

库蠓核糖体 DNA 内转录间隔区 1 序列的测定与分析

岑常活, 韩晓静, 常琼琼, 段琛, 侯晓晖

摘要: 目的 测定核糖体 DNA 内转录间隔区 1(nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1, rDNA-ITS1) 序列进行库蠓种类鉴别与系统发育分析, 以探究 rDNA-ITS1 序列在库蠓分子鉴定和系统发育研究方面的适用性。方法 采用 DNA 扩增、纯化、克隆及测序的方法获得荒川库蠓 *Culicoides arakawai*、凹缘库蠓 *C. holcus*、连斑库蠓 *C. jacobsoni*、印度库蠓 *C. indianus*、霍飞库蠓 *C. huffi* 和肩宏库蠓 *C. humeralis* 等 6 种库蠓的 rDNA-ITS1 序列, 基于 Kimura 2-parameter 公式计算种内和种间遗传距离, 应用 MEGA 6.06 软件分析 DNA 序列碱基组成并以环纹埃蠓 *Allohelea annulata* 为外群构建系统发育树(邻接法和最大似然法)。结果 上述 6 种库蠓的 rDNA-ITS1 序列经过 Clustal W 比对及人工校对和编辑后的长度为 352 bp, 其中 T、C、A、G 4 种碱基的含量分别为 36.8%、13.0%、30.0% 和 20.1%, A+T 的含量(66.8%)高于 C+G 的含量(33.1%); K-2p 遗传距离在种内和种间具显著差异($t=32.430, P<0.05$); 系统发育树中不同种类库蠓各自构成单系(群), 同种类不同地理种群聚为一支, 其与形态学鉴定结果一致。结论 本研究证实了 rDNA-ITS1 序列可用于进行库蠓及其近似种的分子鉴定和系统发育分析。

关键词: 库蠓; 近似种; 分子鉴定; 系统发育; rDNA-ITS1

中图分类号: R384.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2018)12-1087-08

Sequence and analysis of rDNA-ITS1 of the genus *Culicoides* (diptera: ceratopogonidae)

CEN Chang-huo, HAN Xiao-jing, CHANG Qiong-qiong, DUAN Chen, HOU Xiao-hui

(Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: We analysed the phylogenetic relationship and establish molecular identification of *Culicoides* species by sequencing the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. The ITS1 sequences of six closely related species of the genus *Culicoides*, *C. arakawai*, *C. holcus*, *C. jacobsoni*, *C. indianus*, *C. huffi* and *C. humeralis*, were obtained by DNA sequencing. The calculation of genetic distance was based on Kimura 2-parameter formula. The base composition of ITS1 sequences and construction of phylogenetic trees which took the *Allohelea annulata* as outgroup were analyzed by MEGA 6.06v. Approximately 352 bp of ITS1 sequences were sequenced for those 6 species and the content of T, C, A, G of the sequences were 36.8%, 13.0%, 30.0%, 20.1%, respectively. Statistical analysis of genetic distances showed that intraspecific genetic distances was different from that of interspecies significantly ($t=32.430, P<0.05$). The results of phylogenetic relationship were consistent with the morphological identification which indicated that the topologies of Maximum Likelihood (ML) tree and Neighbor-Joining (NJ) tree were quite similar; distinguished between different species of *Culicoides* clearly and no cross between different species; the same species gathered closely with each other. This study confirmed that rDNA-ITS1 sequences can be used for molecular identification and phylogenetic analysis in the genus *Culicoides*.

Keywords: *Culicoides*; sibling species; molecular identification; phylogenetics; rDNA-ITS1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81802040), the Zunyi Science and Technology Innovation

国家自然科学基金(No.81802040),遵义市科技创新人才团队培养项目[遵市科合(2015)40号]和大学生创新创业训练计划(No. 201713653004、遵医科学院 No.20162303)联合资助

通讯作者: 侯晓晖, Email: hxh19801122@163.com

作者单位: 遵义医学院, 遵义 563000

Talent Team Training Project (No. 40 of 2015), and the College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (Nos. 201713653004 & 20162303)

Corresponding author: Hou Xiao-hui, Email: hxh19801122@163.com

库蠓(*Culicoides* Latreille)俗称“墨蚊”、“小咬”,隶属于昆虫纲(insecta)、双翅目(diptera)、蠓科(ceratopogonidae),全世界现有1 368种、中国已知348种^[1-2],是引起野生和家养反刍动物流行病的重要媒介昆虫,其通过刺吸动物血液来传播蓝舌病(BT)、家畜流行病出血热(EHD)、非洲马瘟病(AHS)等诸多动物传染病^[3]。上述疾病的病原通过媒介库蠓和易感宿主之间的一系列复制循环而持续存活于自然界中^[4],因而其易于引发医疗卫生和兽医等领域的家畜流行病,从而造成牛、羊等养殖业的巨大经济损失,欧洲曾发生过蓝舌病大流行^[5-6],国内云南、广西、新疆和内蒙古等29个省也曾先后在牛羊血液中检测出蓝舌病病毒(BTV)^[7]。目前,BT和AHS已被世界动物卫生组织(OIE)列为A类传染病^[8],中国也将BT列为一类动物疫病^[9]。

库蠓体型微小、鉴别特征稀少,传统分类鉴定尚存在诸多问题。首先是未成虫阶段的虫态和虫体残缺的成虫均难以鉴定,其次受库蠓性别限制,雄虫借助外生殖器等形态特征易于鉴别,而雌虫缺乏良好的尾器特征而不易鉴别,最后库蠓表型可塑性和遗传可变性等也容易导致误判^[10-12]。因此,库蠓分类中亟需快速、准确鉴定种类的技术方法,对蠓传疾病的监控、防治具有重要意义。

随着分子生物学和生物信息学的快速发展,分子生物学技术已应用于昆虫分类鉴定和系统演化等领域,这在很大程度上弥补了传统形态分类的不足,尤其是近似种或隐种的分类^[13-15]。在昆虫核基因中,串联重复是核糖体DNA(rDNA)的存在形式,同时其一个转录单元包括18S、5.8S、28S三个部分,而ITS1和ITS2两个可变区则分别位于18S和5.8S以及5.8S和28S之间^[16]。目前,昆虫分子系统学研究也主要集中在rDNA的ITS、28S rRNA和18S rRNA等区域。高度保守的序列通常应用于高级分类阶元的系统发育研究,如28S rRNA和18S rRNA^[17];而变异较大、选择压力小的序列则适用于种属水平上的研究,如ITS1和ITS2序列^[18],且已广泛应用于媒介昆虫的种类鉴定^[19-20]。然而,蠓科昆虫的分子系统学研究,自1992年Tabachnick等^[21]报道变翅库蠓(*Culicoides variipennis*)种群的基因差异开始,之后国外关于蠓科分子系统学的研究与日剧增^[22-26],但国内相关研究严重不足。

因此,本研究以埃蠓属的环纹埃蠓 *Allohelea*

annulata 为外群,对库蠓属中的凹缘库蠓 *C. holcus*、连斑库蠓 *C. jacobsoni*、印度库蠓 *C. indianus*、荒川库蠓 *C. arakawai*、霍飞库蠓 *C. huffi* 和肩宏库蠓 *C. humeralis* 等6种库蠓进行分类研究(凹缘库蠓 *C. holcus*、和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 为二囊亚属近似种),通过联合形态学特征和核糖体DNA-ITS1序列数据,弥补传统形态鉴定的不足,进一步证实ITS1序列在库蠓及其近似种的分类鉴别方面的适用性,为解决蠓科昆虫分类中形态学数据难以解决的问题提供更多的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 库蠓标本 本研究共使用7种23只蠓虫标本的数据,其中18只为本研究组2015年7月采自广西大瑶山自然保护区,其余5只的数据来自GenBank数据库,详见表1。

1.1.2 主要试剂及仪器 基因组提取试剂盒(QIAGEN, 德国)、*p* EASY-T1 克隆试剂盒(北京全式金公司, 中国)、PCR MasterMix(TIANGEN, 中国)、引物(上海捷瑞生物工程有限公司)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(TIANGEN, 中国)、琼脂糖(Biowest Agarose, 西班牙)、PCR 扩增仪(美国 BOI-RAD 公司)、UVP 凝胶成像系统(美国 BOI-RAD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 库蠓采集 采用网捕法和灯诱法,在广西大瑶山自然保护区不同生境设置采样点进行蠓虫收集,并将其保存于无水乙醇中。

1.2.2 标本鉴定 按照常规方法进行标本的分选、解剖、制片、鉴定以及拍照,且胸部标本单独编号保存在无水乙醇中。

1.2.3 基因组 DNA 将库蠓标本研磨至无明显组织块,按照 QIAGEN DNeasy Blood& Tissue Kit 说明书进行其基因组 DNA 提取,并保存至-20℃备用。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 扩增的上游引物为 PanCulF (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'),下游引物为 PanCulR (5'-TGCAGTCTTCATCGAC-CCAT-3'),由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 扩增的体系如表2所示,其反应条件为94℃预变性3 min;94℃30 s,40℃60 s,68℃60 s,循环5次;94℃60 s,44℃60 s,68℃60 s,循环35次;最后68℃延伸10 min。

表 1 供试库蠓的详细信息

Tab.1 Detailed information of the biting midges in this study

属	亚属	种名	雌雄	采集地点	标本编号	GenBank 登录号
库蠓属 <i>Culicoides</i>	带纹亚属 <i>Beltranmyia</i>	荒川库蠓 <i>C. arakawai</i>	雄虫	广西大瑶山自然保护区	GX6	MH809951
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX237	MH809952
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX4	MH809953
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX-5	MH809954
			雌虫	中国广东省	—	AJ489503.1
			雌虫	日本鹿儿岛	—	AB462265.1
三囊亚属 <i>Trithecoidea</i>	肩宏库蠓 <i>C. humeralis</i>		雌虫	日本鹿儿岛	—	AB462282.1
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX235.9	MH809955
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX235.8	MH809956
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX235.2	MH809957
			雌虫	日本鹿儿岛	—	AB462262.1
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX18	MH809958
二囊亚属 <i>Avaritia</i>	连斑库蠓 <i>C. jacobsoni</i>		雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX19	MH809959
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX12	MH809960
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX13	MH809961
			雌虫	日本鹿儿岛	—	AB462268.1
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX14	MH809962
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX15	MH809963
库蠓亚属 <i>Culicoides</i>	印度库蠓 <i>C. indianus</i>		雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX16	MH809964
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX239.1	MH809965
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX10	MH809966
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX256.1	MH809967
			雌虫	广西大瑶山自然保护区	GX1	MH809968
埃蠓属 <i>Allohelea</i>	—	环纹埃蠓 <i>A. annulata</i>	雌虫	广西大瑶山自然保护区		
			雌虫	广西大瑶山自然保护区		

表 2 PCR 扩增体系

Tab.2 PCR amplification system

组份	体系/ μ L
DNA 模板	1.5
上游引物(10 μ mol/L)	1
下游引物(10 μ mol/L)	1
2×PCR MasterMix	12.5
ddH ₂ O	9
合计	25

1.2.5 PCR 扩增产物纯化、克隆及测序 将 PCR

扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 同时利用 DNA 回收试剂盒进行 DNA 产物的纯化, 之后使用 *p* EASY-T1 克隆试剂盒进行 DNA 克隆, 最后用 60% 甘油保存阳性克隆菌液并送至上海生物工程股份有限公司进行双向测序。

1.2.6 rDNA-ITS1 序列分析 利用 Clustal X、DNA MAN、MEGA 6.06 等软件对本研究中 rDNA-ITS1 序列进行比对、编辑、比较等分析, 统计序列中各碱基(A、T、C、G)的组成比例以及保守位点(Conserved sites, C)、变异位点(Variable sites, V)、简约信息位点(Parsim-Imformative sites, Pi)和自裔位点(Singleton sites, S)的数量。同时, 以

Kimura 双参数模型计算遗传距离, 并以环纹埃蠓 *A. annulata* 为外群, 通过邻接法(NJ)、最大似然法(ML)构建分子系统树, 并通过 Bootstrap 1 000 次自举检验系统树中各结点的置信值。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据以均数±标准差表示。两两比较采用两独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

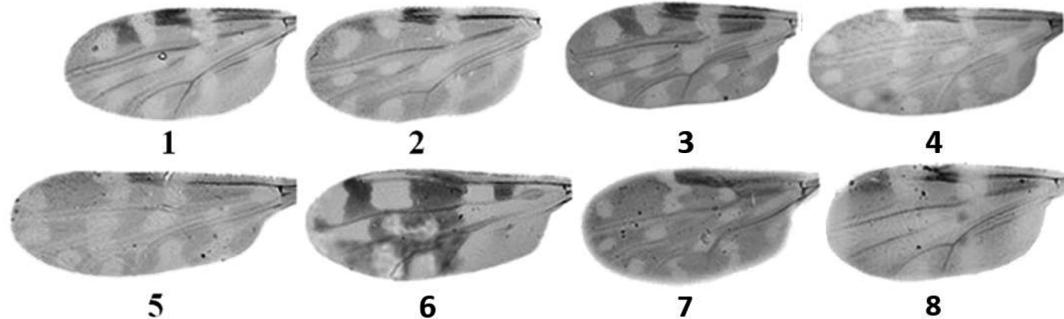
2.1 形态学特征对比 本研究内群的 6 种库蠓形

态上比较接近, 尤其是凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 最为近似, 以凹缘库蠓 *C. holcus*、连斑库蠓 *C. jacobsoni* 和荒川库蠓 *C. arakawai* 为例(表 3、图 1)进行形态特征比较。上述 3 种库蠓中雄虫可根据其尾器的 4 个特征进行有效鉴别, 但雌虫中仅荒川库蠓 *C. arakawai* 可直接根据头部、翅部和腹部的明显差异进行准确区分, 另外二囊亚属的两近似种除翅部特征的细微差别外, 余未见差异, 故鉴定非常困难。

表 3 本研究三种库蠓形态特征对比

Tab.3 Comparison of morphological features of three *Culicoides*

种类	头部				翅部				腹部(雌)				尾器(雄)		
	复眼 是否	小眼面 间有无	触须第 3 节有 无感觉 连接	小眼面 是否有 柔毛	翅面淡、 暗斑是 否	径端淡 斑是否	径 5 室 延伸至 中 1 脉	中 4 室 否远离 端缘	臀室 淡斑 数目	臀室淡 斑是否 连接	受精 囊形态	受精 囊数目	第 9 背板形 态	第 9 腹板形 态	阳茎 中叶形 态
凹缘库蠓 <i>C. holcus</i>	是	无	有	否	否	是	否	2	否	近椭圆形	2	后缘两侧呈宽的钝角	后缘中部凹陷	宽大端部呈叉形	侧突基部略尖
连斑库蠓 <i>C. jacobsoni</i>	是	无	有	是	否	是	否	2	是	椭圆形	2	后缘钝圆中部凹陷无侧突	后缘中部凹陷	近锥形	侧突基部分离
荒川库蠓 <i>C. arakawai</i>	否	无	有	是	否	否	是	4	是	梨形	1	后缘中弧形浅凹, 膜有微毛	后缘中部突起	侧突端部呈扩展的截形	基部扩展, 外侧缘弯



1: 凹缘库蠓 *C. holcus*; 2: 连斑库蠓 *C. jacobsoni*; 3: 印度库蠓 *C. indianus*; 4: 荒川库蠓 *C. arakawai*(雌); 5: 荒川库蠓 *C. arakawai*(雄); 6: 环斑埃蠓 *A. annulata*; 7: 霍飞库蠓 *C. huffi*; 8: 肩宏库蠓 *C. humeralis*

图 1 库蠓近似种一侧翅图

Fig.1 Wing of one side of sibling species

2.2 DNA 序列分析 本研究获得的 DNA 序列经 Clustal W 比对和人工校对后, 得到 rDNA-ITS1 的

序列长度为 352 bp, 该序列中存在较多的插入和缺失位点。通过 MEGA 6.06 软件分析 ITS1 序列中

T、C、A、G 四种碱基的平均含量分别为 36.8%、13.0%、30.0% 和 20.1%，其中 A+T 平均含量约为 66.8%，C+G 平均含量约为 33.1%；而在 3 个密码子位点中，第 1 位点的 A+T 含量相对最高（67.7%），第 3 位点 A+T 平均含量相对最低（64.6%）。此外，ITS1 序列中保守位点（C）、变异位点（V）、简约信息位点（Pi）和自裔位点（S）的个数分别为 163、189、182 和 7，其中变异位点（V）占比约为 53.7%。

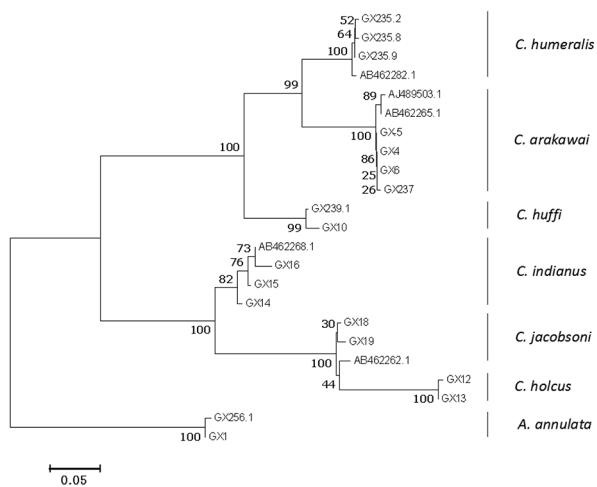
2.3 序列同源性比对 将本研究所获全部库蠓 ITS1 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源比对，搜索到部分同源序列，即荒川库蠓 *C. arakawai*（登录号：AB462265、AJ489503，序列相似度：99%）、连斑库蠓 *C. jacobsoni*（登录号：AB462262，序列相似度：97%）、印度库蠓 *C. indianus*（登录号为 AB462268，序列相似度：93%）。

2.4 遗传距离 利用 MEGA 6.06 软件计算本研究中蠓虫 ITS1 序列的遗传距离，种内和种间的遗传距离范围分别为 0.000~0.020 和 0.113~0.621，通过统计软件分析得出种内组和种间组的遗传距离（均数±标准差）分别为 0.009 ± 0.008 和 0.391 ± 0.169 ，两者差异具有统计学意义 ($t=32.430$, $P < 0.05$)。

2.5 系统发育分析 以环纹埃蠓 *A. annulata* 为外群，采用邻接法（NJ）和最大似然法（ML）分别构建 6 种库蠓的系统发育树，得到基本一致的拓扑结构（图 2、3）。系统发育树聚类分析表明：1) 各物种间分别构成单系（群），同种不同地理种群聚为一支，且种间无交叉。2) 物种间亲缘关系明显，二囊亚属的凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 两种首先聚在一起，亲缘关系较近并构成一个姊妹群，再与库蠓亚属的印度库蠓 *C. indianus* 并为一大支，同时带纹亚属的荒川库蠓 *C. arakawai* 与三囊亚属的肩宏库蠓 *C. humeralis* 亲缘关系较近先聚为一小支，再与屋室亚属的霍飞库蠓 *C. huffi* 结合构成一大支，之后两大支聚合形成内群，而外群埃蠓属的环纹埃蠓 *A. annulata* 在树的根部，外群与内群形成完整的有根树。

3 讨论

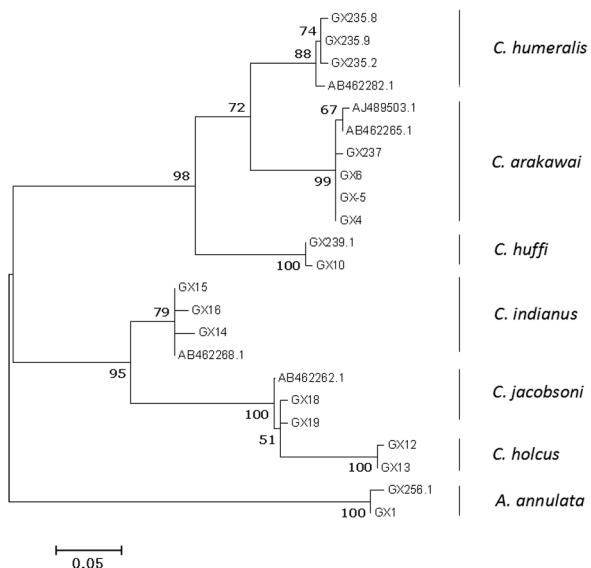
核糖体 DNA 内转录间隔区 1 (nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1, rDNA-ITS1) 基因位于核糖体 DNA 的 18S 和 5.8S 之间，其特点为：①属于中度重复序列；②不承担编码蛋白质的功能，也不参与核糖体的形成，故承受的选择压



各分支上的数字为自举检验置信值 1 000 次

图 2 基于 rDNA-ITS1 序列构建的 NJ 树

Fig.2 Neighbor-Joining tree constructed based on rDNA-ITS1 sequence



各分支上的数字为自举检验置信值 1 000 次

图 3 基于 rDNA-ITS1 序列构建的 ML 树

Fig.3 Maximum Likelihood tree constructed based on rDNA-ITS1 sequence

力较小，进化速度相对较快，从而具有高变性；③在 ITS1 序列两侧的 18S 和 5.8S 序列具有保守性，便于通用引物的设计、PCR 扩增和测序；④序列的组成、长度以及折叠方式存在多态性，可用于属、种和种群水平的研究^[27-28]。目前，应用 ITS1 解决亲缘关系较近的库蠓分类以及系统关系的研究较多，如 Mathieu 等^[29] 通过设计 ITS1-5.8S-ITS2 的 Taq-Man 探针对不显库蠓 (*Culicoides obsoletus*) 和苏格兰库蠓 (*Culicoides scoticus*) 进行双重实时荧光定量 PCR 实验，Deblauwe 等^[30] 通过设计 ITS1 的

DNA 微阵列形式的探针杂交对不显库蠓种群(*Obsoletus group*)的库蠓进行分子鉴定,说明 ITS1 是库蠓种间和种内遗传分化程度及系统进化研究的良好指标。因此,基于库蠓形态特征和 rDNA-ITS1 序列数据的基础上对 6 种吸血蠓进行鉴定和分析,其研究结果表明形态学特征与分子数据具有一致性,共同验证了 rDNA-ITS1 基因序列在吸血库蠓(包括近似、近缘种)鉴别和系统发育研究中的适用性。

本研究 rDNA-ITS1 序列的碱基组成中 A+T 的平均含量(76.8%)远高于 C+G 的平均含量(33.2%),具有 AT 偏向显著。同时,该序列的变异位点(189 个)较多,占比约为 53.7%,且相对于线粒体基因(如 COI 和 Cytb)其还存在较多的插入和缺失位点。*Cêtre-Sossah* 等^[31]利用 ITS1 序列对盛行于非洲和欧洲的蓝舌病及非洲马瘟病的主要传播媒介库蠓——残翅库蠓 *C. imicola* 进行分子鉴定,通过设计特异引物可得到长度各不相同的 ITS1 扩增产物,根据电泳条带的位置即可进行种类鉴别;同时,*Gomulski* 等^[32]利用 rDNA-ITS2 序列探究库蠓亚属及近缘种的系统发生,研究发现其存在明显的多态性,表明绝大多数库蠓的 ITS 序列存在多态性,而并非是由于 PCR 扩增过程中产生的错误所致。

进一步对库蠓遗传距离研究发现,各种间遗传距离(0.113~0.621)明显大于各种内遗传距离(0.000~0.020),其中最大种内遗传距离(印度库蠓 *C. indianus*:0.020)亦小于最小种间遗传距离(凹缘库蠓 *C. holcus* 与连斑库蠓 *C. jacobsoni*:0.113),进一步说明库蠓种间和种内遗传距离不存在重叠区,足以进行准确区分。同时,种间平均遗传距离(0.411)为种内平均遗传距离(0.010)的 41 倍,也完全符合 *Hebert* 等^[33-34]提出的物种鉴定规则。因此,rDNA-ITS1 基因可应用于库蠓的分子分类。然而,本研究中印度库蠓 *C. indianus* 的种内遗传距离相对其他种类略大(0.020),*Matsumoto* 等^[35]在基于 ITS1 和 ITS2 对 25 种库蠓进行研究的过程中发现印度库蠓 *C. indianus* 存在 ITS1 长和短两种序列类型,这可能就是造成本研究中其种内遗传距离偏大的原因。另外,关于昆虫近缘种杂交的问题,*Pesson* 等^[36]在对白蛉亚科昆虫进行研究时发现其确实存在近缘物种杂交,但本研究中采自统一地点的凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 并未发现任何基因渗透现象,这与 *Ritchie* 等^[37]和 *Augot* 等^[15]关于库蠓的研究结果相一致。

此外,在对 6 种库蠓的 DNA 序列聚类分析研究中发现,其与形态学鉴定和遗传距离计算的结果基本相同,如凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 两近似种同属二囊亚属,其形态学特征相似且种间遗传距离(0.113)最小,在系统发育树中优先聚在一起构成姊妹群。然而,来自日本的连斑库蠓 *C. jacobsoni* (AB462262.1)与我国广西的种类首先分开,从拓扑结构上来看我国广西的凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 聚为一支,但是从时间节点和分支长短来看同属连斑库蠓 *C. jacobsoni* 的种类具有更近的亲缘关系。此外,构建的 NJ 树和 ML 树的拓扑结构也基本一致,在种间和种内的分支上均具较高的置信值,说明应用 rDNA-ITS1 基因构建的分子进化树能明显区分库蠓及其近似种,可靠程度较高。然而,荒川库蠓 *C. arakawai* 和肩宏库蠓 *C. humeralis* 的种内存在置信值高低不等的差异,这与 *Gomulski* 等^[38]在基于同为核糖体 DNA-ITS 区的 ITS2 序列对包括不显库蠓 *Culicoides obsoletus* 在内的二囊亚属进行系统发育关系的研究过程中的情况类似,究其原因可能主要是两种建树方法之间存在建树理论基础和建树偏向性方面的差异。与此同时,在种内个别分支上亦存在相对较低的置信值,如凹缘库蠓 *C. holcus* 和连斑库蠓 *C. jacobsoni* 之间的置信值仅为 51,这与 *李玮玮*^[39]等对小蔗螟的研究以及 *秦芳*^[40]等对利川马遗传多态性的研究得到的结果相似,其可能是由于 ITS1 序列在碱基组成及变异速度方面存在差异以及 ITS1 序列片段短(352 bp,且存在插入和缺失位点)和样本数量少($n=23$)等导致提供的有效分子遗传学信息有限有关。

在广泛使用 ITS1 等核糖体内转录间隔区的基因序列进行分析时,发现它存在基因的横向转移、重复以及外显子拼接、域拼接等非线性的现象,说明其并非对所有物种都具有适用性^[28]。同时,在核基因组研究中发现其存在线粒体假基因(NUMTs)的插入现象,这毋庸置疑是影响核基因的分子鉴定过程中准确性的又一不利因素^[41]。目前,蠓科学者在进行库蠓的系统发育分析时,不仅仅是从传统形态学角度进行单因素的分析,同时还联合线粒体基因、核基因,甚至是三维形态重建等多方面进行综合比对分析,如 *Augot* 等^[15]联合 Cytb、CO I、ITS1 和形态学特征可进行翅痣库蠓(*Culicoides stigma*)和帕罗库蠓(*Culicoides parroti*)等近似种的准确鉴别。同时,分类学家们也在不断发掘新的分子标记和分类技术,如 CAD 基因和几何形态学等在库蠓的分子

系统学研究中的应用^[42-43]。因此,在后续的昆虫分子系统学研究领域中的趋势将是结合生态学、形态学特征和多个分子标记数据等多重分类变量以及开发新分子标记和分类技术来进行更为全面、系统的分析。

参考文献:

- [1] Borkent A. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae)[J]. Bull Am Mus Nat Hist, 2006, 233 (233) : 1-257.
- [2] Chang QQ, Jiang XH, Liu GP, et al. A species checklist of the subgenus *Culicoides* (Avaritia) in China, with a description of a new species (Diptera, Ceratopogonidae)[J]. ZooKeys, 2017, 706: 117-135. DOI: 10.3897/zookeys.706.13535
- [3] Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, et al. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses[J]. Annu Rev Entomol, 2015, 60: 373-392. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020614
- [4] White DM, Wilson WC, Blair CD, et al. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects[J]. J Gen Virol, 2005, 86 (Pt 2): 453-462. DOI: 10.1099/vir.0.80290-0
- [5] Hoffmann B, Scheuch M, Hoper D, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(3): 469-472. DOI: 10.3201/eid1803.111905
- [6] Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14 (4): 539-544. DOI: 10.3201/eid1404.071441
- [7] 王飞鹏, 黄恩炯, 蔡亨忠, 等. 吸血蠓及其传播的疾病[J]. 昆虫知识, 2010, 47(6): 1270-1273. DOI: 10.7679/j.issn.2095-1353.2010.230
- [8] Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, et al. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences[J]. Med Vet Entomol, 2006, 20(2): 219-228. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2006.00616.x
- [9] 李楠, 朱建波, 肖雷, 等. 云南蓝舌病病毒1型毒株M6基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2): 340-347. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2016.02.008
- [10] 贺骥, 宋福春, 苏水宽, 等. DNA条形码技术应用于口岸吸血蠓类快速分子鉴定的研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2014, 20 (2): 131-135.
- [11] 同娇, 姜丽, 郭琴, 等. DNA条形码技术在双翅目昆虫中的应用[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2015, 35(3): 66-72. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1114.2015.03.015
- [12] Yanase T, Matsumoto Y, Matsumori Y, et al. Molecular identification of field-collected *Culicoides* larvae in the Southern part of Japan[J]. J Med Entomol, 2013, 50(5): 1105-1110. DOI: 10.1603/me11235
- [13] Boykin LM, Shatters RG Jr, Rosell RC, et al. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 44(3): 1306-1319. DOI: 10.1016/j.ympev.2007.04.020
- [14] Monti MM, Nappo AG, Giorgini M. Molecular characterization of closely related species in the parasitic genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene[J]. Bull Entomol Res, 2005, 95 (5): 401-408. DOI: 10.1079/ber2005371
- [15] Augot D, Ninio C, Akhouni M, et al. Characterization of two cryptic species, *Culicoides stigma* and *C. parroti* based on barcode regions and morphology[J]. J Vector Ecol, 2013, 38(2): 260-265. DOI: 10.1111/j.1948-7134.2013.12039.x
- [16] Tautz D, Hancock JM, Webb DA, et al. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*[J]. Mol Biol Evol, 1988, 5 (4): 366-376. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040500
- [17] Dietrich CH, Rakitov RA, Holmes JL, et al. Phylogeny of the major lineages of *Membracoidea* (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 18(2): 293-305. DOI: 10.1006/mpev.2000.0873
- [18] Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania* donovani complex[J]. Microbes Infect, 2005, 7(11/12): 1224-1234. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.04.009
- [19] Kengne P, Awono-Ambene P, Antonio-Nkondjio C, et al. Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors[J]. Med Vet Entomol, 2003, 17(1): 67-74. DOI: 10.1046/j.1365-2915.2003.00411.x
- [20] Gentile G, Della Torre A, Maegga B, et al. Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s. and the problem of taxonomic status[J]. Genetics, 2002, 161(4): 1561-1578. PMID: 12196401
- [21] Tabachnick WJ. Genetic differentiation among populations of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae), the North American vector of bluetongue virus[J]. Ann Entomol Soc Am, 1992, 85(2): 140-147. DOI: 10.1093/ae/85.2.140
- [22] Pages N, Munoz-Munoz F, Talavera S, et al. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions[J]. Vet Parasitol, 2009, 165 (3/4): 298-310. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.07.020
- [23] Augot D, Sauvage F, Jouet D, et al. Discrimination of *Culicoides oboletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(5): 629-637. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.03.016
- [24] Stur E, Borkent A. When DNA barcoding and morphology mesh: Ceratopogonidae diversity in Finnmark, Norway[J]. Zookeys, 2014, (463): 95-131. DOI: 10.3897/zookeys.463.7964
- [25] Ander M, Troell K, Chirico J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination[J]. Med Vet Entomol, 2013, 27(3): 323-331. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01050.x
- [26] Augot D, Ninio C, Akhouni M, et al. Characterization of two cryptic species, *Culicoides stigma* and *C. parroti* (Diptera:

- Ceratopogonidae), based on barcode regions and morphology [J]. *J Vector Ecol*, 2013, 38(2): 260-265. DOI: 10.1111/j.1948-7134.2013.12039.x
- [27] 马婷婷, 陈光, 刘春香. ITS序列的特点及其在昆虫学研究中的应用[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(3): 710-715. DOI: 10.7679/j.issn.2095-1353.2011.121
- [28] 刘延滨, 姬兰柱. 核 rDNA-ITS 序列在昆虫学研究上的应用 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(5): 1137-1142. DOI: 10.3321/j.issn:1001-9332.2007.05.034
- [29] Mathieu B, Delecolle JC, Garros C, et al. Simultaneous quantification of the relative abundance of species complex members: application to *Culicoides oboletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue virus[J]. *Vet Parasitol*, 2011, 182(3/4): 297-306. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.09.024
- [30] Deblauwe I, de Witte JC, de Deken G, et al. A new tool for the molecular identification of *Culicoides*, species of the *Obsoletus* group: the glass slide microarray approach[J]. *Med Vet Entomol*, 2012, 26(1): 83-91. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2011.00979.x
- [31] Cêtre-Sossah C, Baldet T, Delécolle JC, et al. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe[J]. *Vet Res*, 2004, 35(3): 325-337. DOI: 10.1051/vetres:2004015
- [32] Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, et al. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences [J]. *Med Vet Entomol*, 2006, 20(2): 229-238. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2006.00620.x
- [33] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312
- [34] Hebert PD, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14812-14817. DOI: 10.1073/pnas.0406166101
- [35] Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, et al. Characterization of internal transcribed spacer (ITS1)-ITS2 region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan[J]. *J Med Entomol*, 2009, 46(5): 1099-1108. DOI: 10.1603/033.046.0517
- [36] Pesson B, Ready JS, Benabdennbi I, et al. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif [J]. *Med Vet Entomol*, 2004, 18(1): 25-37. DOI: 10.1111/j.0269-283x.2004.0471.x
- [37] Ritchie A, Blackwell A, Malloch G, et al. Heterogeneity of ITS1 sequences in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) suggests a population in Argyll, Scotland, may be genetically distinct[J]. *Genome*, 2004, 47(3): 546-558. DOI: 10.1139/g04-003
- [38] Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, et al. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia*, Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus*, (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences[J]. *Syst Eetomol*, 2005, 30(4): 619-631. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2005.00286.x
- [39] 李玮玮, 张修月, 陈伟才, 等. 小蔗螟 Cytb 基因序列的分析研究 (鳞翅目: 蛾蝶总科: 草螟亚科)[J]. 四川动物, 2009, 28(3): 353-357. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2009.03.008
- [40] 秦芳, 王小斌, 张云生, 等. 利川马 mtDNA Cytb 基因遗传多态性分析[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(12): 2935-2937. DOI: 10.3969/j.issn.0439-8114.2009.12.007
- [41] Bensasson D, Zhang DX, Hewitt GM. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes[J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(3): 406-415. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026320
- [42] Bellis G, Dyce A, Gopurenko D, et al. Revision of the *Culicoides Avaritia* imicola complex Khamala & Kettle (Diptera: Ceratopogonidae) from the Australasian region[J]. *Zootaxa*, 2014, 3768: 401-427. DOI: 10.11646/zootaxa.3768.4.1
- [43] Hajd Henni L, Sauvage F, Ninio C, et al. Wing geometry as a tool for discrimination of obsoletus group (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in France[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 110-117. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.10.008

收稿日期:2018-05-16 编辑:张智芳