应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2018, 55(2): 288−293. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2018.039

基于几何形态学的三种库蠓翅的形态变化分析*

常琼琼** 蒋晓红 侯晓晖***

（遵义医学院，基础医学院，遵义 563000）

摘 要 **【目的】** 基于几何形态学方法定量分析库蠓亚属中 3 个近似种（刺螯库蠓 *Culicoides punctatus*、灰黑库蠓 *Culicoides pulicaris* 和新替库蠓 *Culicoides newsteadi*）翅的形态变化规律，以期进行准确鉴定。**【方法】** 运用几何形态学标点（Landmark）对 3 种库蠓的翅进行量化分析，并结合主成分分析法（Principal component analysis, PCA）、典型变量分析法（Canonical variate analysis, CVA）、薄片样条（Thin-plate spline, TPS）及聚类分析法对 3 种库蠓翅进行分析比较，探讨其形态变异。**【结果】** 3 种库蠓的翅在翅型、翅脉结构上存在着显著差异，主要发生在径中横脉、径室区，以及翅基部和端部。**【结论】** 几何形态学能够作为一种工具对蠓科昆虫进行种间关系及分类研究。

关键词 库蠓属，近似种，翅，几何形态学，形态变化

Geometric morphometric analysis of wing shape variation among three important species of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae)

CHANG Qiong-Qiong** JIANG Xiao-Hong HOU Xiao-Hui***

(Zunyi Medical University, School of Basic Medicine, Zunyi 563000, China)

Abstract **[Objectives]** To assess geometric morphometric analysis of wing shape as a means of accurately identifying three biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, *C. punctatus*, *C. pulicaris* and *C. newsteadi*. **[Methods]** Various geometric methods were used to analyze wing shape variation, including landmarks, principal component analysis, canonical variate analysis, thin-plate splines and cluster analysis. **[Results]** Significant differences in wing shape and venation were apparent among the three species, the main differences were in the radio-median cross-vein, radial cell, and basal and distal portions of the wing. *C. punctatus* and *C. newsteadi* were most similar in wing shape and venation. **[Conclusion]** Geometric morphometrics is a useful tool for identifying interspecific relationships within the Ceratopogonidae.

Key words *Culicoides*, similar species, wing, geometric morphometric, morphologic variation

库蠓属 *Culicoides* Latreille 隶属于双翅目 Diptera、蠓科 Ceratopogonidae，是吸血蠓中最大的一个属，目前我国已知 328 种（常琼琼等，2017）。库蠓可吸食人畜血液，携带流行性乙型脑炎病毒，并传播牛羊蓝舌病、鸡原虫病、非洲马瘟等，是一类重要的媒介昆虫（Hoffmann *et al.*，2009；王飞鹏等，2010）。上述疾病的暴发流行会带来巨大的经济损失，因而媒介蠓虫的研究已成为近年来国内外的研究热点。库蠓属的分类鉴定主要依据翅及外生殖器的特征，即翅斑及殖下板、阳茎中叶、阳基侧突等，但近似种的鉴别特征非常接近，传统分类难以实现准确鉴定。几何形态学作为新的分类方法在国外已应用到库蠓的分类研究中（Hajd*et et al.*，2014），但

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（81360257）；遵义市科技创新人才团队培养项目〔遵市科合(2015)40 号〕；贵州省“西部之光”访问学者项目

**第一作者 First author，E-mail：1210995898@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：hxh19801122@163.com

收稿日期 Received：2017-10-25，接受日期 Accepted：2017-12-07

国内鲜有报道。

几何形态学可以对形状及形状变异进行定量描述、分析及解释，对于分类鉴定特征少且以翅斑为主要鉴定特征的蠓科昆虫研究非常适合。目前，国内外学者已将几何形态学应用于多个类群的昆虫分类研究中，如在膜翅目、双翅目、鞘翅目等昆虫中进行了应用性研究，均证明几何形态学在区分微小的形状变异方面是个有力的工具（Villemant*et et al.*，2007；Bubliy*et et al.*，2008；白义等，2015；佟一杰等，2016；李玲等，2017）。本研究以库蠓属 3 种近似种即刺螯库蠓 *Culicoides punctatus*、灰黑库蠓 *Culicoides pulicaris* 和新替库蠓 *Culicoides newsteadi* 为研究对象，运用地标点法定量分析翅的形态变化规律，为库蠓的分类和进化研究提供新的形态学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究选取刺螯库蠓 *C. punctatus*、灰黑库蠓 *C. pulicaris* 和新替库蠓 *C. newsteadi* 雌性成虫玻片共 52 个样本，将所有样本进行编号，其中刺螯库蠓编号为 C1-C21，灰黑库蠓编号为 H1-H17，新替库蠓编号为 X1-X14。将玻片置于装有 Canon DS 126371 照相机的 Leica DM2500 显微镜上，采集翅图像，保存图片为 JPG 格式。

1.2　数据的提取及标准化处理

用 TPSdig 2 软件分别对每种库蠓的翅进行数字化标点即地标志点（Landmark），标点选择翅脉稳定的交叉点或转折点，共标记 14 个点（图 1），所得数据输出为 TPS 文件。运用 tpsSmall 软件对形态原始数据集内部相关性进行检验，并使用广义普氏分析法（Generalized procrustes analysis, GPA）将地标点轮廓叠加，并使地标点离差最小化，在同一坐标体系中剔除形态信息分析中非形态因素的影响。

1.3　几何形态学分析

本研究利用 Morpho J 软件，基于主成分分析（Principal component analysis, PCA）和典型变量分析（Canonical variate analysis，CVA）方法，对蠓虫翅的几何形态学数据进行分析。提取前 2 个主成分做散点图，结合薄板样条（Thin-plate spline, TPS）分析，将 2 个主成分上的变异部位以可视化图例的方式来展示。在主成分分析的基础上，又进行了典型变量分析（CVA），相关结果以马氏距离（Mahalanobis distance）和普氏距离（Procrustes distance）及其

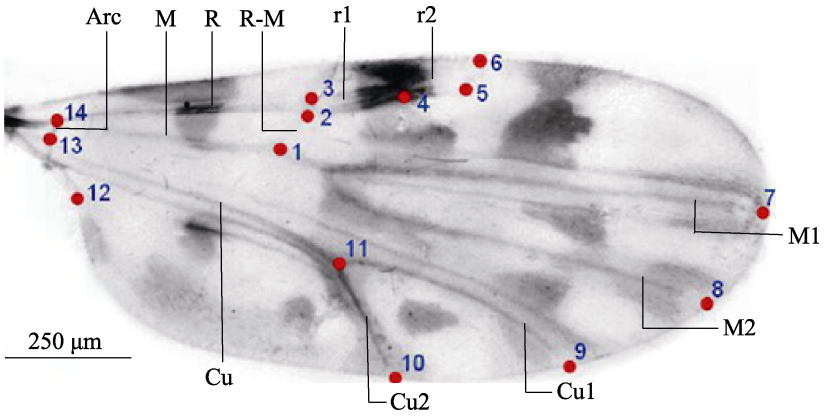

图 **1**　翅的 **14** 个地标点及翅脉

Fig. 1　Distribution of landmarks and veins on wing of *Culicoides*

Arc：弓脉；M，M1，M2：中脉及其分支；R：径脉；R-M：径中横脉；r1，r2：径 1 室和径 2 室；Cu, Cu1, Cu2：肘脉及其分支。

Arc: Arculus; M, M1, M2: Medial and branches; R: Radial; R-M: Radial-median crossvein; r1, r2: First and second radial; Cu, Cu1, Cu2: Cubital and branches.

差异显著性比较来展现。另外，本研究运用 tps-Super 32 软件计算种内平均形态，应用 tps-Small 1.20 软件计算样本间普氏距离，通过 NTsys 2.10e 软件运用非加权组平均法（Unweighted pair-group method with arithmetic means，UPGMA）分析普氏距离矩阵，创建表型树对 3 种库蠓翅做聚类分析，探讨其翅脉的相似关系。

2 结果与分析

2.1 3 种库蠓翅的主成分分析（PCA）

本实验选取的 3 种近似库蠓（主要形态鉴别特征翅斑及雄虫生殖器如图 2、图 3）翅的主成分分析，共获得 24 个主成分，其中前 2 个主成分占形态变异的 49.783%（表 1），能够说明 3 种库蠓翅的主要变异规律。对第 1 和第 2 主成分作散点图（图 4）可知，新替库蠓与大部分刺螯库蠓主要分布在 PC1 轴的正方向，且有大部分重叠，灰黑库蠓主要分布于轴的负方向，与刺螯库蠓和新替库蠓有小部分的重叠，结合网格扭曲图，在 PC1 轴上，翅的变异主要发生在径中横脉至翅端（标点 1 至 7、8）之间以及径中横脉至翅基部（标点 1 至 13、14）之间。在 PC2 轴上，3 种库蠓均分布于轴的正负两个方向，但灰黑库蠓的种内变化范围较刺螯库蠓和新替库蠓大，从网格扭曲图可知，翅的变异主要发生在径 1 室与径 2 室交点至臀 2 脉端部（标点 4、10）之间和径 2 室端部至臀 1 脉端部（标点 5、9）之间。

PCA 分析认为，刺螯库蠓与新替库蠓的形态相似度较高，而灰黑库蠓与前两者差异较大。3 种库蠓翅的差异主要集中在径中横脉、翅基部和翅端部，在 PC1 轴上由负到正方向变化趋势是径中横脉、径 1 室和径 2 室至翅基部距离缩短，至翅端及翅右下缘距离扩大，即由灰黑库蠓到刺螯库蠓翅的主要变化是自径室区向翅基部缩小，向翅端部及右下缘扩大。在 PC2 轴上由负到正方向变化趋势是径中横脉、径 1 室和径 2 室至翅下缘距离逐渐缩小，即由灰黑库蠓到新替库蠓翅的主要变化是自上缘径室区域至翅下缘逐渐变窄。

2.2 3 种库蠓翅形态变异

基于主成分分析的结果，对翅的形态变异距离进行统计学分析。由马氏距离及其 *P* 值比较

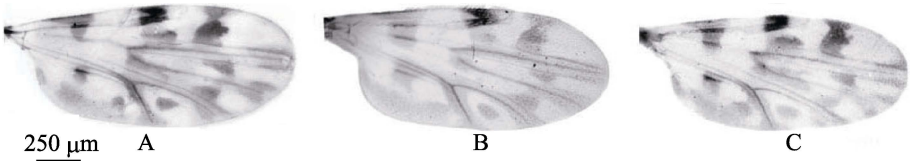

图 2 3 种库蠓翅形态图

Fig. 2 The wing of three biting midges

A. 刺螯库蠓 *C. punctatus*；B. 灰黑库蠓 *C. pulicaris*；C. 新替库蠓 *C. newsteadi*.

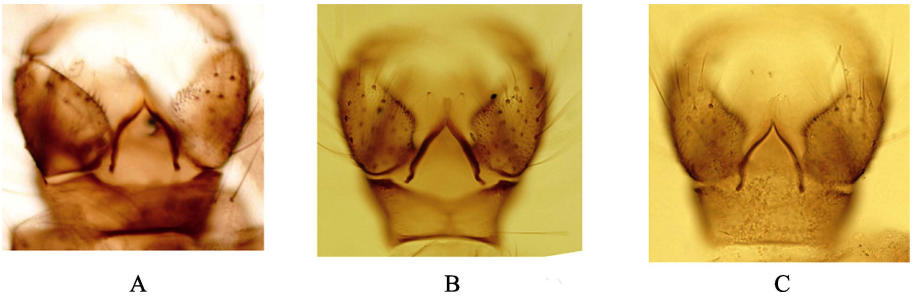

图 3 3 种库蠓雄虫尾器

Fig. 3 The hypopygium of three biting midges

A. 刺螯库蠓 *C. punctatus*；B. 灰黑库蠓 *C. pulicaris*；C. 新替库蠓 *C. newsteadi*.

表 1　3 种库蠓翅变异的前 2 个主成分

Table 1　The first two principal components of the shape variation of wing of three biting midges

主成分 Principle component	特征值 Eigenvalue	占总体变异（%） Variance (%)	累计总体变异（%） Cumulative variance (%)
1	0.000 327 21	34.578	34.578
2	0.000 143 89	15.206	49.783

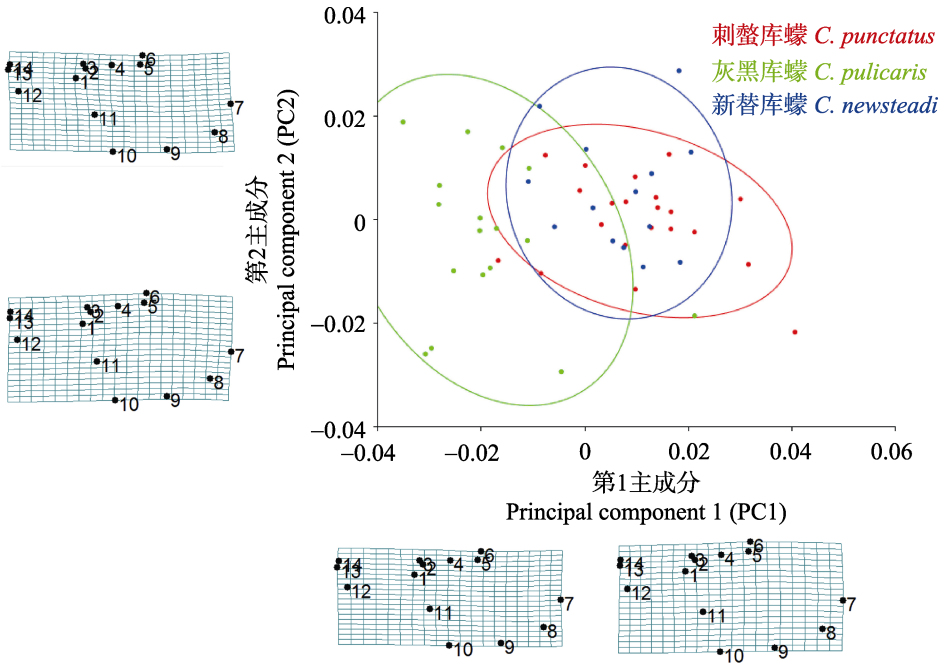

图 4　3 种库蠓翅第 1 主成分和第 2 主成分的散点图和翅形轮廓分析

Fig. 4　The scatter plots of PC1 and PC2 for wing and outline variation of three biting midges

表 2　3 种库蠓翅马氏距离/普氏距离及显著性比较（基于 10 000 次重复）

Table 2　Shape difference of wing of three biting midges based on the Mahalanobis distance/ Procrustes distance and significant test (based on 10 000 permutation rounds)

	刺螯库蠓 *C. punctatus*	灰黑库蠓 *C. pulicaris*	新替库蠓 *C. newsteadi*	刺螯库蠓 *C. punctatus*
	马氏距离 Mahalanobis		普氏距离 Procrustes	
灰黑库蠓 *C. pulicaris*	3.712 9 (<0.000 1)		0.028 7 (<0.000 1)	0.029 9 (<0.000 1)
新替库蠓 *C. newsteadi*	3.281 3 (<0.000 1)	4.501 3 (<0.000 1)		0.012 7 (0.043 9)

（表 2）和普氏距离及其 *P* 值比较（表 2）可知，3 种库蠓两两之间翅形态比较均有显著差异（$P<0.05$）。

2.3　3 种库蠓翅的聚类分析

利用翅的平均形态数据对 3 种库蠓进行聚类分析，比较其翅型、翅脉的相似性关系（图 5）。由图 5 可知，在距离系数为 0.03 时，3 种库蠓聚为 2 组，灰黑库蠓单独为一组，而刺螯库蠓和新替库蠓为一组，表明这两个种类的形态相似度较高，该结果与 PCA 分析所得结果一致。

3　讨论

本研究中刺螯库蠓 *C. punctatus*、灰黑库蠓

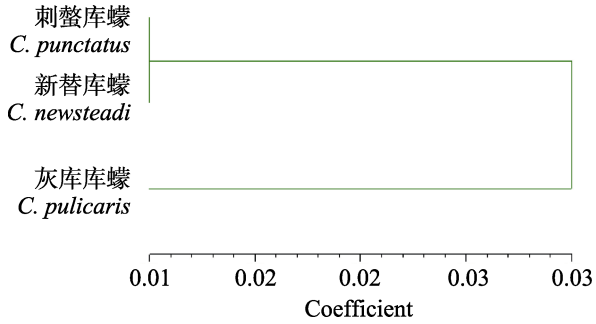

图 5 基于普氏距离的 3 种库蠓翅形态聚类分析

Fig. 5 Phenetic tree of the studied populations of wing of three biting midges based on the Procrustes distance

C. pulicaris 和新替库蠓 *C. newsteadi* 不仅翅极为相似，而且雄虫外生殖器的形态也极难区分。因此，运用几何形态学方法对上述 3 种库蠓翅的形态变化进行了定量分析且存在明显差异，表明库蠓翅的形态变化可作为种间分类和进化研究的依据，几何形态学能够有效地进行库蠓分类，实现种类鉴定。与传统分类方法相比，几何形态学能够有效去除样本个体的非形变因素，如大小、方向等，形成样本自身的构象（Configuration），实现形状的数字化，着眼于对形状自身的比较，将形态变化中的形状因素与大小因素相分离，通过少数几个变量，抓住由地标点坐标所提供的形状信息，能很好地解释生物体形状和大小的变异以及协同变异，能更精确地辨别样本间的细小差异（Mitteroecker *et al.*，2009；Bai *et al.*，2010）。这不仅给分类上的近缘类群提供了一个新方法（Kaliontzopoulou *et al.*，2007），也为蠓科昆虫的研究提供了一个新思路。

本研究的 PCA 结果中刺螯库蠓和新替库蠓在翅形态上最为接近，两者分别与灰黑库蠓有较明显的差异，此结果与 3 种库蠓翅的聚类分析结果一致，与文献中的表型树结果也相符（Muñoz-Muñoz *et al.*，2011）。薄板样条分析图表明，3 种库蠓翅的主要差异集中在径中横脉、径室区、翅基部及翅端部区域，从翅功能上分析，飞行中翅的主要着力区域是径室区域，且从翅基部到翅端部，翅膜厚度逐渐减少，翅膜较厚区域即翅基部也是飞翔中的主要着力区（张晶晶等，2011）。因此，刺螯库蠓、灰黑库蠓及新替库蠓三者飞行能力及行为的差异可能是造成其翅形差异的重要原因，有待进一步深入研究。

由于库蠓属的雄虫标本不易获得，且蠓虫标本片制作过程复杂、专业要求高、盖片后易变形等，尚未采用雄虫尾器特征进行几何形态学分析，希望在今后的研究中将该方法用于雄虫尾器或其它分类特征。同时，几何形态学在蠓科昆虫研究中具有广阔的应用前景，可与分子生物学方法相结合实现快速、准确的蠓科昆虫分类鉴定。

致谢：中国科学院动物研究所张润志研究员和杨星科研究员所在的研究组为本研究提供了研究平台、软件分析等技术支持，在此表示诚挚的感谢！

参考文献（**References**）

Bai M, Jarvis K, Wang SY, Song KQ, Wang YP, Wang ZL, Li WZ, Wang XK, 2010. A second new species of ice crawlersfrom China (Insecta: Grylloblattodea), with thorax evolution andthe prediction of potential distribution. *PLoS ONE*, 5(9): e12850.

Bubliy OA, Tcheslavskaia KS, Kulikov AM, Lazebny OE, MitrofanovVG, 2008. Variation of wing shape in the *Drosophila virilis* species group (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(1): 38–47.

Bai Y, Dai DF, Bao KO, Qiu AN, Liang RJ, Wang HR, 2015. Usinggeometric morphometrics to quantify the sexual dimorphism of *Pantala flavescens*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 363–369. [白义, 戴董峰, 包克瓯, 邱安妮, 梁仁杰, 王海瑞, 2015. 基于几何形态测量学的黄蜻翅的雌雄二态性研究. 应用昆虫学报, 52(2): 363–369.]

Chang QQ, Duan C, Han XJ, Xu ZY, Hou XH, 2017. Survey of blood sucking midges from Suiyang county, Guizhou province, China. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 28(2): 133–135. [常琼琼, 段琛, 韩晓静, 徐宗意, 侯晓晖, 2017. 贵州省绥阳县吸血蠓类的调查研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 28(2): 133–135.]

Hajd L, Sauvage F, Ninio C, Depaquit J, Augot D, 2014. Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides) in France. *Infection, Genetics and Evolution*, 21(1): 110–117.

Hoffmann B, Mehlhorn H, Beer M, Clausen PH, Schaub GA, Kiel E,

Werner D, Liebisch G, Liebisch A, Geier M, Bauer C, Bauer B, Gethmann JM, Batza HJ, Conraths FJ, 2009. Largescale monitoring of putativevectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *EmergInfect Dis.*, 15(9): 1481–1484.

Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Llorente GA, 2007. Multivariate and geometric morphometrics in the analysisof sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *Journal of Morphology*, 268(2): 152–165.

LI L, Dang HY, Ding SY, Zhan QB, Gao LL, Ma RY, Zhao ZG, Zhang LJ, 2017. A preliminary geometric morphometric analysis of wing shapevariation among three important species of the genus *Bactrocera*(Diptere: Tephritidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(1): 84–91. [李玲, 党海燕, 丁三寅, 詹庆斌, 高玲玲, 马瑞燕, 赵志国, 张利军, 2017. 基于几何形态学对三种实蝇翅脉形态分析 (Diptere: Tephritidae: *Bactrocera*). 应用昆虫学报, 54(1): 84–91.]

Mitteroecker P, Gunz P, 2009. Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2): 235–247.

Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Pagès N, 2011. Geometric morphometrics of the wing in the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): from practical implications to evolutionary interpretations. *Journal of Medical Entomology*, 48(2): 129–139.

Tong YJ, Yang HD, Ma DY, Bai M, 2016. Geometric morphometrics evaluation and adaptive evolution study ofscarabaeine metendosternites. *Acta Entomologica Sinica*, 59(8) : 871–879. [佟一杰, 杨海东, 马德英, 白明, 2016. 蜣螂后胸叉骨的几何形态学分析及其适应进化研究. 昆虫学报, 59(8): 871–879.]

Villemant C, Simbolotti G, Kenis M, 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling speciesusing geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, 32(4): 625–634.

Wang FP, Huang EJ, Cai HZ, Gao B, Wang GH, 2010. Bloodsucking midges and midge-borne diseases. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1270–1273. [王飞鹏, 黄恩炯, 蔡亨忠, 高博, 王光辉, 2010. 吸血蠓及其传播的疾病. 昆虫知识, 47(6): 1270–1273.]

Zhang JJ, Bai Y, Wang GH, 2014. Using geometric morphometrics techniques to analyze wing variation of common dragonflies. *Journal of Ningxia University* (*Natural Science Edition*), 35(1): 66–70. [张晶晶, 白义, 王贵虎, 2014. 基于几何形态测量学的几种蜻蜓翅的形态分析. 宁夏大学学报, 35(1): 66–70.]