

計畫編號：DOH101-DC-2036

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

計畫名稱：日本與台灣病媒蚊及病媒蚊傳播之病原基因關係

## 研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：鄧華真

研究人員：羅林巧、王倍峯

執行期間：101 年 01 月 01 日至 101 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
壹、前言	(5)
貳、材料與方法	(6)
參、結果	(11)
肆、討論	(27)
伍、結論與建議	(28)
陸、參考文獻	(28)
	共 (30) 頁

## 中文摘要：

此計畫利用蚊蟲分子生物方法比較三斑家蚊 *Culex tritaeniorhynchus*、環紋家蚊(*Cx. annulus*)、白吻家蚊 *Cx. vishnui*、偽白吻家蚊 *Cx. pseudovishnui* 等白吻家蚊亞群之基因序列，藉以釐清台灣環紋家蚊之分類地位及基因庫交流情況。本計劃研究結果證實台灣地區與中國大陸的環紋家蚊與日本的白吻家蚊應為同一蚊種，且基因庫交換頻繁，地域性低，三斑家蚊亦同，而台灣地區之偽白吻家蚊(*Cx. pseudovishnui*)，與日本之偽白吻家蚊基因庫不同，地域性高，疑似台灣特有群集或姐妹種，但因筆數太少，仍需進一步釐清。

關鍵詞：白吻家蚊群、環紋家蚊、白吻家蚊、三斑家蚊、偽白吻家蚊、台灣、日本

英文摘要：

This project is using molecular methods to study gene sequences of *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. vishuni*, *Cx. annulus* and *Cx. pseudovishnui* in the *Cx. vishnui* subgroup to clarify the taxonomic status of *Cx. annulus* and gene flow. The results showed that *Cx. annulus* and *Cx. vishnui* is the same species which share the common gene pool between Taiwan and Japan, even extend to mainland China. The same situation was also applied to the population of *Cx. tritaeniorhynchus* between Taiwan and Japan. *Cx. pseudovishnui* had different gene pool with the Japan strain, which implied that Taiwan population is either a unique strain or sibling species. This needs further research due to small sample size.

Keywords: *Culex vishnui* subgroup, *Culex annulus*, *Culex vishnui*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex pseudovishnui*, Taiwan, Japan

## 壹、前言

台灣地區蚊蟲種類共有132種(Lien 2004)，其中傳播日本腦炎病媒蚊包括三斑家蚊*Culex tritaeniorhynchus* Giles、環紋家蚊 *Cx. annulus* Theobald及白頭家蚊 *Cx. fuscocephala* Theobald。前兩者均屬於白吻家蚊亞群(*Cx. vishnui* subgroup)，其中環紋家蚊為*Culex vishnui* 的一型 (form) (Sirivanakarn 1975)。另外屬於此亞群的種類尚包括*Cx. pseudovishnui* (含 *neovishnui* form)、*Cx. perplexus*, *Cx. alienus* 及*Cx. incognitus*。這些蚊蟲種類外部形態(如表一)及孳生棲所相似，容易造成混淆。因應新技術之發展，此群之分類地位可以分子生物學進一步釐清，例如利用三個種類專一性之引子，來鑑定日本琉球群島的三種蚊蟲種類，*Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* 及*Cx. pseudovishnui* (Toma et al. 2000)。

蚊蟲種類基因序列完全解開之種類有剛比亞瘧蚊*Anopheles gambiae*及埃及斑蚊*Aedes aegypti*，正在進行中的有熱帶家蚊*Cx. quinquefasciatus* (Arensburger et al. 2010)。剛比亞瘧蚊有0.278 Gbp 且有超過400,000種單核苷酸多態型(single-nucleotide polymorphisms)(Rober et al. 2002)，而埃及斑蚊約有1.38 Gbp (Sinkins 2007)。DNA資料分析部份是以蚊蟲基因Ribosomal DNA spacer 中的18S rRNA及internal transcribed spacers2(ITS2)區域部份序列、5.8S rRNA gene、internal transcribed spacers 1(ITS1)完整序。

病媒蚊及其所攜帶之病原體可能藉由交通工具或貨物運輸入侵其他地區。白線斑蚊 *Aedes albopictus* 藉由廢輪胎於 1987 年入侵美國德州 (Hawley et al. 1987)，隨後全美國，並富貴竹入侵加州南部(Madon et al. 2002)或機場瘧疾。地下家蚊在 1996 年被發現入侵台灣北部，北部在冬天亦能感受到蚊蟲之存在，其來源可能係由鄰近之溫帶國家-日本，所以可藉由比對蚊蟲基因來釐清。除病媒蚊外，病媒性病原亦可以藉由宿主帶入，例如西尼羅病

毒入侵美國紐約，台灣地區之登革病毒。台灣地區日本腦炎病毒原為第三型，在 2008 年於關渡首度發現基因型第一型後(Huang et al. 2010)，各地區逐漸取代第三型。所以經蚊蟲傳播之病媒性疾病可藉由蚊蟲基因庫之分析，瞭解這些病媒蚊交流之現況，而釐清其帶入病原體之機會。

## 貳、材料與方法

### 一、蚊蟲採集

採集全國各地區(北部、中部、南部及東部各地區至少 10 隻)之三斑家蚊、環紋家蚊、偽白吻家蚊等幼蚊或掛燈採集成蚊，帶回實驗室進行後續鑑定及分析。另外並向日本感染症研究所 National Institute of Infectious Diseases 申請日本之三斑家蚊、環紋家蚊、偽白吻家蚊之 DNA 樣本或蚊蟲樣本。

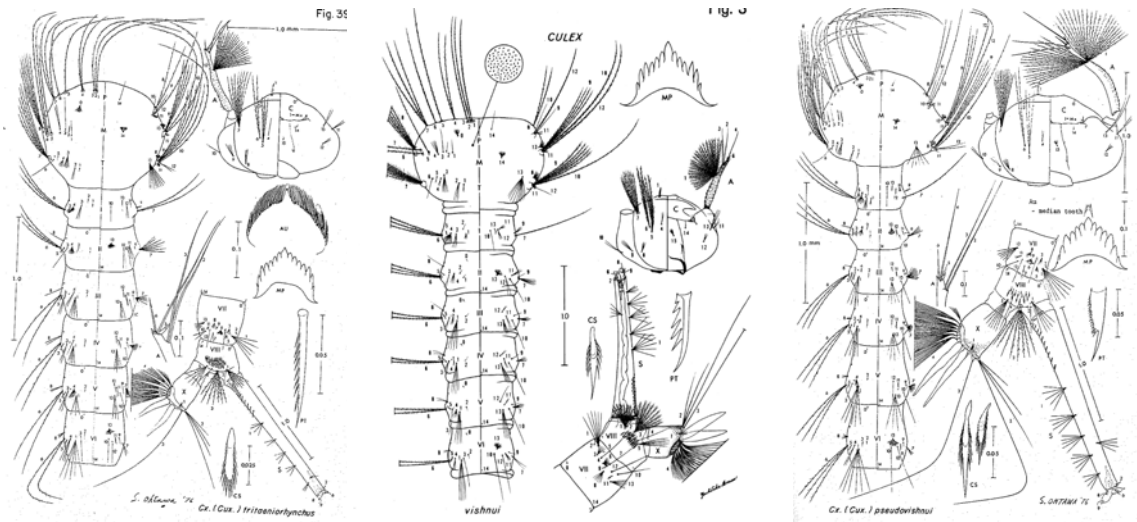
### 二、形態鑑定

以立體解剖顯微鏡，由一位形態鑑定很豐富的專家，依蚊種檢索，進行外部形態鑑定(表一、圖一及圖二)(Lien 2004, Toma et al. 1986)。

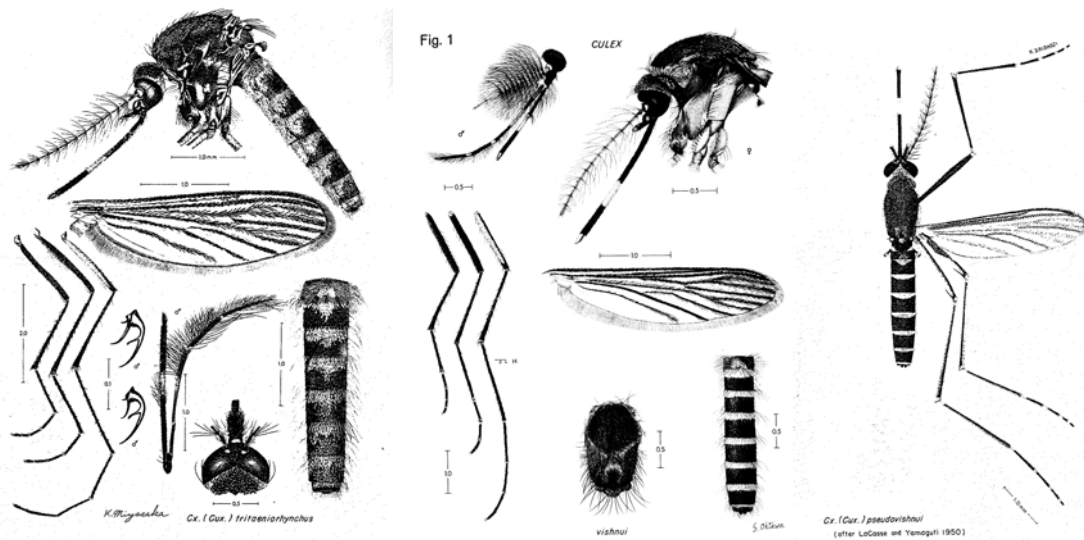
表一、台灣地區 *Cx. vishnui* 亞群幼蟲及成蟲特徵。

種類	幼蟲特徵	成蟲特徵
三斑家蚊	頭前刺暗色，非常粗狀；呼吸管細長，其毛不太明顯；呼吸管管櫛有緣齒；第八腹節側櫛至少 16 枚，排成三角形；側櫛的頂部只有微細均勻的緣齒。	口吻中央有白帶，下方基部有淡色斑或鱗；頭頂的豎立鱗片平齊，深褐色；翅鱗片全部暗色；胸背鱗片全部呈暗褐色；腹部每節背面有白帶。
環紋家蚊	頭前刺暗色，非常粗狀；呼吸管中等長，其毛明顯；呼	口吻中央有白帶；頭頂的豎立鱗片淡色鱗在中間區域，深色鱗分

	吸管管櫛有緣齒；第八腹節側櫛至少 16 枚，排成三角形；側櫛的頂部尖銳。	布兩側；翅鱗片全部暗色；胸背普通具有明暗鱗片交雜，前緣無明鱗片；腹部每節背面有白帶；後足腿節暗色和淡色區分界不清楚，近末端的黑環約為全長的 1/7-1/10 長。
偽白吻家蚊	頭前刺暗色，非常粗狀；吸管中等長，其毛明顯，10-12 株，各分 3-6 枝；吸管管櫛有緣齒；第八腹節側櫛 7-12 枚；側櫛的頂部尖銳。	口吻中央有白帶；頭頂的豎立鱗片淡色鱗在中間區域，深色鱗分布兩側；翅鱗片全部暗色；後足腿節暗色和淡色區分界清楚，近末端的黑環約為全長的 1/3-1/5 長。
白吻家蚊	頭前刺暗色，非常粗狀；吸管中等長，其毛明顯；吸管管櫛沒有緣齒；第八腹節側櫛 4-14 枚，大體上排成單行；側櫛的頂部有一枚格外粗長之中齒。	口吻中央有白帶；翅鱗片全部暗色；胸背普通具有明暗鱗片交雜，但至少前緣有明鱗片；腹部每節背面有白帶。



圖一、三斑家蚊(A)、環紋家蚊(B)、白吻家蚊(C)及偽白吻家蚊(D)幼蚊。(下載自 Tanaka et al. 1979)



圖二、三斑家蚊(A)、環紋家蚊(B)、白吻家蚊(C)及偽白吻家蚊(D)成蚊。

### 三、蚊蟲基因序列分析

#### (一)病媒蚊體內 DNA 萃取

1. 將單隻蚊子放入 1.5ml 離心管，加入 180 $\mu$ l PBS 溶液，並放入 1 顆滅菌過的 3mm 玻璃珠。
2. 以 tissue lyser 震盪 2 分鐘打碎蚊蟲細胞組織。



- 3.加入 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K 溶液。
- 4.加入 200 $\mu\text{L}$  Buffer AL 溶液，震盪混和均勻。
- 5.離心管置入加熱器中，56 $^{\circ}\text{C}$  作用至少 4 小時。
- 6.加入純酒精 200 $\mu\text{L}$ ，震盪混和均勻以終止反應。
- 7.利用小烏龜離心機離心數秒，將蓋子上的殘留液離下。
- 8.混合液加至 QIAampspin column(放置於 2 mL collection tube 上)，蓋上蓋子，以 8000rpm 轉速離心 1 分鐘，將 QIAampspin column 放置新的 2 mL collection tube 上。
- 9.小心打開 QIAampspin column 的蓋子，加入 500 $\mu\text{L}$  AW1 溶液，蓋上蓋子，以 8000rpm 轉速離心 1 分鐘，將 QIAampspin column 放置新的 2mL collection tube 上。
- 10.小心打開 QIAampspin column 的蓋子，加入 500 $\mu\text{L}$  AW 2 溶液，蓋上蓋子，以 14000rpm 轉速離心 3 分鐘，倒去下層液，再以
- 11.將 QIAampspin column 放置新的 1.5ml 微量離心管上，以 14000rpm 轉速離心 1 分鐘除去多餘的酒精。
- 12.將 QIAampspin column 放置新的 1.5ml 微量離心管上，加入 Buffer AE 40 $\mu\text{L}$  溶液，靜置於室溫下 10 分鐘，以 14000rpm 轉速離心 2 分鐘。
- 13.保存於-20 $^{\circ}\text{C}$  或-80 $^{\circ}\text{C}$ ，進行後續 DNA 檢測用。

## (二)PCR 方法

PCR 的配方(Toma et al. 2000) 如下：

Component	Volumn/reaction
10 X buffer (Invitrogen)	2.5 $\mu\text{L}$
Forward primer(4 mM)	1 $\mu\text{L}$
Reverse primer(4 mM)	1 $\mu\text{L}$

dNTP(2.5mM)	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 $\mu$ l
Taq ( Invitrogen )	0.2 $\mu$ L
DNA (10-100ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Distilledwater	16.3 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

PCR 引子序列如下：

引子 Primer	序列 5'-3'
18SF	GTAAGCTTCCTTTGTACACACCGCCCG
28SR1	GGGGTAGTCACACATTATTG

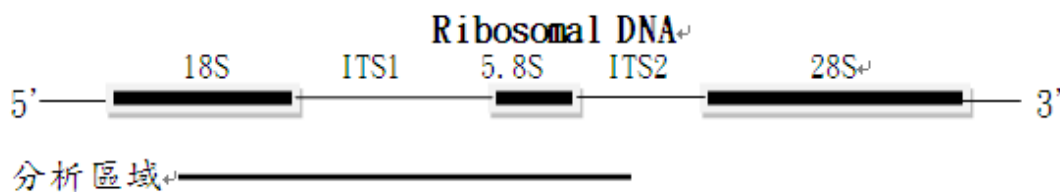
PCR 程式如下表，完成後，以電泳跑膠比對產物大小，PCR 產約 1000bp。  
若產物大小相符，則將 PCR 產物定序後，進入 NCBI 資料庫比對。

步驟	循環數	時間	溫度
Activation	1	3min	95°C
Denaturation	} 40	30sec	95°C
Annealing		30sec	52°C
Extension		1min	72°C
Extension	1	4min	72°C
結束	1	$\infty$	4°C

### (三)DNA 序列分析

DNA 資料分析是以蚊蟲基因 Ribosomal DNA spacer 中的 18S rRNA 及 internal transcribed spacers2(ITS2)區域部份序列、5.8S rRNA gene、 internal

transcribed spacers 1(ITS1)完整序列，約 660-800bp，作為此次資料分析的範圍(圖三)。PCR 產物定序主要使用的引子序列(5' -3' )為 18SF(GTAAGCTTCCTTTGTACACACCGCCCG)、18SF4(GGCTGGTCAGTCTATATCGC)、58SR1(TTGCGGATGACCAGTCG)、及 28SR1(GGGGTAGTCACACATTATTTG)。以蚊蟲樣本 DNA 序列的差異性來分析各樣本的相關性，並利用 Internal transcribed spacer 序列，在同種間有高相似度而在異種間低相似度的特性，作為研究計劃用來判斷蚊蟲分類地位的依據。同時以品系發生樹的結果，分析蚊蟲的可能來源路徑。



圖三、DNA 資料分析區域圖。

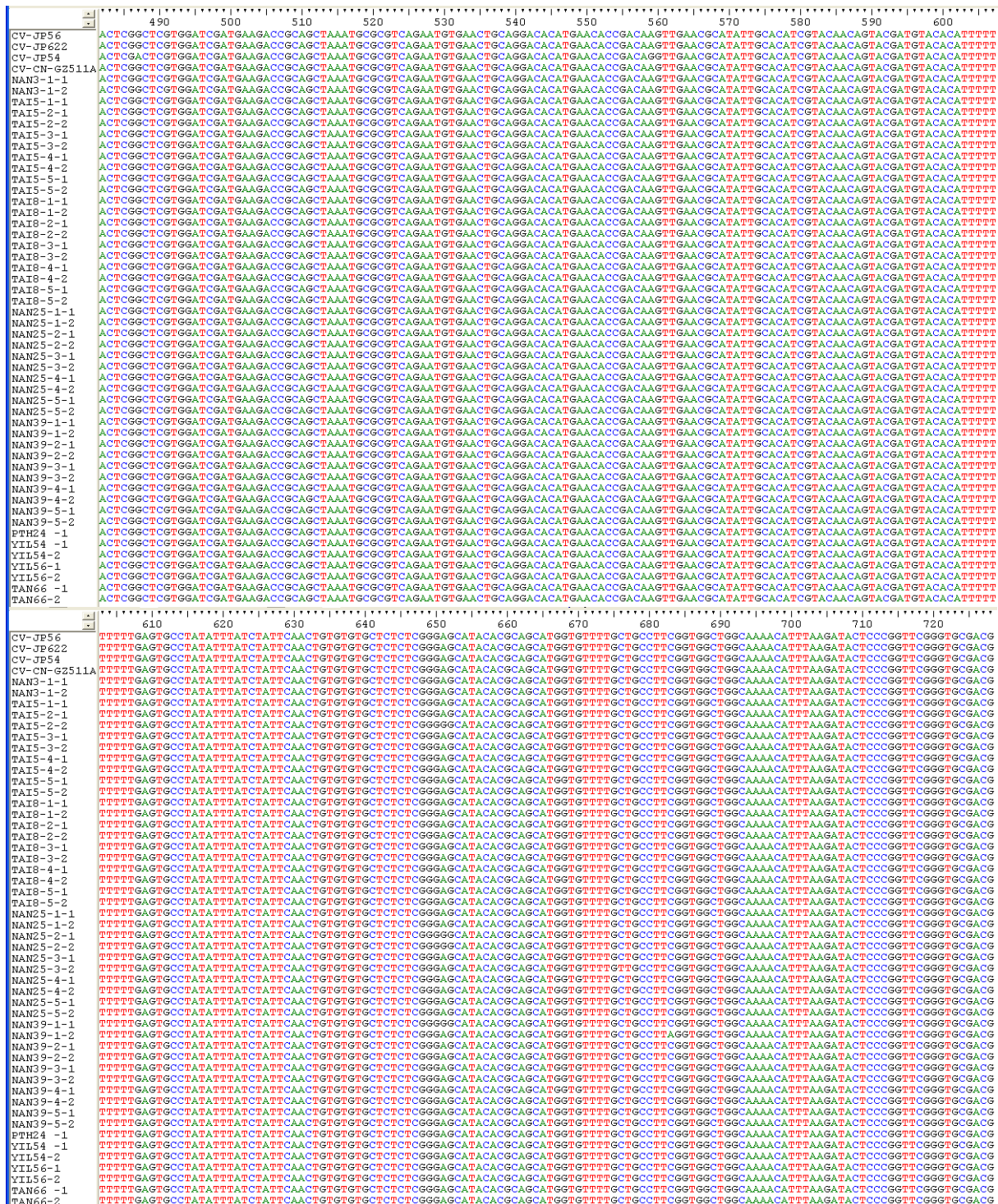
## 參、結果

### 一、環紋家蚊/白吻家蚊族群基因圖譜

環紋家蚊/白吻家蚊 DNA 資料分析是以蚊蟲基因 Ribosomal DNA spacer 中的 18S rRNA 和 5.8S rRNA gene 部份序列，以及 internal transcribed spacers 1 完整序列區域，共 728bp，作為此次資料分析的範圍(圖四)，以蚊蟲樣本 DNA 序列的差異性來分析各樣本的相關性。Internal transcribed spacer 序列，利用其同種間有高相似度而在異種間低相似度的特性，作為研究計劃用來判斷蚊蟲分類地位的依據。同時以品系發生樹的結果，分析蚊蟲的可能來源路徑。







圖四、環紋家蚊/白吻家蚊 728bp 多序列比對(multiple sequence alignment)。

環紋家蚊 DNA 序列共 83 條，其中台灣北部 16 條(台北市 12 條及宜蘭縣 4 條)，中部 31 條(南投縣 22 條、雲林縣 5 條及彰化縣 4 條)，南部 13 條(台南市 4 條、高雄市 8 條及屏東縣 1 條)，東部 23 條(花蓮縣 4 條及台東縣

19 條)，中國大陸 1 條及日本白吻家蚊 8 條(表三)。樣本在所選擇的 DNA 序列內與比較的結果，基因的相似度高達 96-100%(表四)，其中達 100%相似度者佔 3.3%，99%者佔 65.9%，98%者佔 6.6%，97%相似度者佔 3.3%，96%相似度者佔 17.6%。

表三、環紋家蚊及白吻家蚊種類來源。

區域(蚊種)	縣市	DNA 序列數目	代碼	來源
北部(環紋家蚊)	台北市	12	TPE	掛燈採集
	宜蘭縣	4	YIL	掛燈採集
中部(環紋家蚊)	南投縣	22	NAN	掛燈採集
	雲林縣	5	YUN	掛燈採集
	彰化縣	4	CHC	掛燈採集
南部(環紋家蚊)	台南市	4	TAN	掛燈採集
	高雄市	8	KAO	掛燈採集
	屏東縣	1	PTH	掛燈採集
東部(環紋家蚊)	花蓮縣	4	HUA	掛燈採集
	台東縣	19	TAI	掛燈採集
日本(白吻家蚊)	日本	5	JP	NCBI 資料庫
	日本	3	JP	日本 NIID 交換
中國大陸(環紋家蚊)		1		NCBI 資料庫
總計		92		

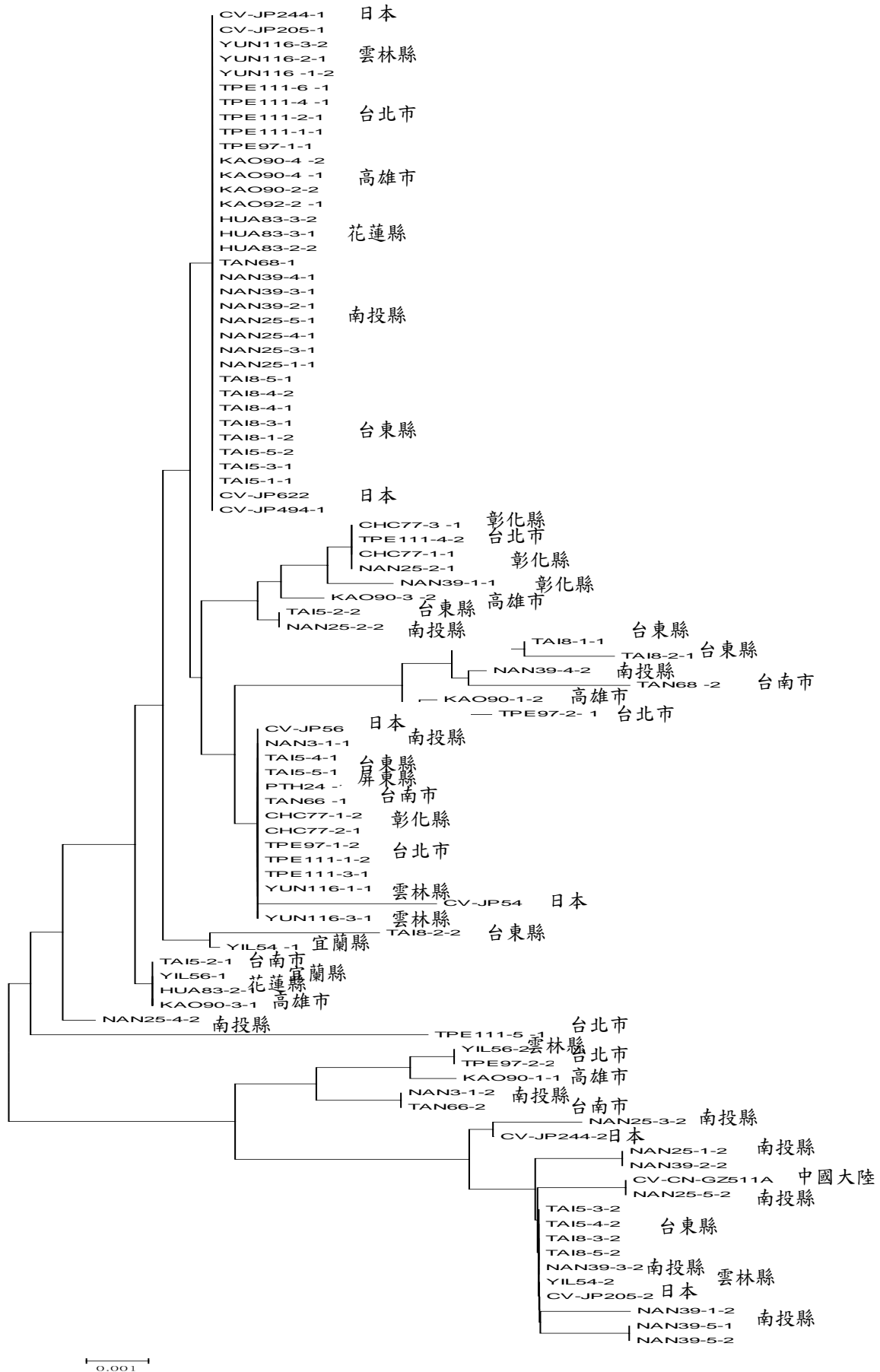
表四、環紋家蚊/白吻家蚊族群基因序列相似表(Identity Table)

與 CV-JP622 序列相似度	環蚊家蚊		白吻家蚊	合計	
	台灣	中國大陸	日本	條數	%

100%	3	0	0	3	3.3
99%	55	0	5	60	65.9
98%	6	0	0	6	6.6
97%	3	0	0	3	3.3
96%	16	1	2	16	17.6
合計	83	1	7	91	100.0

由圖五的品系發生樹圖(Phylogenetic tree)結果看出，日本的 *Cx. vishnui* 樣品分散在台灣環紋家蚊之樣本，而台灣各地區採集的樣本也沒有特定之群集。日本白吻家蚊 4 個樣本(CV-JP244-1、CV-JP205-1、CV-JP622 及 CV-JP494-1)與台灣環紋家蚊 31 個樣本(雲林縣 YUN116-3-2、YUN116-2-1、YUN116-1-2、台北市 TPE111-6-1、TPE111-4-1、TPE111-2-1、TPE111-1-1、TPE97-1-1、高雄市 KAO90-4-2、KAO90-4-1、KAO90-2-2、KAO90-2-1、花蓮縣 HUA83-3-2、花蓮縣 HUA83-3-1、花蓮縣 HUA83-2-2、台南市 TAN68-1、南投縣 NAN39-4-1、NAN39-3-1、NAN39-2-1、NAN25-5-1、NAN25-4-1、NAN25-3-1、NAN25-1-1、台東縣 TAI18-5-1、TAI18-4-2、TAI18-4-1、TAI18-3-1、TAI18-1-2、TAI15-5-2、TAI15-3-1 及 TAI15-1-1)屬於相同的群集，日本白吻家蚊 2 個樣本(CV-JP56R 及 CV-JP54)與台灣環紋家蚊 12 個樣本(南投縣 NAN3-1-1、台東縣 TAI5-5-1、TAI5-4-1、屏東縣 PTH24、台南市 TAN66-1、彰化縣 CHC77-1-2、CHC77-2-1、台北市 TPE97-1-2、TPE111-1-2、TPE111-3-1、雲林縣 YUN116-1-1 及 YUN116-3-1)屬於同群集，日本白吻家蚊 2 個樣本(CV-JP244-2 及 CV-JP205-2)、中國大陸環紋家蚊 1 個樣本(CV-CN-GZ511A)與台灣環紋家蚊 13 個樣本(南投縣 NAN25-3-2、NAN25-1-2、NAN39-2-2、NAN25-5-2、NAN39-3-2、NAN39-1-2、NAN39-5-1、NAN39-5-2、台東縣 TAI15-3-2、TAI15-4-2、TAI18-3-2、TAI18-5-2 及雲林縣 YIL54-2)屬於同群集，可作為台灣環紋家蚊、中國大陸環紋家蚊與日本的白吻家蚊為同一種之證據。





圖五、日本白吻家蚊、中國大陸及臺灣之環紋家蚊 92 條 DNA 序列樹狀圖。

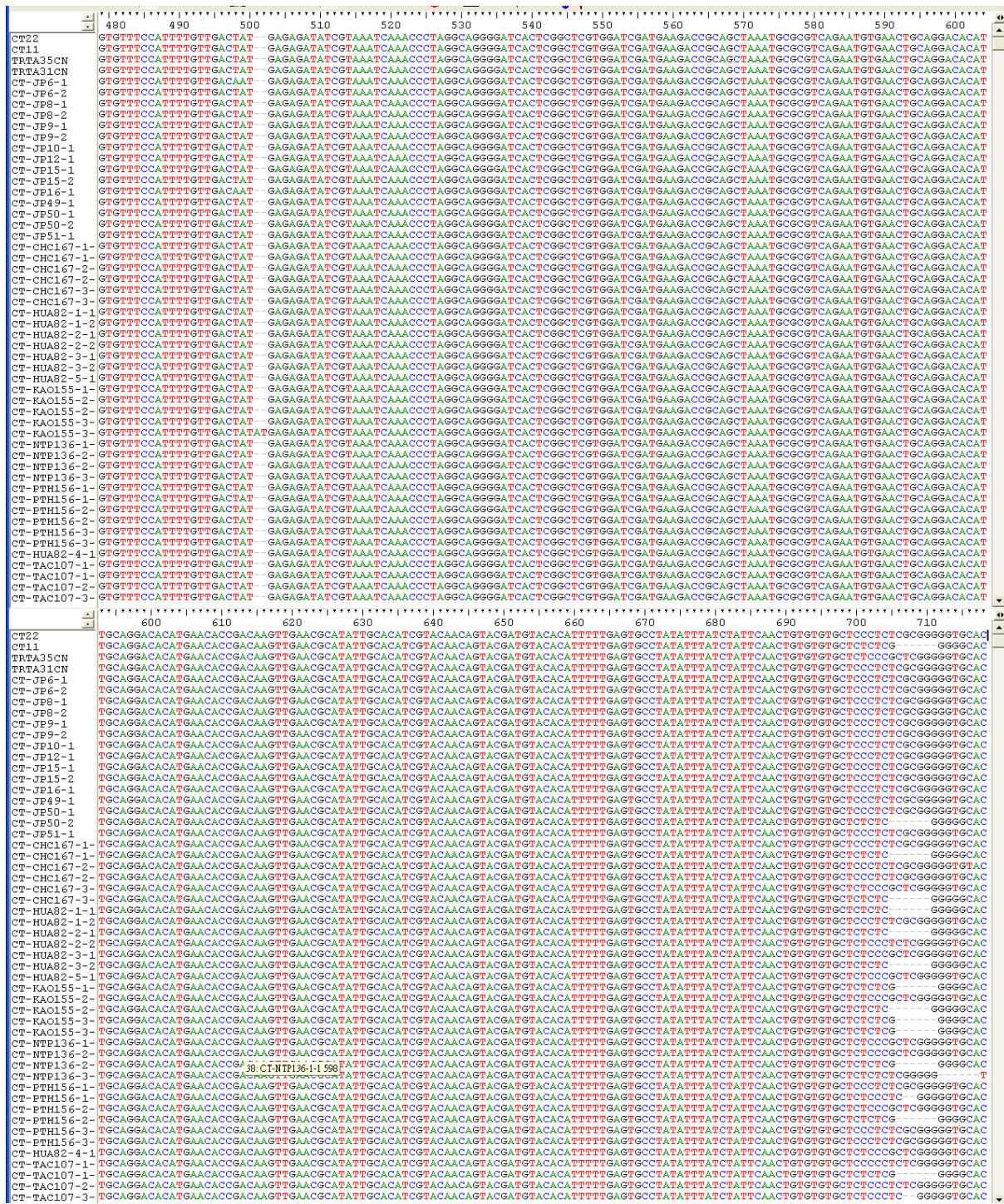
二、三斑家蚊基因圖譜

DNA 資料分析是以蚊蟲基因 Ribosomal DNA spacer 中的 18S rRNA 和 internal transcribed spacers 2(ITS2)部份序列, 以及 internal transcribed spacers 1(ITS1)及 5.8S rRNA 完整序列區域, 共 719bp, 作為此次資料分析的範圍, 以蚊蟲樣本 DNA 序列的差異性來分析各樣本的相關性(圖六)。



Genomic coordinates 240 to 360 with sample identifiers and sequence data. Rows include TRTA35CN, TRTA31CN, CT-JP6-1, CT-JP6-2, CT-JP8-1, CT-JP8-2, CT-JP9-1, CT-JP9-2, CT-JP10-1, CT-JP12-1, CT-JP15-1, CT-JP15-2, CT-JP16-1, CT-JP16-2, CT-JP19-1, CT-JP19-2, CT-JP51-1, CT-CH1167-1, CT-CH1167-2, CT-CH1167-3, CT-HUA82-1, CT-HUA82-2, CT-HUA82-3, CT-RA0155-1, CT-RA0155-2, CT-RA0155-3, CT-PTH156-1, CT-PTH156-2, CT-PTH156-3, CT-TAC107-1, CT-TAC107-2, CT-TAC107-3.

Continuation of genomic coordinates 360 to 480 with sample identifiers and sequence data. Rows include TRTA35CN, TRTA31CN, CT-JP6-1, CT-JP6-2, CT-JP8-1, CT-JP8-2, CT-JP9-1, CT-JP9-2, CT-JP10-1, CT-JP12-1, CT-JP15-1, CT-JP15-2, CT-JP16-1, CT-JP16-2, CT-JP19-1, CT-JP19-2, CT-JP51-1, CT-CH1167-1, CT-CH1167-2, CT-CH1167-3, CT-HUA82-1, CT-HUA82-2, CT-HUA82-3, CT-RA0155-1, CT-RA0155-2, CT-RA0155-3, CT-PTH156-1, CT-PTH156-2, CT-PTH156-3, CT-TAC107-1, CT-TAC107-2, CT-TAC107-3.



圖六、三斑家蚊 719bp 多序列比對 (multiple sequence alignment)。

三斑家蚊 DNA 序列共 84 條，其中北部 21 條 (台北市 7 條、新北市 4 條、桃園縣 4 條及宜蘭縣 6 條)，中部 17 條 (台中市 7 條、雲林縣 4 條及彰化縣 6 條)，南部 19 條 (台南市 8 條、高雄市 5 條及屏東縣 6 條)，東部 8 條 (花蓮縣 8 條)，台灣 2 條 (NCBI 資料庫) 及日本 17 條 (表五)。樣本在所選擇的 DNA

序列內與日本 CT-22 樣本比較的結果，基因的相似度高達 96-100%(表六)，其中達 100%相似度者佔 1.2%，99%者佔 7.2%，98%者佔 49.4%，97%相似度者佔 10.8%，96%相似度者佔 31.3%。

表五、三斑家蚊種類來源。

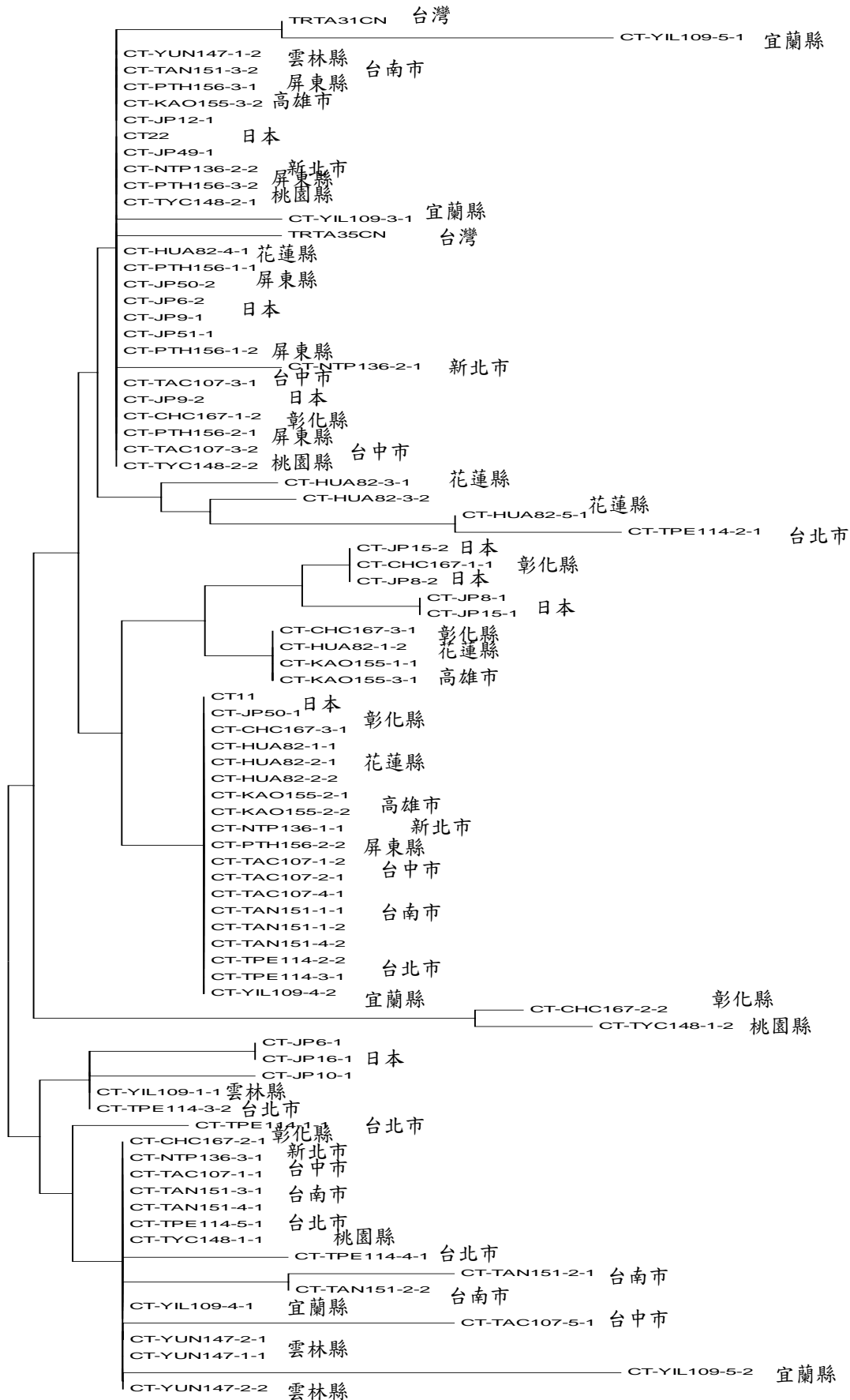
區域	縣市	DNA 序列數目	縣市	來源
北部	台北市	7	TPE	掛燈採集
	新北市	4	NTP	掛燈採集
	桃園縣	4	TYC	掛燈採集
	宜蘭縣	6	YIL	掛燈採集
中部	台中市	7	TAC	掛燈採集
	雲林縣	4	YUN	掛燈採集
	彰化縣	6	CHC	掛燈採集
南部	台南市	8	TAN	掛燈採集
	高雄市	5	KAO	掛燈採集
	屏東縣	6	PTH	掛燈採集
東部	花蓮縣	8	HUA	掛燈採集
台灣		2	TRTA35CN、TRTA31CN	NCBI 資料庫
日本	日本	15	JP	日本 NIID
	日本	2	CT22(JP)、CT11(JP)	NCBI 資料庫
總計		84		

表六、三斑家蚊族群與 CT22 序列相似表(Identity Table)

與 CT22 序列相似度	三斑家蚊樣本數			合計	
	台灣	日本	NCBI 資料庫	條數	%
100%	1	0	0	1	1.2

99%	5	1	0	6	7.2
98%	31	9	1(TRTA31CN)	41	49.4
97%	8	0	1(CT11)	9	10.8
96%	20	5	1(TRTA35CN)	26	31.3
合計	65	15	3	83	100.0

由圖七的品系發生樹圖結果看出，日本的三斑家蚊樣品分散在台灣三斑家蚊之樣本內，而台灣各地區採集的樣本也沒有特定之群集。日本三斑家蚊 8 個樣本(CT-JP12-1、CT-22、CT-JP49-1、CT-JP50-2、CT-JP6-2、CT-JP9-1、CT-JP51-1 及 CT-JP9-2)與台灣三斑家蚊 24 個樣本(台灣 TRTA31CN、TRTA35CN、宜蘭縣 CT-YIL109-5-1、CT-YIL109-3-1、雲林縣 CT-YUN147-1-2、台南市 CT-TAN151-3-2、屏東縣 CT-PTH156-3-1、CT-PTH156-3-2、CT-PTH156-1-1、CT-PTH156-1-2、CT-PTH156-2-1、高雄市 CT-KAO155-3-2、新北市 CT-NTP136-2-2、CT-NTP136-2-1、桃園縣 CT-TYC148-2-1、CT-TYC148-2-2、花蓮縣 CT-HUA82-4-1、CT-HUA82-3-1、CT-HUA82-5-1、台中市 CT-TAC107-3-1、CT-TAC107-3-2、彰化縣 CT-CHC167-1-2 及台北市 CT-TPE114-2-1)屬於相同的群集，日本三斑家蚊 4 個樣本(CT-JP15-2、CT-JP8-2、CT-JP8-1、及 CV-JP15-1)與台灣三斑家蚊 1 個樣本(彰化縣 CT-CHC167-1-1)屬於同群集，日本三斑家蚊 2 個樣本(CT11 及 CT-JP50-1)與台灣三斑家蚊 17 個樣本(彰化縣 CT-CHC167-3-1、花蓮縣 CT-HUA82-1-1、CT-HUA82-2-1、CT-HUA82-2-2、高雄市 CT-KAO155-2-1、CT-KAO155-2-2、新北市 CT-NTP136-1-1、屏東縣 CT-PTH156-2-2、台中市 CT-TAC107-1-2、CT-TAC107-2-1、CT-TAC107-4-1、台南市 CT-TANI51-1-1、CT-TANI51-1-2、CT-TANI51-4-2、台北市 CT-TPE114-2-2、CT-TPE114-3-1 及宜蘭縣 YIL109-4-2)屬於同群集。可作為台灣三斑家蚊與日本三斑家蚊基因庫交流之證據。



圖七、來自日本及臺灣三斑家蚊 84 條 DNA 序列的樹狀圖。

### 三、偽白吻家蚊 *Culex psuedovishnui*

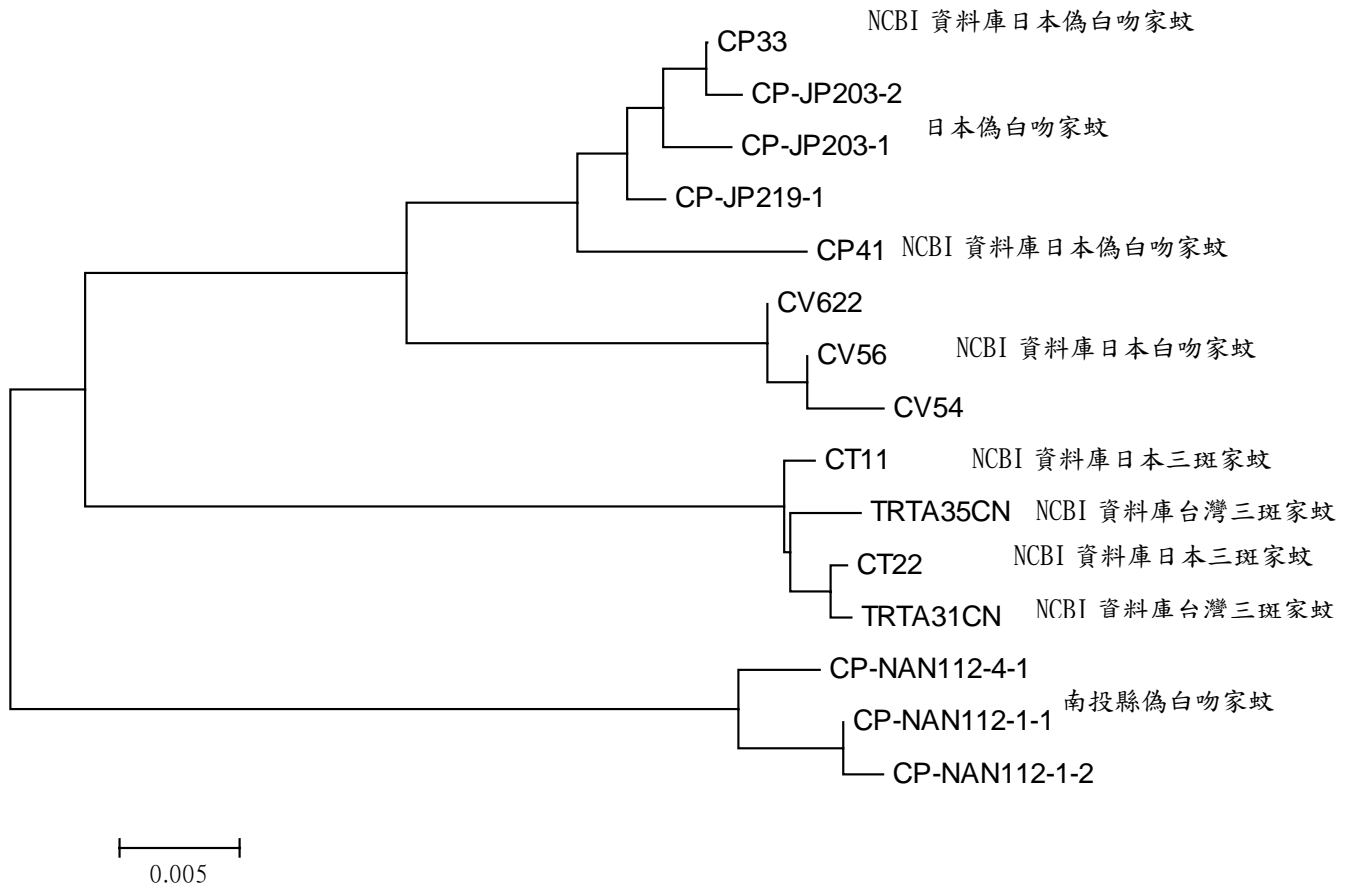
偽白吻家蚊在台灣為稀有種類，不易採集，此次計畫曾前往宜蘭縣採集乙次但並無所獲。截至目前僅分析到南投縣 3 條基因序列，再加上日本 3 條及 NCBI 2 條，共 8 條基因序列。南投偽白吻家蚊樣本在所選擇的 DNA 序列內與 NCBI 基因資料庫之 CP33 樣本比較的結果，相似度僅達 88%(表六)，與三斑家蚊 CT22 基因序列比較相似度 86%，環紋家蚊 CV622 基因序列比較相似度 86-87%。

表七、偽白吻家蚊族群與 CP33 基因相似表(Identity Table)。

南投偽白吻家蚊樣本	與偽白吻家蚊 CP33 基因序列比較	與三斑家蚊 CT22 基因序列比較	與環紋 CV622 基因序列比較
CP-NAN112-4-1	88%	86%	87%
CP-NAN112-1-1	88%	86%	86%
CP-NAN112-1-2	88%	86%	86%

由圖八的品系發生樹圖(Phylogenetic tree)結果看出，日本的 3 條偽白吻家蚊樣本(CP-JP203-1、CP-JP203-2 及 CP-JP219-1)與 NCBI 資料庫 2 條樣本(CP33 及 CP41)之基因序列屬同一群集，而台灣南投採集的 3 條樣本(CP-NAN112-4-1、CP-NAN112-1-1 及 CP-NAN112-1-2)亦屬另一特定群集。另外，三斑家蚊(CT11、CT22、TRTA35CN 及 TRTA31CN)與白吻家蚊(CV54、CV56 及 CV622)亦分屬不同群集。





圖八、來自日本及臺灣偽白吻家蚊條 DNA 序列的樹狀圖。

#### 四、白吻家蚊亞群(*Culex vishnui* subgroup)基因圖譜

DNA 資料分析是以蚊蟲基因 Ribosomal DNA spacer 中的 18S rRNA 和 internal transcribed spacers 2(ITS2)部份序列，以及 internal transcribed spacers 1(ITS1)及 5.8S rRNA 完整序列區域，共 661bp，作為此次資料分析的範圍。同時以品系發生樹的結果，分析蚊蟲的可能來源路徑。分析環紋家蚊基因序列 92 條、三斑家蚊基因序列 84 條，及偽白吻家蚊基因序列 8 條，分為四個群集，環紋家蚊/白吻家蚊、日本偽白吻家蚊、三斑家蚊及台灣偽白吻家蚊(圖九)。



圖九、白吻家蚊群之條 DNA 序列的基因樹狀圖。

## 肆、討論

本計劃研究結果證實台灣地區與中國大陸的環紋家蚊(*Cx. annulus*)與日本的白吻家蚊(*Cx. vishnui*)應為同一蚊種，且基因庫交換頻繁，地域性低，三斑家蚊亦同，而台灣地區之偽白吻家蚊(*Cx. pseudovishnui*)，與日本及NCBI 資料庫之偽白吻家蚊基因庫不同，地域性高，但因筆數太少，仍需進一步釐清。

依據美國 Water Reed Biosystemics Unit 記載環紋家蚊 *Cx. annulus* 分布於中國大陸、印尼及菲律賓，而白吻家蚊 *Cx. vishnui* 分布地區包括孟加拉國、緬甸、柬埔寨、中國、香港、印度、印尼、日本、老撾、馬來西亞、尼泊爾、菲律賓、新加坡、斯里蘭卡、台灣、泰國、東帝汶及越南。台灣地區在早期之研究分類為白吻家蚊 *Cx. vishnui*，而後認為形態學鑑定有別，改分為環紋家蚊(Cates and Detels 1969)。環紋家蚊早期遍布台灣且密度與三斑家蚊類似，但近幾年來之調查顯示此蚊蟲雖全島分布，但密度遠低於三斑家蚊族群(Lin et al. 2010)。今以基因定序方法分析比較台灣之環紋家蚊與日本白吻家蚊比較，為同一基因庫，所以應屬於同一種，且共享相同基因庫。

此計畫測到之三斑家蚊基因庫及台灣環紋家蚊及日本白吻家蚊之基因庫並無差別，顯示此兩種蚊蟲時常有基因交流之情形。日本腦炎病媒蚊因孳生於野外之水稻田或溪流，可以隨氣流上升，透過風擴散是長距離之飛行者(Ritchie SA and Rochester 2001)，例如曾在 310 公尺高的地方採集到 *Cx. annulirostris*，其預估之飛行距離為 594-648 公里(Kay and Farrow 2000)，大陸及印度的三斑家蚊有移動紀錄(Ming et al. 1993, Reynolds et al. 1996)。台灣地區自 2008 年在北部偵測到日本腦炎病毒第一型(Huang et. al. 2010) 後，隨後在台灣各地區陸續偵測到同型病毒。菲律賓亦於 2008 年 11 月分離到一株日本腦炎病毒第三型，基因序列與台灣類似(Wilfredo Aure et al. 個

人資訊)。

台灣南投地區偽白吻家蚊與日本及 NCBI 資料庫的偽白吻家蚊樣本分屬於不同群集，而日本偽白吻家蚊與 NCBI 資料庫的基因序列則屬同一群集，有可能此蚊種與台灣地區矮小瘧蚊同，地域性高，屬於台灣特有群集 (Somboon et al. 2005)。但亦有可能為型態相似之姊妹種，因其基因相似度只有 88%，與同群的三斑家蚊及白吻家蚊相似度亦在 86%-87%之間，但因目前分析筆數僅南投地區 3 筆資料，故仍需增加其他地區之資料，進一步釐清。

#### 伍、結論與建議

- (一)台灣地區與中國大陸之環紋家蚊，與日本白吻家蚊同種，且基因庫交換頻繁，地域性低，三斑家蚊亦同。建議增加馬祖、菲律賓等鄰近地區之三斑家蚊、白吻家蚊、環紋家蚊等蚊蟲樣本進行序列比對，並分離病毒，進行病毒序列比對，以瞭解經此類蚊蟲傳播疾病之可能途徑。
- (二)台灣偽白吻家蚊與日本及 NCBI 資料庫的偽白吻家蚊樣本分屬於不同群集，有可能為台灣特有群集或型態相似之姊妹種，但因目前分析筆數僅南投地區 3 筆資料，建議增加台灣各地區之分析樣本數，進一步釐清。
- (三)因日本腦炎病媒蚊，三斑家蚊與環紋家蚊/白吻家蚊，交流頻繁，共享相同基因庫，同時也可能病原體互相流通，所以應降低蚊蟲密度，減少經該類蚊蟲傳播疾病之風險。

#### 陸、參考文獻：

Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* 2010, 330: 86-88.

Cates MD, Detels R. Japanese encephalitis virus in Taiwan: preliminary

- evidence for *Culex annulus* Theob. as a vector. J Med Ent 1969,6:327-8.
- Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB, Craig GB, Jr. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. Science 1987, 236: 114-1116.
- Holt RA, et al. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* Science 2002, 298: 129-149.
- Huang JH, Lin TH, Teng HJ, Su CL, Tsai KH, Lu LC, Lin C, Yang CF, Chang SF, Liao TL, Yu SK, Cheng CH, Chang MC, Hu HC, Shu PY. Molecular Epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan. Emerging Infectious Diseases 2010, 16: 876-878.
- Kay BH, Farrow RA. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal: implications for the epidemiology of Japanese and Murray valley encephalitis in Australia. J Med Entomol 2000;37:797-801.
- Lien JC. Pictorial keys to the mosquitoes of Taiwan. Yi Hsien Publishing Co., Ltd. 2004, 178 pp.
- Lin C, Jian SW, Teng HJ. 2010. Surveys on Japanese Encephalitis Vectors in Taiwan Area during 2004-2008. Epidemiological Bulletin 26(11): 202-211.
- Madon MB, Mulla MS, Shaw MW, Kluh S, Hazelrigg JE. Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in Southern California and potential for its establishment. Journal of Vector Ecology 2002, 27: 149-154.
- Ming JG, Jin H, Riley JR, Reynolds DR, Smith AD, Wang RL, et al. Autumn southward 'return' migration of the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* in China. Med Vet Entomol 1993;7:323-7.
- Reynolds DR, Smith AD, Mukhopadhyay S, Chowdhury AK, De BK, Nath PS, et al. Atmospheric transport of mosquitoes in northeast India. Med Vet Entomol 1996;10:185-6.
- Ritchie SA, Rochester W. Wind-blown mosquitoes and Introduction of Japanese Encephalitis into Australia. Emer Infect Dis 2001, 7:900-903.

- Sinkins SP. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 2007, 316: 1718–1723.
- Sirivanakarn S. The systematics of *Culex vishnui* complex in Southeast Asia with the diagnosis of three common species (Diptera: Culicidae). *Mosq. Systematics* 1975, 7: 69-85.
- Somboon P, Thongwat D, Somwang P, Teng HJ, Tsuda Y, Takagi M. The specific status of *Anopheles minimus* S.L. collected from Taiwan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005, 36: 605-608.
- Tanaka K, Mizusawa K, Saugstad ES. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute* 1979, 16:1-979 pp.
- Toma T, Miyagi I. The mosquito fauna of the Ryukyu Archipelago with identification keys, pupal descriptions and notes on biology, medical importance and distribution. *Mosq. Systematics* 1986, 18:1-109.
- Toma T, Miyagi I, Crabtree MB, Miller BR. Identification of *Culex vishnui* subgroup (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay based on sequence variation in ribosomal DNA spacers. *Journal of Medical Entomology* 2000, 37: 554-558.