJ, *et al.* Nonreproductive isolation among four allopatric strains of *Anopheles sinensis* in Asia [J]. J Am Mosq Control Assoc, 2008, 24(4): 489-495.
- [37] 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.
- [38] Choochote W, Min GS, Intapan PM, *et al.* Evidence to support natural hybridization between *Anopheles sinensis* and *Anopheles kleini* (Diptera: Culicidae): possibly a significant mechanism for gene introgression in sympatric populations [J]. Parasit Vectors, 2014, 7: 36.
- [39] Harrison BA, Scanlon JE. The subgenus *Anopheles* in Thailand (Diptera: Culicidae) [J]. Contr Amer Ent Inst, 1975, 12(1): 45-50.
- [40] Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Island) and Korea (Diptera: Culicidae) [J]. Contr Am Entomol Ins, 1979, 16(1): 987.
- [41] Foley DH, Klein TA, Kim HC, *et al.* Geographic distribution and ecology of potential malaria vectors in the Republic of Korea [J]. J Med Entomol, 2009, 46(3): 680-692.
- [42] Joshi D, Kim JY, Choochote W, *et al.* Preliminary vivax malaria vector competence for three members of the *Anopheles hyrcanus* group in the Republic of Korea [J]. J Am Mosq Control Assoc, 2011, 27(3): 312-314.
- [43] Lee WJ, Klein TA, Kim HC, *et al.* *Anopheles kleini*, *Anopheles pullus*, and *Anopheles sinensis*: potential vectors of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea [J]. J Med Entomol, 2007, 44(6): 1086-1090.
- [44] Ubalee R, Kim HC, Schuster AL, *et al.* Vector competence of *Anopheles kleini* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) from the Republic of Korea to vivax malaria-infected blood from patients from Thailand [J]. J Med Entomol, 2016, 53(6): 1425-1432.
- [45] 陆宝麟. 中国动物志 昆虫纲 第八卷 双翅目 蚊科 (上卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [46] Feng XY, Zhang SS, Huang F, *et al.* Biology, bionomics and molecular biology of *Anopheles sinensis* Wiedemann 1828 (Diptera: Culicidae), main malaria vector in China [J]. Front Microbiol, 2017, 8(1): 1473.

(收稿日期: 2019-06-13 编辑: 陈勤)