

## 利用 DNA 条形码技术发现贵州省蚋类新记录<sup>\*</sup>

张圣芳<sup>1</sup>, 贾 若<sup>2</sup>, 杨曜铭<sup>2</sup>, 王 毅<sup>2</sup>, 寻 慧<sup>2</sup>, 陈汉彬<sup>2</sup>, 杨 明<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 综合利用 DNA 条形码序列和形态学特征鉴定蚋种。方法: 利用车载式捕虫网于 2014 年 7 ~ 9 月在贵州省雷山、江口、德江、关岭和开阳 5 县采集蚋类标本, 并进行初步的形态学鉴定; 测定雌蚋 DNA 条形码序列, 利用生命数据条形码系统 (BOLD) 及系统发育分析方法鉴定蚋种。结果: 初步确定划分蚋属下蚋种的 K2P 距离阈值为 4%, 利用该阈值及生命数据条形码系统鉴定 153 只雌蚋为麻子绳蚋。结论: 麻子绳蚋为贵州省蚋类新记录, 分布于雷山、江口、德江、关岭和开阳 5 县。

**[关键词]** 蚋科; DNA 条形码; 生物形态; 贵州; 生命数据条形码系统; 系统发育分析

**[中图分类号]** R384.5; Q962 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)11-1245-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.11.002

## A New Record of Simuliidae Found by DNA Barcoding in Guizhou Province

ZHANG Shengfang<sup>1</sup>, JIA Ru<sup>2</sup>, YANG Yaoming<sup>2</sup>, Wang Yi<sup>2</sup>, XUN Hui<sup>2</sup>, CHEN Hanbin<sup>2</sup>, YANG Ming<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify blackfly species with combined data of DNA barcodes and morphological characteristics. **Methods:** Blackflies were collected with a vehicle-mounted trap on July to September of 2014 at Leishan, Jiangkou, Dejiang, Guanling, and Kaiyang counties in Guizhou Province, and preliminary morphological identification was performed. Female simulum DNA barcode sequence was detected. Barcode of Life Data Systems (BOLD) and phylogenetic analysis methods were adopted to identify blackfly species. **Results:** It was preliminarily determined that the threshold value of K2P distance in differentiating Simulium blackfly species and 153 *Simulium (Gomphostilbia) asakoe* individuals were identified with BOLD and the threshold value. **Conclusion:** *S. (G.) asakoe* is a new record of blackfly, distributing at Leishan, Jiangkou, Dejiang, Guanling, and Kaiyang in Guizhou Province.

**[Key words]** simuliidae; DNA barcode; organism forms; Guizhou; barcode of life data systems; phylogenetic analysis

蚋类, 又称黑蝇 (Black fly), 属于双翅目 (Diptera)、蚋科 (Simuliidae), 是医学昆虫中一类重要的媒介昆虫。蚋类通过刺叮吸血, 骚扰人畜禽或传播疾病, 在生活 and 生产上给人类带来不同程度的危害<sup>[1]</sup>。蚋类具有突出的形态相似性, 种属鉴定通常需要不同发育时期 (包括幼虫、蛹和成虫) 的成套标本, 对单一虫期标本的鉴定往往十分困难<sup>[2]</sup>。

近年来, 本研究借鉴国外方法, 利用车载式捕虫网采集蚋类成虫, 涉及对单个雌虫进行鉴定的问题<sup>[3]</sup>。单个雌虫无法用形态学方法予以准确鉴定, 需利用 DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 进行辅助鉴定。DNA 条形码技术由 Hebert 等<sup>[4]</sup>于 2003 年提出, 核心思想是以线粒体 CO I 基因 5' 端一长 658 bp 的序列 (称为 DNA 条形码) 作为鉴定

<sup>\*</sup> [基金项目] 贵州省社会发展攻关项目 [黔科合 SY(2012)3083]; 国家自然科学基金 (30660021)

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: id.yang.ming@gmail.com

网络出版时间: 2016-11-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161115.1757.028.html>

动物物种的通用遗传标记,该技术在双翅目、直翅目、膜翅目、蜻蜓目<sup>[9]</sup>等昆虫的物种鉴定上得到了很好的应用,该技术也应用于蚋类种属鉴定<sup>[5-10]</sup>。Conflitti 等<sup>[11]</sup>结合 DNA 条形码与地理及生态信息鉴定克蚋属(*Cnephia*) 5 蚋种,Day 和 Bernotien 等<sup>[12-13]</sup>以 DNA 条形码来厘清爬蚋复组(*S. reptans complex*)的近缘种分类问题。本研究室 2008 年开始蚋类 CO I 基因序列研究,逐渐建立了可用于贵州省蚋类鉴定 DNA 条形码大纲(profile)<sup>[14]</sup>。贵州省蚋类分类学研究比较成熟,现已发现 1 属 35 种<sup>[2]</sup>。本文用 DNA 条形码技术对车载式捕虫网采集到的蚋类进行研究,结合系统发育分析方法,发现尚未报道分布于贵州省的蚋种麻子绳蚋(*S. asakoe*),报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料、试剂与软件

体视显微镜(日本)、电热恒温水浴锅(中国)、UVP 凝胶成像系统(美国)、梯度 PCR 扩增仪(德国)、蛋白核酸分析仪(美国)、Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物技术有限公司)、2X Taq PCR Master Mix(含染料)(上海生工生物技术有限公司)、Trans 2k DNA Marker(上海生工生物技术有限公司)、Trans DNA Marker I(上海生工生物技术有限公司)。主要应用软件为 Chromas 2.41、DNAMAN V6、MEGA 6.06 和 PHYLIP 3.695。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 参照 Davies 和 Roberts<sup>[3]</sup>的方法,设计制作车载式捕虫设备,采集蚋类成虫。于 2014 年 7~9 月在贵州雷山、江口、德江、关岭和开阳进行采集。依据蚋喜于晨曦和薄暮寻求血源、侵袭人畜最为频繁的特点,选择采集时间在日出和日落后 1 h。

**1.2.2 形态学鉴定** 在体视镜下解剖雌蚋,尾器制片作为凭证标本,蚋其余部位保存于 95% 酒精中,用于提取基因组 DNA。按常规方法进行形态学鉴定<sup>[1]</sup>。

**1.2.3 基因组 DNA 提取** 使用上海生工生物公司 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取单个蚋基因组 DNA, -20 ℃ 贮存备用。

**1.2.4 PCR 引物选择** 沿用本课题组自行设计的蚋类 CO I 基因通用引物 cu1\cd2 和 Hebert 等<sup>[4]</sup>的引物序列 Lco14490\Hco2198。cu1 的引物序列

为 5'-ACC ACT TTT ATC AGC CAT TT-3',cd2 的引物序列 5'-CAC TAA TCT GCC ATA TTA GA-3',产物约 1 600 bp。Lco14490 的引物序列为 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3',Hco2198 引物序列为 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3',产物约 710 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

**1.2.5 PCR 扩增反应体系** PCR 扩增反应体系的总体积为 25 μL,包括 12.5 μL PCR MasterMix, 10.7 μL 蒸馏水,0.4 μL 的上游引物和 0.4 μL 的下游引物,1 μL 模板。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min 后进入 30 个循环,94 ℃ 变性 45 s,52 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,最后 72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。

**1.2.6 PCR 产物检测与测序** 吸取 5 μL PCR 产物,1% 琼脂糖凝胶电泳,恒压 180 V 电泳 20 min,在 UVP 凝胶成像系统下观察并记录结果。PCR 产物测序由英潍捷基公司进行,双向测序。

**1.2.7 蚋类 CO I 基因序列处理** 用 DNAMAN V6 序列拼接程序剪切出用于分析的 658 bp DNA 条形码序列。

**1.2.8 蚋种鉴定** 在 BOLDSYSTEMS 的动物 CO I 鉴定页面([http://boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine))中输入待鉴定的蚋类 CO I 基因 658 bp 序列,提交鉴定,并记录结果<sup>[15]</sup>。

**1.2.9 K2P 距离(Kimura-2-parameter distance)分析** 利用 PHYLIP3.695 软件中的 dnadist 程序进行。

**1.2.10 序列比对与系统发育分析** 用 MEGA6.06 软件包的 Alignment Explorer 工具进行序列比对<sup>[16-17]</sup>。以邻接法(neighbor-joining, NJ)进行系统发育分析,选择 K2P 模型,Bootstrap 值设为 1 000。

## 2 结果

根据形态学特征,对 153 个属同一蚋种(但不是贵州省已知蚋种)的雌蚋个体(表 1)进行 CO I 基因序列分析。测定 153 个个体的 DNA 条形码序列,共得 28 种不同序列,其他 125 个个体的序列分别与这 28 种序列相同。28 种序列的 K2P 距离最大为 3.7%。用 BOLDSYSTEMS 对 28 种序列进行鉴定,17 种被鉴定为麻子绳蚋 *Simulium* (*Gomphostilbia*) *asakoe*,11 种未得到鉴定。检索 GenBank 和 BOLDSYSTEMS 中包含完整 658 bp 条形码且已知蚋种的蚋属(*Simulium*)序列,分别获得 464 条和

表 1 153 个雌蚋的分布

Tab. 1 Distribution of 153 female blackflies

采集地	采集地经纬度	数目
雷山	26°23'36. 24"N,108°4'28. 92"E	17
江口	27°41'22. 13"N,108°50'44. 79"E	76
德江	28°15'19. 29"N,108°06'52. 25"E	7
关岭	25°55'59. 46"N,105°36'25. 42"E	23
开阳	27°03'14. 13"N,106°58'30. 83"E	30

486 条序列,与本课题组之前测定的 103 条已知蚋种序列(未发表)一起,成为包含 1 053 条序列的蚋类 DNA 条形码大纲。该大纲含 149 个蚋种,平均 K2P 距离为 14. 7%。在 149 个蚋种组成的 11 026 个物种对中,仅有 104 对的 K2P 距离小于 4%,占全部物种对的 0. 9%。因此,选择 4% 的 K2P 距离为划分蚋属下蚋种的阈值。以上述 28 种序列与蚋类 DNA 条形码大纲的 1 053 条序列一起,进行系统发育分析,发现 28 种序列与已知麻子绳蚋序列(共 3 条,GenBank 编号为 KM410170、KM410171 和 KM410172)构成单独的分支(branch)。28 种序列与已知麻子绳蚋序列(3 条)的 K2P 距离为 1. 1%~3. 4%,在种内差异范围内。28 种序列与已知非麻子绳蚋序列(1 050 条)的 K2P 距离为 5. 7%~21. 1%,达到种间差异水平。进一步检视 28 种序列相应的尾器凭证标本(图 1),发现符合麻子绳蚋形态特征,即生殖板三角形、内缘骨化和侧缘中凹,生殖叉突前臂骨化、后臂无外突及两端骨化,从而确认 28 种序列代表的蚋种为麻子绳蚋。麻子绳蚋为贵州省蚋类新记录,分布于雷山、江口、德江、关岭和开阳 5 县。

3 讨论

现已知蚋类 2 204 种,其中,蚋属 1 745 种<sup>[18]</sup>。我们根据蚋属 149 种的已知 DNA 条形码,初步确定以 4% 的 K2P 距离为划分蚋属下蚋种的阈值。由于 149 个蚋种构成的物种对中,K2P 距离小于 4% 的占 0. 9%,意味着以 4% 为蚋种划分标准,准确性可以达到 99% 以上。Hebert 等<sup>[4]</sup>在研究鳞翅目昆虫时,以 3% (K2P) 为判断物种的阈值,准确性可达到 98%。Hebert 等<sup>[4]</sup>认为,同一属下的物种,可能因为成种时间晚近,而使得 CO I 基因序列的趋异较小。对于 K2P 距离较小(<4%) 的蚋类物种对,可能还存在其他解释。例如,在我们分析的 149 个蚋种中,节蚋(*S. nodosum*)和素木蚋(*S.*



图 1 麻子绳蚋雌性尾器(40 ×)

Fig. 1 Female genitalia of *Simulium asakoae*

*shirakii*) 的 DNA 条形码序列完全一致,即 K2P 距离为 0,说明节蚋和素木蚋很可能就是同一蚋种。关于节蚋和素木蚋是否为同一蚋种,在分类学上尚存在争议,这与本课题组的研究结果相符。

已报道麻子绳蚋分布于马来西亚、泰国、越南及中国香港<sup>[2,18]</sup>,因此本文综合形态特征、BOLD-SYSTEMS 鉴定和系统发育分析所鉴定的麻子绳蚋,为贵州省新记录种。贵州省已知的蚋属 35 蚋种,均为在幼期孳生地(河流、溪流)采集标本,对幼期标本(幼虫或蛹)及从蛹羽化而得的成虫进行鉴定而定种<sup>[2]</sup>。本文报道的贵州省新记录麻子绳蚋,系以车载式捕虫网捕获,且发现该蚋种在贵州省分布较为广泛,分布于雷山、江口、德江、关岭和开阳 5 县。但以传统方法采集标本时,并未发现该蚋种,说明车载式方法对于蚋类研究是一个很好的补充。

4 参考文献

[1] 陈汉彬, 安继尧. 中国黑蝇(双翅目:蚋科)[M]. 北京: 科学出版社, 2003:1-448.  
[2] 陈汉彬. 中国蚋科昆虫[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2016:1-673.  
[3] Davies L, Roberts DM . A net and a catch-segregating apparatus mounted in a motor vehicle for field studies on flight activity of Simuliidae and other insects[J]. Bull Entomol Res, 1973(1): 103-112.  
[4] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 1247

- 2003(3): 313 – 321.
- [5] 闫娇, 姜丽, 郭琴, 等. DNA 条码技术在双翅目昆虫中的应用[J]. 天津师范大学学报, 2015(3): 66 – 72.
- [6] 梁亮, 江威, 余慧, 等. 中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定(双翅目:实蝇科)[J]. 动物分类学报, 2011(4): 925 – 932.
- [7] 潘程莹, 胡婧, 张震等. 斑腿蝗科 Calantopidae 七种蝗虫线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码研究[J]. 昆虫分类学报, 2006(2): 103 – 110.
- [8] Li YW, Zhou X, Feng G, et al. COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae) [J]. Mol Ecol Resour, 2010(1): 31.
- [9] Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata[J]. Proc Biol Sci, 2008(2): 237 – 247.
- [10] Conceição PA, Crainey JL, Almeida TP, et al. New molecular identifiers for *Simulium limbatum* and *Simulium incrustatum* s. l. and the detection of genetic substructure with potential implications for onchocerciasis epidemiology in the Amazonia focus of Brazil[J]. Acta Trop, 2013(2): 118 – 125.
- [11] Conflitti IM, Pruess KP, Cywinska A, et al. DNA barcoding distinguishes pest species of the black fly genus *Cnephia* (Diptera: Simuliidae) [J]. J Med Entomol, 2013(6): 1250 – 1260.
- [12] Day JC, Goodall TI, Post RJ. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galaratum* in Britain using molecular taxonomy[J]. Med Vet Entomol, 2008(1): 55 – 61.
- [13] Bernotien R, Stun NAS V. On the biology of *Simulium galaratum* in Lithuania ecological and molecular data[J]. Ekologija, 2009(2): 123 – 126.
- [14] 罗洪斌, 杨明, 陈汉彬. 克隆医学昆虫蚋 CO I 全基因的引物设计方法探讨[J]. 湖北民族学院学报:医学版, 2008(3): 12 – 14.
- [15] Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org) [J]. Mol Ecol Notes, 2007(3): 355 – 364.
- [16] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980(2): 111 – 120.
- [17] Tamura K., Stecher G., Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013(12): 2725 – 2729.
- [18] Adler PH, Crosskey RW. World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory[M]. Clemson: Clemson University, 2016:1 – 126.
- (2016-08-01 收稿, 2016-11-03 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 刘 华
- 
- (上接第 1244 页)
- [8] 张建庆, 张春林, 陈汉彬, 等. 黑水山蚋的唾腺多线染色体研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2008(2): 96 – 102.
- [9] Huang L, Zhang CL, Jiang YH, et al. Polytene chromosomes of *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense* (Diptera: Simuliidae) from China [J]. Acta Entomol Sin, 2012(8): 988 – 993.
- [10] 黄丽, 张春林, 黄若洋, 等. 黔蚋唾腺多线染色体研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012(5): 354 – 356.
- [11] 温小军, 韦静, 陈汉彬. 五条蚋两地理株多线染色体比较研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007(3): 253 – 255.
- [12] 周静, 陈汉彬, 杨明. 几种消毒剂对蚋卵原代细胞培养效果的比较[J]. 贵阳医学院学报, 2010(4): 334 – 340.
- [13] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 343 – 354.
- [14] Altnordu F, Peruzzi L, Yu Y, et al. A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType [J]. Taxon, 2016(3): 586 – 592.
- [15] Prosanta S, Debabrata S, Avijit K, et al. Karyotype analysis and chromosomal evolution in Asian species of *Corchorus* (Malvaceae s. l.) [J]. Gene Res Crop Evo, 2014(6): 1173 – 1188.
- [16] 余蕾, 杨国珍, 王碧, 等. 贵阳地区染色体疾病儿童的染色体核型分析[J]. 贵州医科大学学报, 2015(11): 1170 – 1175.
- [17] Robert B, Angus, Teresa C, et al. A chromosomal analysis of eleven species of Gyrinidae (Coleoptera) [J]. Comp Cytogen, 2016(1): 189 – 202.
- [18] Al-Qahtani AH, Al-Khalifa MS, Al-Saleh AA. Karyotype, Meiosis and sperm fotation in the red palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* [J]. Cytologia, 2014(2): 235 – 242.
- [19] Wagner FM, Pablo AM, Luiz AC. et al. Evidence for meiotic drive as an explanation for karyotype changes in fishes[J]. Mar Genomics, 2014(15): 29 – 34.
- [20] Beatriz V, Doris B. Numerous transitions of sex chromosomes in diptera[J]. PLOS Biol, 2015(4): 1 – 22.
- (2016-07-30 收稿, 2016-11-11 修回)  
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 刘 华