

中华按蚊各发育阶段形态特征的电镜扫描观察*

闫振天** 王雪倩 范真槐 胡丹岚 陈 斌***

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所, 媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘 要 【目的】中华按蚊 *Anopheles sinensis* Wiedemann 是我国最主要的传疟媒介之一, 本研究基于实验室饲养的中华按蚊, 采用电镜扫描技术观察了中华按蚊不同发育阶段的形态学特征, 对蚊虫的形态学、生长发育和基础生物学等的研究具有参考价值。【方法】配置 1% 锇酸、6% 戊二醛等试剂, 结合不同浓度的乙醇脱水 and 叔丁醇真空冷冻干燥技术制备了幼虫、蛹和成虫的电镜样品, 使用日立 SU3500 扫描电子显微镜对其各个发育时期具有重要分类和鉴定意义的形态特征进行观察和描述。【结果】中华按蚊成蚊雌雄个体差异不大, 喙与触须均接近等长。雄成蚊触角末端膨大弯曲, 触须呈马尾状, 梗节呈中间凹陷的圆饼状, 腹部末端的尾器有一对钳状抱肢; 雌成蚊喙细长, 上颚和下颚均有锯齿, 有利于刺破皮肤吸食血液, 梗节饱满呈球状, 腹部末端的尾器为一对向内弯曲的尾须, 明显短于雄性的钳状抱肢。电镜下中华按蚊蛹整体呈蝌蚪状, 呼吸管位于头部, 开口呈锐角三角形, 管缘部位有一圈较为平滑整齐的钝圆齿特征; 尾鳍为两瓣, 呈扇形, 雄性蛹期的外生殖器明显较雌性长。4 龄幼虫胸腹闭合连接, 头部触角上有数量众多刺状感受器, 腹部第 8 节末端背面有气门器。电镜下中华按蚊卵整体呈船形, 船面较其它蚊种大, 表面均匀分布有细粒状的小突起, 大多数分布呈现六边形的花纹结构, 精孔区位于卵背面两端, 精孔扁平凹陷。【结论】中华按蚊各个发育时期电镜扫描的超微形态结构中, 蛹的呼吸管和卵的外部形态特征均可以作为其重要的鉴别特征。该研究为中华按蚊的分类学以及蚊媒防控研究提供了更为详细和直观的形态特征鉴定依据。

关键词 中华按蚊; 扫描电子显微镜; 发育时期; 形态特征

Scanning electron microscopic (SEM) observations on the developmental morphology of *Anopheles sinensis* (Anophelinae: Culicidae)

YAN Zhen-Tian** WANG Xue-Qian FAN Zhen-Huai HU Dan-Lan CHEN Bin***

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract 【Objectives】To determine the morphological characters of *Anopheles sinensis* Wiedemann, an important vector of malaria in China, and thereby provide a reference for the identification and classification of the Hycanus group. 【Methods】Samples were fixed with 1% osmium acid and 6% glutaraldehyde, and specimens of different developmental stages prepared for electron microscopy by combining dehydration at different ethanol concentrations with tert-butanol vacuum freeze-drying. Morphological characters were observed and recorded using a Hitachi SU3500 electron microscope at 5 kV voltage in the SE (secondary electron) mode. 【Results】There was little sexual dimorphism in beak or antennae length. Adult males have horsetail tentacles with enlarged, curved ends and circular-cake pedicels and the tail organs at the end of their abdomen have a

*资助项目 Supported projects: 重庆市教委科学技术研究项目 (KJQN201900532); 重庆市中小学创新人才培养工程项目计划研究项目 (CY210505)

**第一作者 First author, E-mail: 525201877@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: c_bin@hotmail.com

收稿日期 Received: 2021-06-09; 接受日期 Accepted: 2022-04-25

pair of pincer-like arms. Adult females have slender beaks and serrated upper and lower jaws, which are used for piercing human skin and sucking blood. Their pedicels are full and spherical and the tail organs at the end of the abdomen have a pair of inwardly curved tail whiskers that are obviously shorter than the male's pincer-like arms. Electron microscopy revealed that the respiratory tubes of the tadpole-like pupa are on the head and have an acute triangular opening with a smooth circle of blunt teeth at the edge. The fan-shaped caudal fin is two-petaled. The external genitalia of male pupae are obviously longer than those of female pupae. 4th instar larvae have a linked thorax and abdomen, spiny receptors on the antennae, and a valve on dorsal end of the 8th abdomen segment. The eggs are boat shaped and have a larger surface area than the eggs of other mosquito species. Eggs have evenly distributed, small, granular protrusions on their surface, most of which are arranged in a hexagonal pattern. Eggs also have flat, fine pores at their dorsal ends. **[Conclusion]** The respiratory tubes of pupae and the external morphology of eggs are important characteristics for identifying *A. sinensis*. These results not only provide valuable information for identifying *A. sinensis* but also aids mosquito-borne disease control.

Key words *Anopheles sinensis*; scanning electron microscope (SEM); developmental stages; morphological characteristics

中华按蚊 *Anopheles sinensis* Wiedemann 隶属于蚊科 Culicidae 按蚊属 *Anopheles* 按蚊亚属 Subgenus *Anopheles*, 是我国及东南亚国家疟疾和马来丝虫病的主要传播媒介蚊种, 由于其幼虫易滋生在水稻田, 成虫易滋生在猪圈和牛棚, 使其成为我国分布最广泛的按蚊蚊种 (除青海、新疆外均有分布), 特别是南方水稻种植区的优势蚊种 (Sinka *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014)。中华按蚊作为重要的医学媒介昆虫, 因其具有分布广泛、种群数量大和易传播疟原虫等特点, 已成为我国研究蚊虫形态学和分子分类、种群遗传学、基因组学、蚊虫抗药性相关基因的研究及疟原虫传播机制等研究工作的重要模式实验材料之一 (杨飞龙等, 2014; He *et al.*, 2019; Si *et al.*, 2019)。目前, 拟除虫菊酯类杀虫剂的使用仍是我国媒介蚊虫控制的主要措施, 由于杀虫剂长期使用, 蚊虫产生了较强的杀虫剂抗性, 从而成为目前媒介蚊虫控制的最大单一障碍 (Liu *et al.*, 2010)。为了研究其抗药性机制, 近年来, 我们以中华按蚊为模式种系统地开展了基因组学和杀虫剂抗性分子机理的研究, 经过多年的研究实践, 成功地建立了不同地理种群的拟除虫菊酯抗性和感性实验室品系 (Si *et al.*, 2019)。同时, 由于中华按蚊与其所属的赫坎按蚊种团 (Hycanous group) 的多个蚊种在形态上十分相近, 通过形态特征很难鉴定并区分的物种, 不论是采用早期简单的形态学区分还是采用近年的分子生物学的方法鉴定, 其分类地位一直存在很大的争议 (冯兰洲和许锦江,

1964; 许锦江和冯兰洲, 1975; Gao *et al.*, 2004; 孙立新等, 2010)。因此, 掌握中华按蚊各发育阶段的形态特征, 为准确地物种鉴定及开展形态学、遗传学和分子生物学等研究奠定基础。

扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 是超微形态学研究中的重要工具, 具有分辨率高、视野大、景深长和立体感强等优势, 可对光学显微镜下分辨困难的结构进行深入解析。借助扫描电子显微镜观察蚊虫的外部特征结构, 有利于更深入的进行蚊虫形态分类研究。目前, 有关蚊虫外部形态特征电镜扫描观察的研究, 国内外已多有报道。较早有 Hinton (1968) 对按蚊属的 11 种蚊虫的卵进行了电镜扫描观察和详细的形态描述。俞渊等 (1974) 对微小按蚊 *Anopheles minimus* A 种和 B 种的卵壳外膜进行了电镜扫描观察和形态比较研究, 指出了塞蚊亚属和按蚊亚属的卵壳外膜形态差异。Boo (1980) 对斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 的雌蚊触角感受器进行了电镜观察。许锦江等 (1981) 和张裕华等 (1982, 1984) 分别对中华按蚊和雷氏按蚊嗜人亚种 *Anopheles lesteri anthroohagus* 的成蚊、蛹和卵进行了扫描电镜的观察研究。柯昭喜和蒲蛰龙 (1989) 对 20 种蚊幼虫的体表微棘图式进行了描述和比较研究。Damrongphol 和 Baimai (1989) 对大劣按蚊 *Anopheles dirus* A、B、C 和 D 种的卵进行了电镜扫描观察和形态特征比较, 并描述 4 个近缘种之间卵的差异。张永生 (1989) 及张永生等 (1990) 对 9 种蚊虫的幼虫颏和上颚特征进行了电镜扫

描观察和描述。同时,许漱璧等(1991)对我国7种按蚊卵的扫描电镜形态研究。随着电镜扫描技术在蚊虫研究中应用更加广泛, Junkum 等(2004)利用电镜扫描对乌头按蚊 *Anopheles aconitus* B种和C种的卵形态进行了比较研究。李旦等(2010)对白纹伊蚊 *Aedes albopictus*、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*、中华按蚊和五指库蚊 *Culex barraudi* 野外采集的样本进行了电镜扫描观察,并进行了部分形态的描述和比较研究。Kirti 和 Shipali(2014)分别对浅色按蚊 *Anopheles subpictus* 的各个发育时期和斯氏按蚊的成蚊外生殖器进行了扫描电镜观察和形态学描述。Sehrawat(2014)对溪流按蚊 *Anopheles fluviatilis* T种的卵进行了电镜扫描观察。Hempolchom 等(2016)对赫坎按蚊种团的8种蚊虫的触角感受器进行了电镜扫描和观察,并认为触角感受器可以作为物种鉴定的特征之一。姬曼和赵君朋(2017)介绍了一种利用四氧化锇固定库蚊电镜扫描样本的方法对库蚊进行了电镜扫描观察,拍摄效果较好。Ha 等(2017)为了研究蛹呼吸管的功能不同,采用扫描电镜对中华按蚊和东乡伊蚊 *Aedes togoi* 的蛹的呼吸管喇叭口进行了细微结构的扫描和观察。以往的研究大多集中在蚊卵和感器等方面的形态学研究,对蚊虫各发育阶段形态特征进行系统地电镜扫描观察和详细描述的研究报道尚缺乏。

本研究选择实验室饲养的中华按蚊样本,制备了中华按蚊各个发育时期的电镜样品,参考 Harbach 和 Knight(1980)的蚊虫形态命名体系,对其各个发育时期的形态特征进行了电镜扫描观察、拍照和描述,在纳米级水平认识蚊虫的形态结构,为其形态分类研究提供了电镜图像和形态描述参考数据,对于蚊虫形态学和分类学研究具有价值,也为用扫描电子显微镜拍摄蚊虫乃至其它昆虫各个发育时期的显微特征的电镜样品制备和拍摄探索了一套全面的方法。

1 材料与方法

1.1 中华按蚊的实验室饲养方法

用于本研究的中华按蚊各个发育时期的虫

体均来自重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所蚊虫饲养室的中华按蚊 WX-LS 品系。

蚊虫饲养室的环境条件设置:光周期为 12L:12D;光照强度以4盏25W日光灯管为宜(饲养室面积15 m²);饲养温度为(27±1)℃;相对湿度为70%-75%;蚊虫饲养室安装自动空气净化系统、新风循环系统和超微粒粉尘过滤带。

卵、幼虫和蛹饲养工具:亚克力透明塑料饲养盆(32.5 cm×26.5 cm×6.5 cm,带盖),不锈钢蚊虫饲养架,台湾富贵竹幼鱼开口料, Tetra 德彩 TabiMin Tablets 底栖鱼丸饲料,塑料吸管(12 cm/5 mL 尖头),蜡纸。成虫饲养工具:电动吸蚊器(网购),吸蚊管(自制),成虫饲养桶(直径15 cm,高17.5 cm,自制),塑料量杯(100 mL),纯净葡萄糖粉,滤纸,3%水合氯醛溶液(Solarbio, Cat # T8590)用于小白鼠麻醉。

1.1.1 卵的收集 中华按蚊雌蚊一般吸血后48 h开始产卵,产卵过程一般在黑暗的环境中进行,持续时间为48-72 h。为了较为集中地收集中华按蚊的卵,一般分为两次进行收集,吸血后48 h的黑暗环境收集1次,收集产卵时长8 h,吸血后72 h黑暗环境收集1次,收集时长8 h。

将100 mL塑料量杯靠近底部一周垫上1 cm高度的无菌滤纸条,加入0.5-0.8 cm的过夜自来水(水位以低于滤纸条为准)后,放入吸血雌蚊饲养桶中黑暗8 h,然后将一张新的无菌滤纸折叠成漏斗状置于纸杯上,将产的卵冲洗到该滤纸上,反复冲洗2-3次。

1.1.2 卵的孵化 在饲养盆中加入1 cm左右高度的过夜自来水,将蜡纸剪成10 cm×10 cm的方形框,框边宽0.5 cm,置于水面上,使之漂浮,将冲洗后收集的卵小心的冲洗到蜡纸框中,使所有的卵漂浮于蜡纸框中(图1:A)。

中华按蚊的卵的孵化时间一般为36-72 h,孵化的1龄幼虫会从蜡纸框中游出,卵壳将留在蜡纸框内。当卵有孵化的情况出现时,在盆中放入1/4颗底栖鱼丸饲料,并每天加入少量(约100 mL)的过夜自来水,直到所有的卵孵化为幼虫为止。

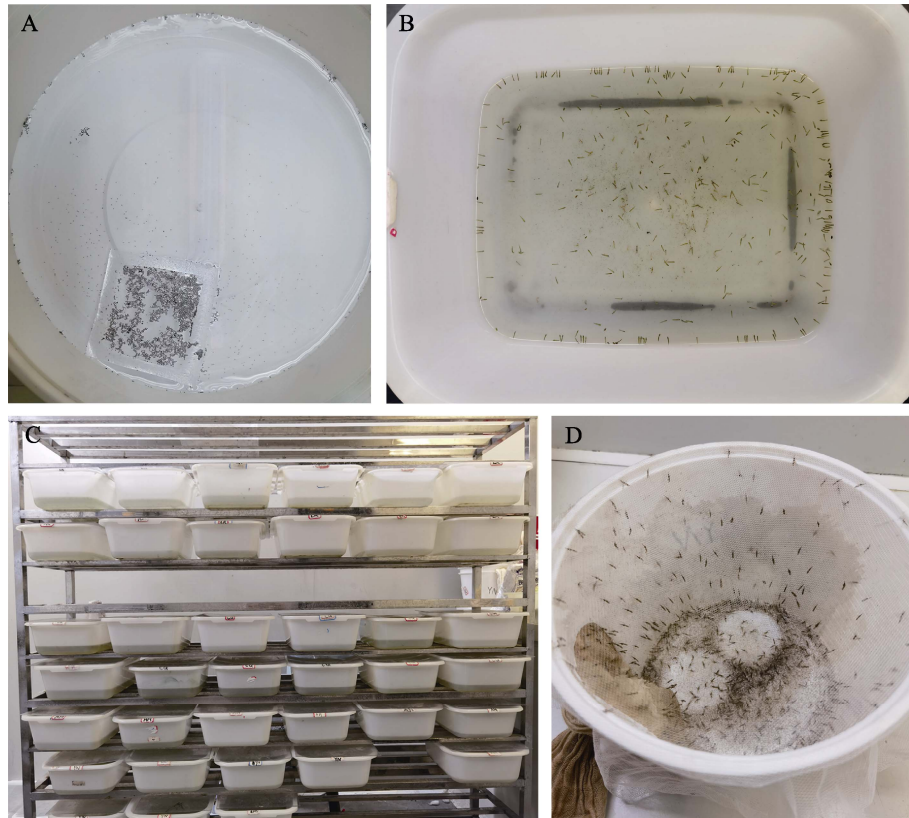


图 1 中华按蚊饲养流程

Fig. 1 *Anopheles sinensis* rearing process

A. 卵的孵化; B, C. 幼虫饲养; D. 成蚊饲养。

A. Eggs hatching; B, C. Rearing of larval; D. Rearing of adult mosquito.

1.1.3 幼虫的饲养 准备饲养盆若干,每盆中加入 1.5 cm 高的过夜去氯的自来水,将所有孵化的 1 龄幼虫用塑料吸管分到每个饲养盆中,每盆数量为 180-200 头 1 龄幼虫(图 1: B, C)。

1 龄幼虫时期,幼虫以饲喂底栖鱼丸饲料为主,一般每盆幼虫添加 1/2 颗底栖鱼丸饲料可顺利成长到 2 龄幼虫期,每天每盆幼虫需添加新鲜的过夜自来水 100-200 mL,若出现盆中水变质或有死亡幼虫的情况(用塑料吸管吹吸几次,水面气泡能否散开为准),应及时更换盆中的水(一般用吸管吸出一部分水,加入新鲜的水)。

2 龄、3 龄和 4 龄幼虫一般都采用撒食台湾富贵竹幼鱼开口料饲料进行饲养,撒食的量以少食多餐为准,撒食的时候要随时关注水质的变化,以幼虫在 2-3 h 内食完水面所有的饲料量为准。幼虫进入 4 龄末期(老熟幼虫期),可以适当减少饲料的量,等待其化蛹。

1.1.4 蛹的羽化 4 龄幼虫开始化蛹后就要将蛹逐个用塑料吸管挑到盛有蒸馏水的 100 mL 的塑料量杯中,为了提高羽化率,吸出的蛹最好在蒸馏水清洗一次后再挑入量杯中,每个量杯蛹的数量应控制在 100-120 只左右,然后置于罩有纱网的成蚊饲养笼中进行羽化。一般 36-48 h 内,蛹将羽化成成蚊。对于同一批饲养的幼虫,中华按蚊的化蛹时间并非全部一致,一般雄蚊化蛹时间和羽化时间早于雌蚊。

1.1.5 成蚊的饲养和喂血 当蚊虫饲养笼中有成蚊羽化后,就要用过夜自来水和袋装葡萄糖粉配置 10% 的葡萄糖溶液浸湿无菌棉球进行饲喂,将 10% 的葡萄糖棉球放置适量的数量(棉球的含糖葡萄糖溶液量以不滴水为准)在饲养桶的上部分纱网上,一般早晚各加一下葡萄糖保持棉球湿润。

每个饲养桶中成蚊的数量以 150-200 只为宜(图 1: D),雌雄蚊的比例保持在 1:1 左右,

待饲养桶中的全部蛹羽化完全后,继续葡萄糖棉球饲养 3 d 后即可喂血。喂血前应首先用吸蚊管轻轻吸出要喂血的雌蚊到另外一个干净的饲养桶中,饥饿 10-12 h,即可将腹腔注射了 0.5 mL 3%水合氯醛溶液进行麻醉的小白鼠放置在饲养桶的纱网上进行喂血,一般喂血要求是黑暗环境,时长为 30 min 左右,也可以观察雌蚊的吸血情况来控制时长,并时刻关注小白鼠的苏醒情况进行更换新的麻醉小鼠。

对于饲养种群数量较小或者刚开始育种驯化的中华按蚊种群,麻醉小白鼠的喂血产卵不足的情况,可以采取人工交配和人手饲血以增加其交配率和产卵量。吸血后的雌蚊可以用电动吸蚊器重新放回原来的饲养桶中与雄蚊混合,等待其产卵。

1.2 扫描电子显微镜样品的取样

(1) 卵: 取产卵后 8-10 h 的卵 100 个左右,放置在滤纸上自然风干 2-3 h; (2) 幼虫: 取 4 龄幼虫 8-10 只,用吸管吸取双蒸水反复清洗 2-3 次后制样,清洗过程要尽量小心,避免损坏幼虫形态; (3) 蛹: 用牙签挑取羽化后的雌雄蛹皮各 8-10 个,轻放在 75%的乙醇溶液中,轻微清洗 2-3 次(每次清洗都用牙签轻轻挑出放在需清洗的溶液中); (4) 成蚊: 取羽化 3-5 d 的雌雄成蚊各 5 只,至于 -20 °C 的冰箱中冷冻 3-5 min 后制样。

1.3 主要实验仪器

VFD-21S 型真空冷冻干燥仪(美国, IXRF 公司), MSP-2S 型磁控离子溅射仪(美国, IXRF 公司), 扫描电子显微镜(日本, 日立 SU 3500)。

1.4 试剂和配制方法

(1) 双蒸水。

(2) 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS): 十二水磷酸氢二钠 40.5 mL 约 1.263 g, 二水磷酸二氢钠 9.5 mL 约 0.680 g, 双蒸水定容至 100 mL。

(3) 6%戊二醛: 市售 50%戊二醛 12 mL, 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液(PBS) 50 mL, 双

蒸水定容至 100 mL。

(4) 各级浓度乙醇: 50%, 70%, 80%, 90%, 95%和 100%。

(5) 各级浓度叔丁醇与乙醇混合液: 70%叔丁醇和 30%乙醇, 80%叔丁醇和 20%乙醇, 90%叔丁醇和 10%乙醇, 100%叔丁醇。

(6) 1%锇酸。

1.5 样品的制备方法

1.5.1 卵 将风干后的卵粒直接均匀的平铺在导电胶带上后,轻微吹风,保证卵粒都粘连在胶带上后,用离子溅射仪镀膜 1.5 min 后在 5 kV 电压下进行观察和拍照。

1.5.2 蛹皮及成蚊 取得中华按蚊羽化成蚊后留下的蛹皮,羽化 3 d 的雌蚊和雄蚊置于 -20 °C 冰箱冷冻 3-5 min。用双蒸水反复清洗, 6%戊二醛固定 1-3 h, 经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 8-9 次。样品经漂洗后用逐级增高浓度的乙醇脱水 50%乙醇 10-15 min、70%乙醇 10-15 min(可置于 4 °C 冰箱过夜)、80%乙醇 10-15 min、90%乙醇 10-15 min、95%乙醇 10-15 min、100%乙醇 2 次每次 30 min。之后叔丁醇与乙醇混合液置换至 100%叔丁醇(70%叔丁醇和 30%乙醇, 80%叔丁醇和 20%乙醇, 90%叔丁醇和 10%乙醇, 100%叔丁醇/2 次, 每次 5-10 min), 用牙签轻轻地移入叔丁醇低温冷冻干燥机的容器中, 在样品表面滴上 100%叔丁醇 1 滴, 将样品置于 4 °C 以下使样品快速固化。后置于 VFD-21 S 冷冻干燥仪进行真空干燥。用导电胶带将样品固定在金属样品台上, 用 MSP-2 S 型离子溅射镀膜仪进行镀膜 1.5 min 后置于日立 SU 3500 型扫描电子显微镜下观察拍照。

1.5.3 4 龄幼虫 取得 3 龄时期的中华按蚊幼虫, 于小白瓷碗中, 饲养 1-2 d 得到 4 龄幼虫。双蒸水反复清洗 2-3 次后, 6%戊二醛固定 1-3 h, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 8-9 次, 用 1%锇酸固定 1 h(可放置于 4 °C 冰箱)。取出后, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 8-9 次。样品经漂洗后用逐级增高浓度的乙醇脱水, 叔丁醇与乙醇混合液置换等之后步骤与成蚊和蛹皮的步骤方法一致。

2 中华按蚊各个发育时期的电镜观察及特征描述

2.1 成蚊

2.1.1 雄蚊 中型棕褐色按蚊, 体长 7.5-8 mm。

2.1.1.1 头部 复眼, 稠密而整齐的排列, 单个复眼圆润饱满(图 2: C)。触角一对, 长 1.6 mm, 雄蚊触角末端有两节膨大, 向外弯曲, 内侧分布有长须毛, 整个触角布满毛鳞片。触须一对, 长 2.3 mm, 呈现类似于马尾状, 但不同的是有一中

心轴, 所有的长毛由中心轴的某个节点发出, 大约有 13 个中心的节点, 形成一条触须(图 2: B)。雄蚊与雌蚊的梗节存在明显差异, 雄蚊梗节类似于中间凹陷的圆饼状(图 2: C), 雌蚊较雄蚊饱满呈球状(图 5: B), 喙细长, 长 2 mm, 表面布满鳞片和小毛, 末端唇瓣布满刚毛和小毛。

2.1.1.2 胸部 中胸发达, 长 1.4 mm, 宽 1.2 mm, 背板占据全胸背, 中胸有一对气门, 为前气门。后胸一对平衡棒, 长 350 μ m, 平衡棒有一膨大的基部似铰链状关节、细长的棒柄以及球形结节状膨大的头部构成, 直径约 156 μ m, 其中头部

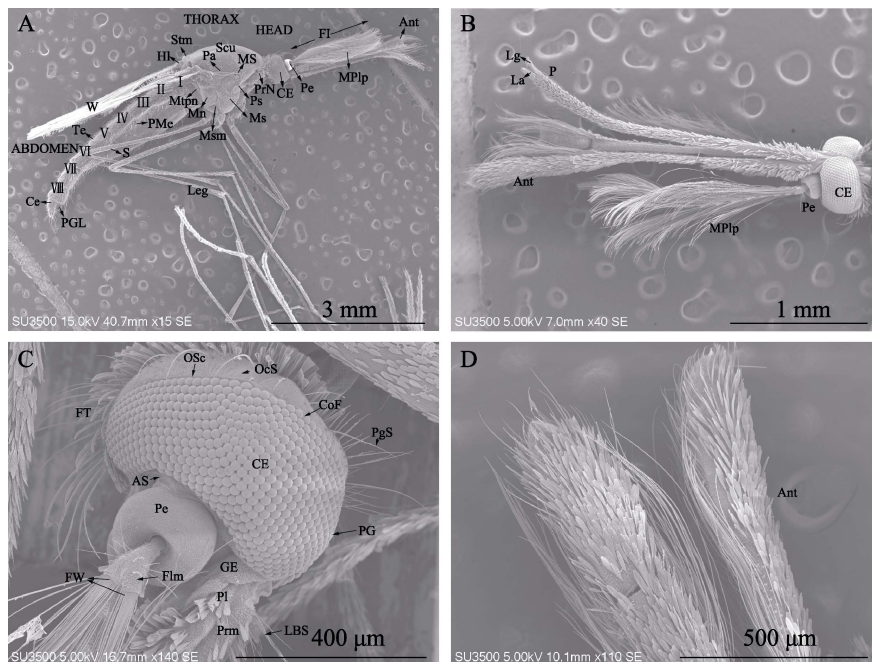


图 2 中华按蚊雄蚊头部

Fig. 2 The head of male *Anopheles sinensis*

A. 中华按蚊雄蚊侧面观; B-C. 雄蚊头部; D. 雄蚊触须顶端。Ant: 触角(图 5, 图 8, 图 11 同); AS: 触角窝(图 5 同); Ce: 尾毛(图 4, 图 7, 图 9 同); CE: 复眼(图 5 同); FI: 鞭毛; Flm: 鞭小节; FW: 鞭毛螺线; FT: 额叶丛; GE: 颊; CoF: 角膜小面; HI: 纹索; La: 唇; LBS: 唇基毛; Lg: 韧带; Mn: 中胸气门; MPLp: 下颚须; Ms: 中胸前侧片; MS: 中胸气门; Msm: 中腹节; Mtpn: 后背板; OcS: 眼板; OSc: 眼缝合; P: 吻; Pa: 侧背片(图 3 同); Pe: 梗节; PG: 盾颊; PgS: 刚毛; PGL: 生殖后叶(图 4, 图 7 同); Pl: 负颚须节; PMe: 胸膜; Prm: 前颏(图 6 同); PrN: 前背板; Ps: 前胸前侧片(图 3 同); S: 胸骨; Scu: 盾片(图 3 同); Stm: 小盾板; Te: 背板(图 4, 图 7 同); W: 翼(图 4 同)。

A. Lateral aspect of adult male *A. sinensis*; B. Head of male *A. sinensis*; C. Compound eye of *A. sinensis*; D. Terminal of maxillary palpus. Ant: Antenna (the same as Fig. 5, Fig. 8 and Fig. 11); AS: Antennal socket (the same as Fig. 5); Ce: Cercus (the same as Fig. 4, Fig. 7 and Fig. 9); CE: Compound eye (the same as Fig. 5); FI: Flagellum; Flm: Flagellomere; FW: Flagellar whorl; FT: Frontal tuft; GE: Gena; CoF: Corneal facet; HI: Halter; La: Labellum; LBS: Labial basal seta; Lg: Ligula; Mn: Mesepimeron; MPLp: Maxillary palpus; Ms: Mesepisternum; MS: Mesothoracic spiracle; Msm: Mesomeron; Mtpn: Metapostnotum; OcS: Mcular seta; OSc: Ocular suture; P: Proboscis; Pa: Paratergite (the same as Fig. 3); Pe: Pedicel; PG: Postgena; PgS: Postgenal seta; PGL: Postgenital lobe (the same as Fig. 4 and Fig. 7); Pl: Palpifer; PMe: Pleural membrane; Prm: Prementum (the same as Fig. 6); PrN: Pronotum; Ps: Proepisternum (the same as Fig. 3); S: Sternum; Scu: Scutum (the same as Fig. 3); Stm: Scutellum; Te: Tergum (the same as Fig. 4 and Fig. 7); W: Wing (the same as Fig. 4).

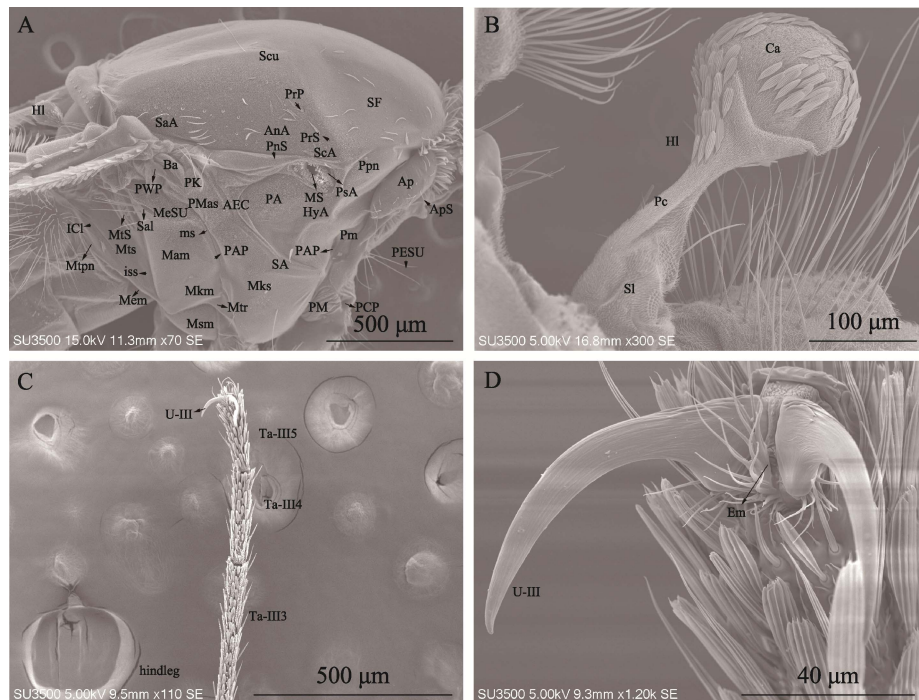


图 3 中华按蚊雄蚊胸部和足

Fig. 3 The thorax and leg of male *Anopheles sinensis*

- A. 雄蚊腹部整体; B. 平衡棒; C. 后足附节第 3 至第 5 节; D. 后足爪勾。AEC: 上前侧板裂缝; AnA: 前翼区; Ap: 前胸背板; ApS: 前额叶; Ba: 前上侧片; Ca: 肱骨小头; Em: 爪间突; HyA: 下裂区; ICl: 节段间裂; iss: 节段间缝合; Mam: 间翼; Mem: 元翼; MeSU: 下半侧毛; Mkm: 下后侧片; Mks: 中膜上位; ms: 中胸膜缝合; MS: 中胸气门; Mtpn: 后背板; Mtr: 中转节; Mts: 后胸前侧片; MtS: 上胸气门; PA: 后气孔; PAP: 胸膜突窝; Pc: 梗节; PCP: 胸膜髁突; PESU: 上胸骨柄刚毛; PK: 翼前旋钮; Pm: 前胸后侧片; PM: 前额骨后膜; PMas: 后内侧脑膜; PnS: 侧背板翅缝合; Ppn: 后前胸背板; PrP: 前切坑; PrS: 表皮下缝合; Ps: 胸膜前缝合; PsA: 前腔区; PWP: 胸膜翼突; SA: 气孔; SaA: 翅上鬃; ScA: 盾形角; SF: 前盾窝; SI: 平衡棒基; Ta-III: 后足附节; U-III: 后足爪勾。
- A. Lateral aspect of thorax of adult male; B. Haltere; C. Terminal part of hindleg of *A. sinensis*; D. The hindunguis of terminal part of hindleg. AEC: Anepisternal cleft; AnA: Antealar area; ApS: Antepre-notal seta; Ba: Basalare; Ca: Capitellum; Em: Empodium; HyA: Hypostigmal area; ICl: Intersegmental cleft; iss: Intersegmental suture; Mam: Mesanepimeron; Mem: Metameron; MeSU: Upper mesepimeral seta; Mkm: Meskatopimeron; Mks: Aeskatopimeron; ms: Mesopleural suture; MS: Mesothoracic spiracle; Mtpn: Metapostnotum; Mtr: Mesotrochantin; Mts: Metepisternum; MtS: Metathoracic spiracle; PA: Postspiracular area; PAP: Pleural apophyseal pit; Pc: Pedicel; PCP: Pleural coxal process; PESU: Upper proepisternal seta; PK: Prealar knob; Pm: Proepimeron; PM: Postprocoxal membrane; PMas: Posterior mesanepisternum; PnS: Paranotal suture; Ppn: Postpronotum; PrP: Prescutal pit; PrS: Prescutal suture; Ps: Propleural suture; PsA: Prespiracular area; PWP: Pleural wing process; SA: Aupsiracular area; SaA: Supraalar area mesomeron; ScA: Scutal angle; SF: Scutal fossa; SI: Scabellum; Ta-III: Hindtarsus; U-III: Hindunguis.

布满鳞片, 整个平衡棒布满小毛 (图 3: A)。后胸也有一对气门, 为后气门。中胸小盾板后缘呈弧形, 缘毛均匀分布。

2.1.1.3 腹部 雄性中华按蚊腹部共 8 节, 末端的尾器有一对钳状抱肢 (图 4: B-D), 抱肢长约 239 μm , 基节有鳞片, 小毛及刚毛附着, 抱肢端节向内折叠弯曲, 长约 252 μm , 相互交错, 且

抱肢端节明显长于抱肢基节。

2.1.2 雌蚊 中型棕褐色按蚊, 体长 7.7-8 mm。

2.1.2.1 头部 触角一对, 长 1.5 mm, 末端逐渐变细, 向外弯曲, 表面布满鳞片 (图 5: A)。触须一对, 长 2.1 mm, 细长末端逐渐变窄, 基部有少量鳞片附着, 整个触须布满刚毛和小毛 (图 5: C, D)。喙与触须接近等长, 长 1.95 mm,

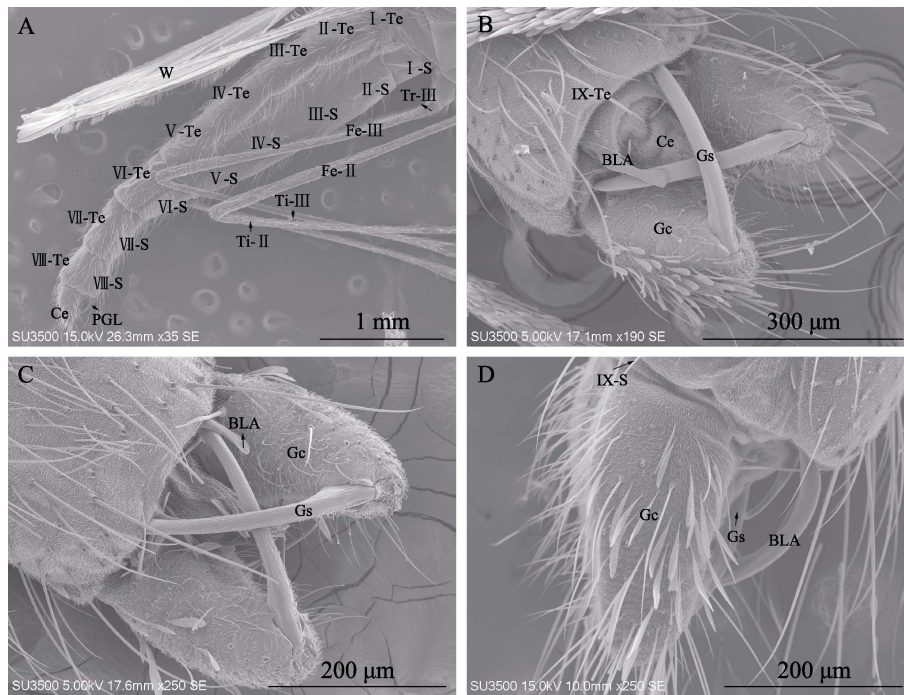


图 4 中华按蚊雄蚊腹部

Fig. 4 The abdomen of male *Anopheles sinensis*

A. 雄蚊腹部整体; B, C. 雄蚊外生殖器腹面; D. 雄蚊外生殖器侧面观。BLA: 基侧臂;
Gc: 生殖突基节; Gs: 生殖刺突; S: 胸板 (图 7 同)。

A. Lateral aspect of male abdomen; B and C. Dorsal aspect of male genitalia; D. Lateral aspect of male genitalia.
BLA: Basal lateral arm; Gc: Gonocoxite; Gs: Gonostylus; S: Strnum (the same as Fig. 7).

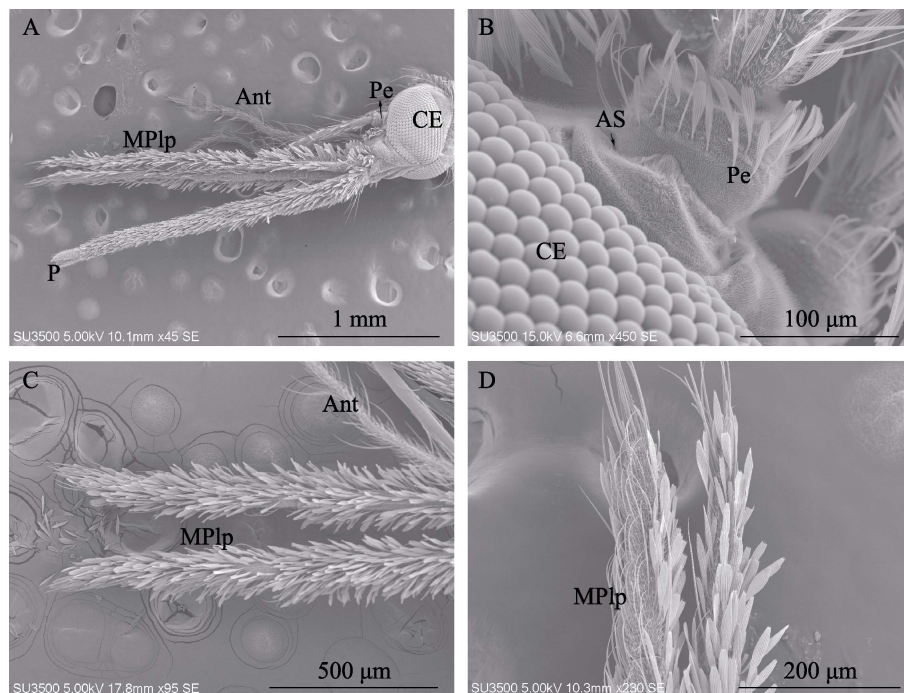


图 5 中华按蚊雌蚊头部

Fig. 5 The head of female *Anopheles sinensis*

A. 雌蚊头部整体; B. 复眼及触角梗节; C, D. 触须端部。MPLp: 上颚须; Pe: 梗节。

A. Lateral aspect of female head; B. Compound eyes and pedicel of antenna of female *A. sinensis*;
C and D. Terminal aspect of female antenna. MPLp: Maxillary palpus; Pe: Pedicel.

由上内唇及上唇咽、舌各一个, 上、下颚各一对, 共同组成细长的针管结构, 包藏在鞘状下唇之间。下唇表面附着毛鳞片, 刚毛以及小毛, 末端裂为两片为唇瓣, 其表面仅有刚毛和小毛附着。

上颚末端较宽呈现刀状, 内侧分布细锯齿, 用于切割皮肤; 下颚末端较窄呈现细刀状, 末端具有粗锯齿, 在上颚切开皮肤后用于锯刺皮肤(图 6: D)。这也是雌蚊用于吸食血液的重要工具。

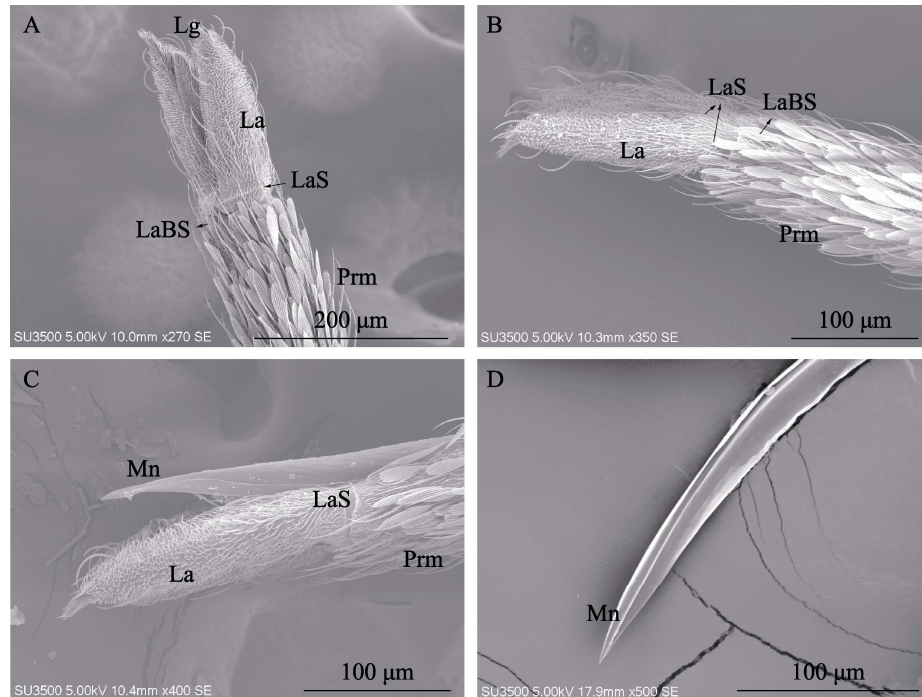


图 6 中华按蚊雌蚊喙

Fig. 6 The labellum of female *Anopheles sinensis*

A, B, C. 雌蚊喙外观; D. 雌蚊上颚。La: 唇瓣; LaBS: 唇基硬结; LaS: 唇硬结; Lg: 唇舌; Mn: 上颚。

A, B and C. The labellum of female *A. sinensis*; D. Mandible of female *A. sinensis*. La: Labellum.

LaBS: Labellar basal sclerite; LaS: Labellar sclerite; Lg: Ligula; Mn: Mandible.

2.1.2.2 腹部 雌性中华按蚊腹部 8 节, 腹部末端的尾器为一对向内弯曲的尾须, 比雄蚊抱肢短, 长约 96 μm , 其上布满刚毛和小毛(图 7)。

2.2 蛹

蛹长 6.7-7 mm, 雌雄差异不大。中华按蚊蛹与赫坎按蚊其它种类较为不同, 其呼吸管开口呈锐角三角形(图 8: C)。呼吸管管缘有一圈较为平滑整齐的钝圆齿, 每个钝圆齿呈现锐角三角形。呼吸管外壁表面有较多的锯齿状突起, 每一个突起的背面中央均有一条纵脊。呼吸管内壁表面布满微细管状的分枝, 每个小枝之间相互连接而形成许多组, 每组约有 4-6 枝, 在连接处各有一个较小的中心部(图 8: D)。在对中华按蚊蛹

时期的形态观察鉴定, 可以从呼吸管的管缘、外壁和内壁进行分析。

尾鳍长 820-860 μm , 为两瓣, 呈扇形, 齿缘较长, 缘毛短而少。每一瓣 2/3 靠近中间的位置有一条贯穿整个尾鳍的长中轴, 且在最外端有两根较长的长枝。

雄性中华按蚊蛹时期的外生殖器较雌性长, 长约 400 μm , 对称, 且由外生殖器到末端逐渐变得扁平, 末端正中心位置有微小且向内裂开的口子, 表面光滑有不规则的横纹(图 9: A, B)。雌性中华按蚊蛹时期的外生殖器较短小, 长约 320 μm , 且呈现圆形, 末端有对称呈现镰刀状的钩子, 表面平整, 外缘有呈现刺状的突起(图 9: C, D)。

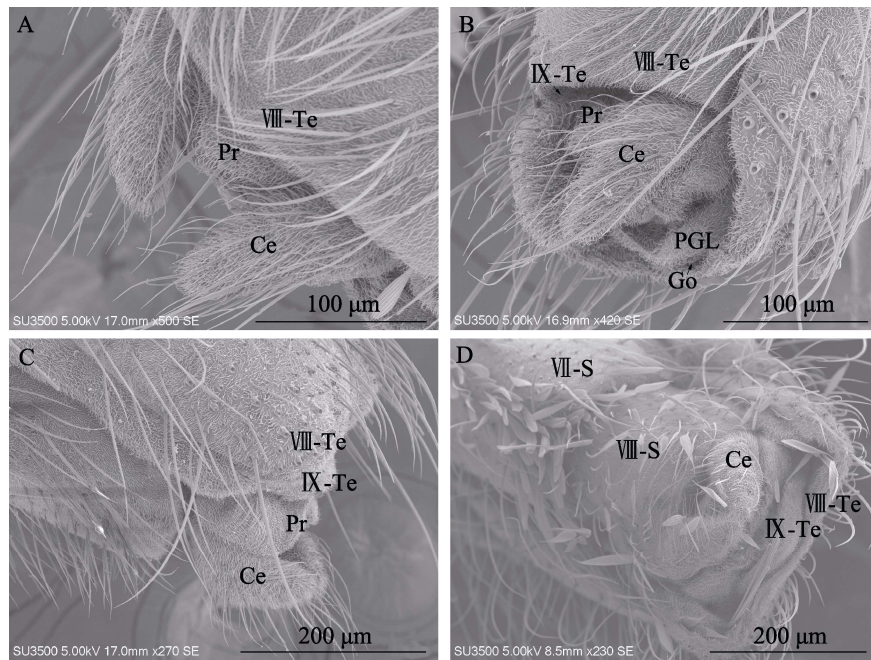


图 7 中华按蚊雌蚊外生殖器

Fig. 7 The genitalia of female *Anopheles sinensis*

- A. 雌蚊外生殖器背面; B, C. 雌蚊外生殖器侧面; D. 雌蚊外生殖器腹面。Go: 生殖口; Pr: 载肛突。
 A. Back aspect of female genitalia; B, C. Lateral aspect of female genitalia;
 D. Front aspect of female genitalia. Go: Gonotreme; Pr: Proctiger.

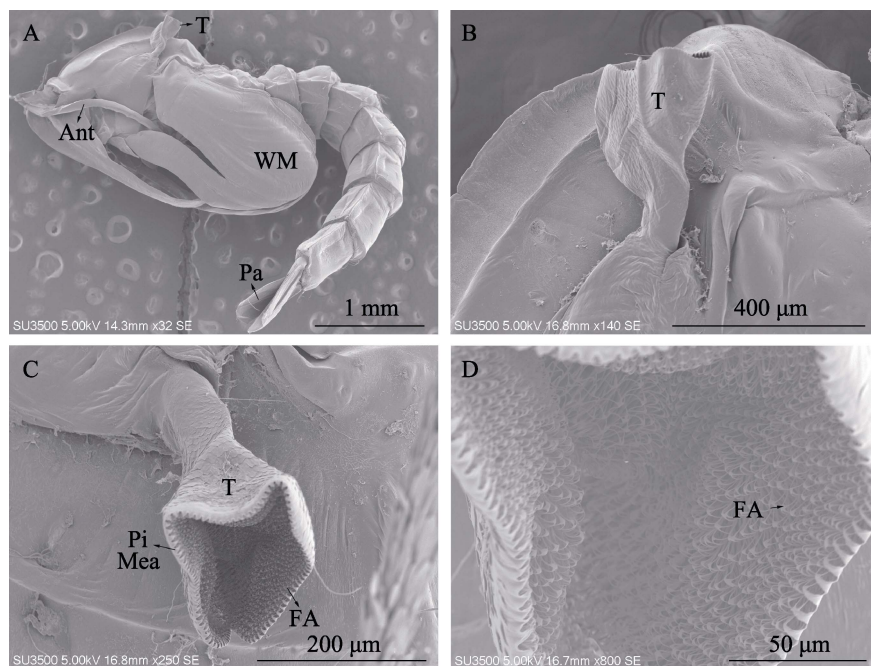


图 8 中华按蚊蛹壳整体及呼吸管

Fig. 8 The *Anopheles sinensis* pupa and trumpet

- A. 蛹壳整体; B. 呼吸管正面; C. 呼吸管覆面; D. 呼吸管内壁。FA: 滤器; Mea: 管;
 Pa: 尾鳍 (图 9 同); Pi: 羽; T: 呼吸管; MW: 中胸翼。
 A. The *A. sinensis* pupa; B. Front trumpet of *A. sinensis* pupa; C. Left trumpet of *A. sinensis* pupa;
 D. Filter apparatus of left trumpet of *A. sinensis* pupa. FA: Filter apparatus; Mea: Meatus;
 Pa: Paddle (the same as Fig. 9); Pi: Pinna; T: Trumpet; MW: Mesothoracic wing.

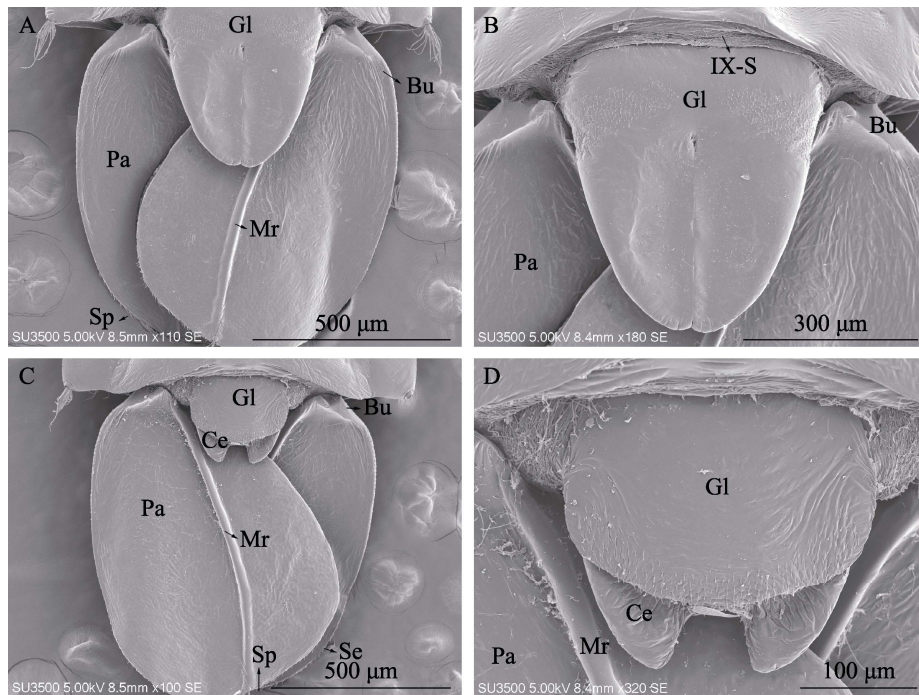


图 9 中华按蚊雄蚊及雌蚊蛹外生殖器

Fig. 9 Ventral aspect of terminal abdominal structures of female and male *Anopheles sinensis* pupa

A, B. 雄蚊蛹外生殖器; C, D. 雌蚊蛹外生殖器。Bu: 铰板; Gl: 生殖叶; Mr: 中脉; Se: 边缘锯齿; Sp: 边缘针
A, B. Genital lobe male pupa; C, D. Genital lobe female pupa. Bu: Buttress; Gl: Genital lobe;
Mr: Midrib; Se: Paddle marginal serrtions; Sp: Paddle marginal spicules.

2.3 4 龄幼虫

活 4 龄幼虫淡绿色(会因生活的水体不同而颜色稍有差异), 整体长约 5 mm, 胸腹闭合连接, 腹部分 8 节。幼虫头部长 620 μm, 宽 716 μm, 呈现莲花状, 口刷毛简单不分支。中华按蚊幼虫颅壳有一些零碎的长微棘, 存在方式为单个存在

或排成行(图 11: A)。触角上明显有数量众多的分布不规则, 大小不一, 形态大多为刺状的感受器, 这些感受器主要作用功能尚不明确。触角最顶端有两根较大的分叉, 基部生长一些细小的分叉(图 11: D)。中华按蚊 4 龄幼虫胸腹部均有毛序, 腹部呈圆筒状。与库蚊亚科不同的是, 在 VIII 节末端背面无呼吸管, 而有气门器(Spiracular

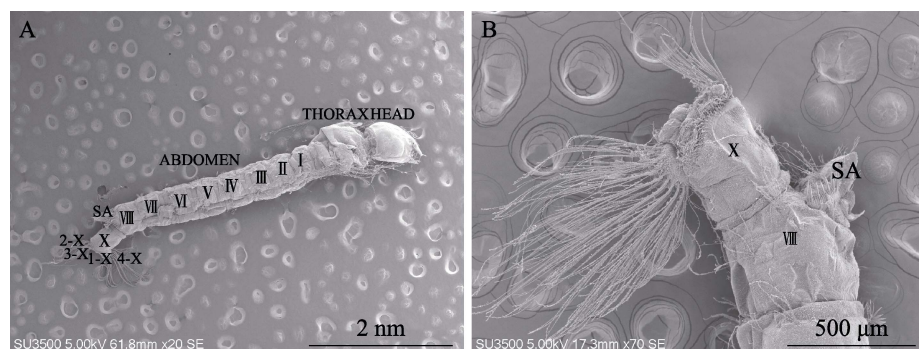


图 10 中华按蚊 4 龄幼虫和尾节

Fig. 10 Larva and telson of the 4th stage of *Anopheles sinensis*

A. 4 龄幼虫; B. 4 龄幼虫尾节。SA: 气门器。

A. 4th stage larva of *A. sinensis*; B. Telson of 4th stage larva. SA: Spiracular apparatus.

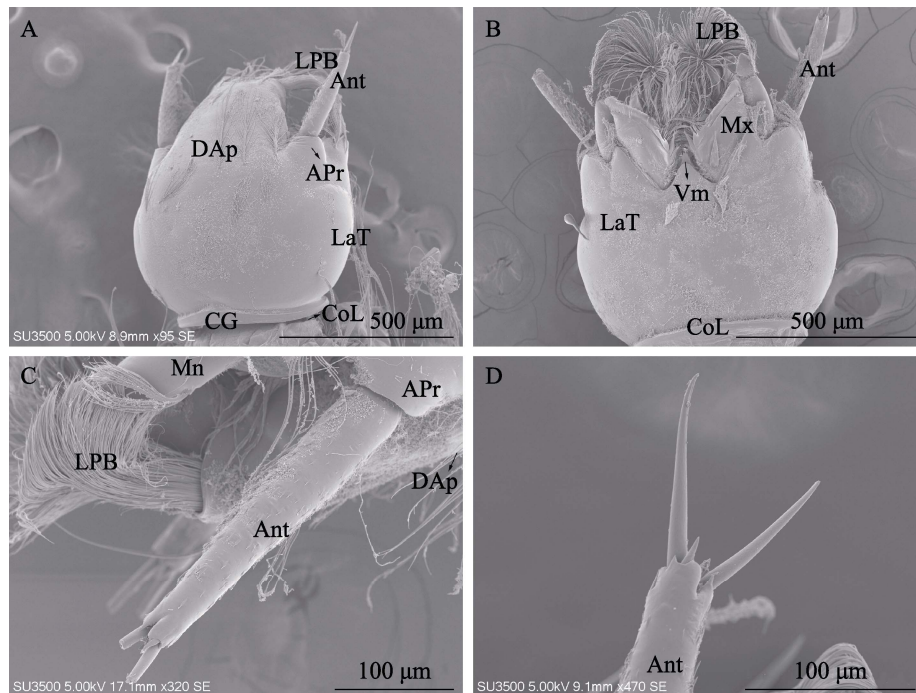


图 11 中华按蚊 4 龄幼虫头部

Fig. 11 Head of the 4th stage of *Anopheles sinensis* larva

A. 4 龄幼虫头部正面；B. 4 龄幼虫头部腹面；C, D. 触角。APr: 触角突起；CG: 冠状间隙；

CoL: 颈部项圈；DAp: 下颌骨顶；LPB: 侧腭刷；Mn: 下颌骨；Mx: 上颌骨；Vm: 腹突。

A. Dorsal aspect of larva head; B. Anterodorsal aspect of larva head; C and D. Antenna of fourth stage larva.
APr: Antennal prominence; CG: Coronal gap; CoL: Collar; DAp: Dorsal apotome; LPB: Lateral palatal brush;
Mn: Mandible; Mx: Maxilla; Vm: Ventromentum.

apparatus, SA))(图 10: B), 这也是为什么按蚊属幼虫是与水面平行游动, 而库蚊亚科的蚊虫是与水面呈一定角度游动(一般尾节在上, 头部在下)的原因。

2.4 卵

蚊卵整体呈船形, 船面较其他蚊种大, 长度约为 0.5 mm, 宽度约为 0.18 mm, 表面有分布均匀呈细粒状的小突起(图 12: A, B), 且分布呈现五边形或六边形的花纹结构, 其中以六边形居多(图 12: D), 这是中华按蚊区别于其他蚊种的一个重要特征。浮器长约 0.3 mm, 浮肋数 22-24 条, 前隆饰约有 5-7 个, 后隆饰约有 4-6 个, 每个隆饰约有 6-10 瓣, 期间有细丝相连。卵背面两端较为圆钝称为精孔区, 精孔区的外围有一圈花瓣形的护环与之相连, 护环表面平整光滑, 一般为 7 瓣, 相互之间有细丝相连接。精孔扁平凹陷, 大部分的凹陷中心可见一小结节(图 12: C)。

3 结论与讨论

近半个世纪以来, 利用电镜扫描技术进行蚊虫的形态学和生理学的研究已经十分广泛。按蚊属是人类疟疾传播的唯一媒介, 中华按蚊作为我国分布最广泛的按蚊属昆虫, 其形态分类学特征的准确鉴定也是蚊媒防治和控制疟疾传播的重要手段。本研究基于电镜扫描技术, 比较全面地对中华按蚊成虫、蛹、4 龄幼虫和卵的超微形态特征进行了扫描电镜观察, 这为中华按蚊的分类学以及蚊媒防控都提供了直观的形态学鉴定依据。

目前, 蚊虫近缘种特别是种团和复合体内的种的分类学研究仍然是重要的研究课题之一。蚊虫卵的形态特征一直作为近缘种分类的主要特征之一, 本研究拍摄了中华按蚊卵的细微结构, 其蚊卵背面网纹颗粒及组成、船面的宽度、饰缘的完整性、厚薄和高度等都与赫坎按蚊种团中其

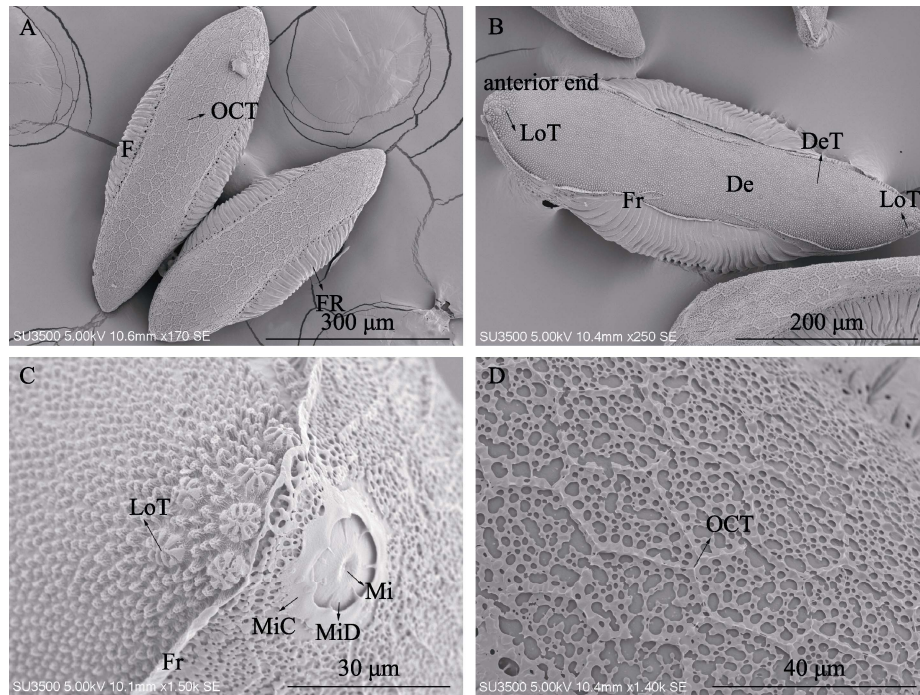


图 12 中华按蚊蚊卵

Fig. 12 Egg of *Anopheles sinensis*

- A. 蚊卵背面; B. 蚊卵腹面; C. 蚊卵端部及精孔区; D. 蚊卵背面网纹。De: 甲板; DeT: 甲板结节;
FR: 浮器; Fr: 褶边; LoT: 隆饰; Mi: 精孔; MiC: 珠孔领; MiD: 珠孔盘; OCT: 外绒毛结节。
A. Dorsal surface of egg; B. Ventral surface of egg; C. Anterior end and micropyle of egg; D. Outer chorionic
tubercle of egg. De: Deck; DeT: Deck tubercle; FR: Float ridge; Fr: Frill; LoT: Lobed tubercle;
Mi: Micropyle; MiC: Micropylar collar; MiD: Micropylar disc; OCT: Outer chorionic tubercle.

它蚊种有明显的差异,在中华按蚊的卵中,其船面宽度达到 0.5 mm,这个宽度在赫坎按蚊种团宽度最大,可以作为该种团重要的鉴别特征(许锦江和冯兰洲,1975;许漱壁等,1991;董学书,2010;李旦等,2010)。中华按蚊蛹的电镜图片显示其呼吸管的开口呈锐角三角形和管缘部位有一圈较为平滑整齐的钝圆齿等特征,也是区别于其它蚊种的重要形态特征(李旦等,2010)。此外,蚊虫触角感器在电镜下特征也是蚊虫种类鉴定的重要方面,张静等(2019)对中华按蚊的雌蚊和幼虫的触角感器进行了较为详细的研究,发现其数量和种类与其它蚊虫的不同,本研究中就未再对该蚊虫的感器进行精细拍照。对蚊虫的外部形态特征进行扫描电镜观察是分类学研究的重要手段,本研究在蚊虫成虫、蛹、4龄幼虫和卵电镜样品制备技术上基于前人(李向党,1993;Sehrawat,2014;姬曼和赵君朋,2017)的研究进行了探索和创新。由于蚊卵卵壳的几丁

质层较硬,且卵的含水量和失水性低的特点,在本次研究中,蚊卵采用自然干燥的方式进行制样,虽然电镜观察下有少部分样品发生形变,但是并不影响整体上蚊卵结构的观察和拍照。蚊虫的幼虫和蛹都生活在水中,其含水量和失水性都要明显高于其它的陆生昆虫,而幼虫皮和蛹壳的含水量很低,且能够较完整的展现蚊虫幼虫期和蛹期的形态特征,但在取样过程中,由于蚊虫个体较小,幼虫皮较薄的特性,在逐级脱水过程中,极易发生损坏,因此本研究中华按蚊幼虫期和蛹期的取样分别是4龄幼虫和蛹皮,但是建议陆生或者个体较大的昆虫可以采用取幼虫皮来进行制样的方法,避免制样和拍照过程中失水造成虫体发生较大的形变。

在制备样品固定过程中,成蚊和蛹壳由于含水量较低,延用了许锦江等(1981)的方法,使用 pH7.4 磷酸缓冲液配置的浓度为 6%戊二醛进行固定。但是对于4龄幼虫的电镜样品,为了避

免样品发生较大的形变, 在进行 6%戊二醛固定之后, 将样品置于 1%锇酸溶液中 4 °C 固定 1 h, 使其形态更为稳固。杨瑞等 (2014) 采用微波和 3%戊二醛中加入氯化钠及吐温 - 80 的方法, 固定了桃蛀螟幼虫电镜样品, 效果较好。本文采用戊二醛和四氧化锇结合的方法固定的幼虫样品形变较小, 但是需要制备完全没有形变的样品, 还需要进一步的探索研究。

在蚊虫幼虫、蛹和成蚊电镜样品的脱水和干燥阶段, 此次研究脱水过程采取乙醇梯度, 该操作不仅简便而且安全。不同于以往的临界点干燥法, 此次试验中采用的是叔丁醇真空冷冻干燥法, 在李向党 (1993) 研究中涉及到的单用叔丁醇的扫描电镜样品的制备方法, 在原先乙醇梯度脱水之后, 用叔丁醇与乙醇以一系列浓度梯度比进行置换至 100%叔丁醇干燥, 后置于叔丁醇冷冻干燥机让样品在真空下迅速升华干燥, 使样品在较短时间内达到干燥, 避免了形变的发生。

本研究对电子扫描显微镜样品制备技术的探索和改进, 不仅成功制备了蚊虫各个发育时期的电镜样品, 而且较全面的对中华按蚊的超细微结构进行电镜拍照和再描述, 不仅为昆虫电镜样品制备提供了较为全面的技术, 也为中华按蚊的分类学研究提供了更为详细的形态特征数据。但蚊虫的分类研究除了形态学研究以外, 还需要结合其生物学习性和分子标记共同准确地进行种类的鉴定。

参考文献 (References)

- Boo KS, 1980. Antennal sensory receptors of the male mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 61(3): 249–264.
- Chen B, Zhang YJ, He ZB, Li WS, Si FL, Tang Y, He QY, Qiao L, Yan ZT, Fu WB, Che YF, 2014. De novo transcriptome sequencing and sequence analysis of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 7: 314.
- Damrongphol P, Baimai V, 1989. Scanning electron microscopic observation and differentiation of eggs of the *Anopheles dirus* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 5(4): 563–568.
- Dong XS, 2010. The Mosquito Fauna of Yunnan China, Volume 1. Yunnan: Yunnan Science & Technology Press. 1–394. [董学书, 2010. 云南蚊类志, 上卷. 云南: 云南科技出版社. 1–394.]
- Feng LZ, Xu JJ, 1964. The outer morphology and structure of mosquito eggs. *Acta Parasitologica Sinica*, 1(1): 83–90. [冯兰洲, 许锦江, 1964. 蚊卵的外部形态与结构. 寄生虫学报, 1(1): 83–90.]
- Gao Q, Beebe NW, Cooper RD, 2004. 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. *Journal of Medical Entomology*, 41(1): 5–11.
- Ha YR, Yeom E, Ryu J, Lee SJ, 2017. Three-dimensional structures of the tracheal systems of *Anopheles sinensis* and *Aedes togoi* pupae. *Scientific Reports*, 7: 1–8.
- Harbach RE, Knight KL, 1980. Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy. New Jersey: Plexus Publishing. 1–369.
- He ZB, Zhang J, Shi ZP, Liu JG, Zhang JJ, Yan ZT, Chen B, 2019. Modification of contact avoidance behaviour associated with pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Malaria Journal*, 18(1): 131.
- Hempolchom C, Yasanga T, Adulsak Wijit A, Taai K, Dedkhad W, Srisuka W, Thongsahuan S, Yasushi Otsuka Y, Takaoka H, Saeung A, 2016. Scanning electron microscopy of antennal sensilla of the eight *Anopheles* species of the Hyrcanus group (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Parasitol Res.*, 25(1): 143–153.
- Hinton HE, 1968. Observation on the biology and taxonomy of *Anopheles* mosquitoes. *Bulletin of Entomological Research*, 57: 495–508.
- Ji M, Zhao JM, 2017. A simple and rapid preparation technique for scanning electron microscope of mosquito. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 36(2): 177–179. [姬曼, 赵君朋, 2017. 一种适用于蚊类扫描电镜样品简便快速的制备方法, 电子显微学报, 36(2): 177–179.]
- Junkum A, Jitpakdi A, Komalamisra N, Jariyapan N, Somboon P, Bates PA, Choochote W, 2004. Comparative morphometry and morphology of *Anopheles aconitus* form B and C eggs under scanning electron microscope. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.*, 46(5): 257–262.
- Ke ZX, Pu ZL, 1989. Scanning electron microscopic observation on epicuticular patterns in mosquito larvae (Diptera, Culicidae) and their taxonomic studies. *Acta Entomologica Sinica*, 32(2): 176–186. [柯昭喜, 蒲蛰龙, 1989. 蚊幼虫体表微细结构的扫描电镜观察及分类学研究. 昆虫学报, 32(2): 176–186.]
- Kirti JS, Shipali A, 2014. Life history studies of *Anopheles (Cellia) subpictus* Grassi (Anophelinae: Culicidae) with the aid of scanning electron microscopy (SEM) from Punjab. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(5): 345–350.
- Li D, Xu SE, Jin LQ, 2010. Scanning electron microscopy observation on *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles sinensis* and *Culex barraudi*. *Journal of Shantou University*

- Medical College*, 23(2): 75–77. [李旦, 许世镗, 金立群, 2010. 白纹伊蚊、致倦库蚊、中华按蚊与五指库蚊扫描电镜观察. 汕头大学医学院学报, 23(2): 75–77.]
- Li XD, 1993. A method of using tert-butanol for preparation scanning electron microscopic specimens. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 15(3): 97. [李向党, 1993. 单用叔丁醇的扫描电镜样品制备法. 电子显微学报, 14(5): 97.]
- Liu NN, Xu Q, Zhu F, Zhang L, 2006. Pyrethroid resistance in mosquitoes. *Insect Sci.*, 13(3): 159–166.
- Sehrawat N, 2014. Scanning electron microscopic observations of eggs of *Anopheles fluviatilis* (T) mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Zoological Sciences*, 4(2): 6–12.
- Si FL, Qiao L, He QY, Zhou Y, Yan ZT, Chen B, 2019. HSP superfamily of genes in the malaria vector *Anopheles sinensis*: Diversity, phylogenetics and association with pyrethroid resistance. *Malaria Journal*, 18(1): 132.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5(1): 11–21.
- Sun LX, Wu HX, Zhang RB, Ding YJ, Zhu GQ, Yang QG, Zhu L, 2010. Researches on the identification of mosquitoes. *Chinese Journal of Frontierhealth and Quarantine*, 33(2): 139–143. [孙立新, 吴汉霞, 张荣波, 丁永建, 朱国强, 杨庆贵, 朱临, 2010. 蚊分类鉴定研究进展. 中国国境卫生检疫杂志, 33(2): 139–143.]
- Xu JJ, Feng LZ, 1975. Studies on the *Anopheles hyrcanus* group of mosquitoes of China. *Acta Entomologica Sinica*, 18(1): 77–98. [许锦江, 冯兰洲, 1975. 我国赫坎按蚊类群的研究. 昆虫学报, 18(1): 77–98.]
- Xu JJ, Zhao ML, Ma JX, 1981. Comparative studies on the scanning electron micrographs of *Anopheles sinensis* Wind. and *Anopheles lesteri anthropophagus* XÜ et Feng. *entomotaxonomia. Acta Entomologica Sinica*, 3(4): 265–272. [许锦江, 赵美鉴, 马金鑫 1981. 中华按蚊和雷氏按蚊嗜人亚种扫描电镜的比较观察. 昆虫学报, 3(4): 265–272.]
- Xu SB, Qu FY, Zhang QH, Lu YL, 1991. Studies on scanning electromicroscopic morphology of seven species of anopheline mosquito eggs from China. *Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.*, 12(6): 539–542. [许漱璧, 翟逢伊, 张其鸿, 陆月良, 1991. 我国七种按蚊卵的扫描电镜形态研究. 第二军医大学学报, 12(6): 539–542.]
- Yang FL, Li XD, Yan ZT, Chen B, 2014. The molecular identification makers of *Anopheles sinensis*. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, 31(4): 40–44. [杨飞龙, 李旭东, 闫振天, 陈斌, 2014. 中华按蚊的分子鉴定标准. 重庆师范大学学报(自然科学版), 31(4): 40–44.]
- Yang R, Zhang LN, Fan JW, Wang JL, Fang KF, Yu TQ, Wang SH, Du YL, 2014. Insect specimens for scanning electron microscopy. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 29(4): 33–35. [杨瑞, 张玲娜, 范敬伟, 王建立, 房克凤, 于同泉, 王绍辉, 杜艳丽, 2014. 昆虫材料扫描电镜样品制备技术. 北京农学院学报, 29(4): 33–35.]
- Yu Y, Liang JJ, Peng XM, 1974. Ultrastructural morphology of exochprium of *Anopheles (Cellia) minimus*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 7(1): 65–65. [俞渊, 梁家瑾, 彭小妹, 1974. 微小按蚊卵壳外膜超微结构. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 7(1): 65–65.]
- Zhang J, Zhang JJ, Shi ZP, Yan ZH, Chen B, He ZB, 2019. Observation of antennal sensilla of the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) under scanning electron microscope. *Acta Entomologica Sinica*, 62(3): 312–322. [张静, 张晶晶, 史宗畔, 闫振天, 陈斌, 何正波, 2019. 疟疾媒介中华按蚊触角传感器的扫描电镜观察. 昆虫学报, 62(3): 312–322.]
- Zhang YH, Xu XF, Wang ZW, Su SZ, 1982. Preliminary observation on the scanning electron microscopy of *Anopheles sinensis* in Zhengzhou area. *Journal of Henan University of Chinese Medicine*, 47(17): 1671–6825. [张裕华, 徐秀芬, 王仲文, 苏寿沅, 1982. 郑州地区中华按蚊卵电镜扫描的初步观察. 河南医学院学报, 47(17): 1671–6825.]
- Zhang YH, Xu XF, Wang ZW, Su SZ, 1984. Preliminary observation on the scanning electron microscopy of *Anopheles sinensis* eggs from different geographical strains. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2(1): 48. [张裕华, 徐秀芬, 王仲文, 苏寿沅, 1984. 不同地理株中华按蚊卵的扫描电镜观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2(1): 48.]
- Zhang YS, 1989. Study on the differentiating features of the mandibles of nine species of *Aedes* genus with scanning electron microscope. *Journal of Pathogen Biology*, 2(4): 282–284. [张永生, 1989. 我国伊蚊属 9 种蚊幼虫上腭扫描电镜鉴别特征的研究. 中国病原生物学杂志, 2(4): 282–284.]
- Zhang YS, Liu CC, Cui XM, 1990. Scanning electron microscopic studies on classification of mentum in 9 species of 5 genera in China. *Journal of Norman Bethune University of Medical Science*, 16(6): 563–565. [张永生, 刘长春, 崔新明, 1990. 我国 5 属 9 种蚊幼虫颏扫描电镜鉴别特点的研究. 白求恩医科大学学报, 16(6): 563–565.]
- Zhong D, Chang XL, Zhou GF, He ZB, Fu FY, Yan ZT, Zhu GD, Xu TL, Bonizzoni M, Wang MH, Cui LW, Zheng B, Chen B, Yan GY, 2013. Relationship between knockdown resistance, metabolic detoxification and organismal resistance to pyrethroids in *Anopheles sinensis*. *PLoS ONE*, 8(2): e55475.