

臺灣產五種常見蚊蟲異構酶組型之研究

第一報 酯酶及乳酸去氫酶之組型

蔡 在 壽*

摘 要

與日本腦炎傳佈有關，於實驗室中培育數年之五種臺灣產蚊蟲，三斑家蚊、鹹水家蚊、環紋家蚊、熱帶家蚊及白腹叢蚊，以聚丙烯酰胺膠體電泳法分析其第四齡幼蟲，蛹及成蟲期酯酶 (esterase) 及乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase) 之異構酶組型，發現該兩種酶之活性於第四齡幼蟲期最高，於蛹及成蟲期則減弱。

酯酶異構酶之組型相當複雜，各蚊種均有其特異性；即使同一蚊種，其組型亦隨發育時期之不同而發生變化；三斑家蚊更具雌雄性別不同之組型。

乳酸去氫酶之組型較單純，唯大異於哺乳類之此酶組型。該酶亦具種之特異性，然三斑家蚊、鹹水家蚊及環紋家蚊第四齡幼蟲期組型之相似性，顯示歸屬同一族 (series) 之蚊蟲，不但形態類似，在生化學上或許亦具相似性。

緒 言

不同種或不同品系之蚊蟲，於不同發育時期，甚至不同器官，其所含之可溶性蛋白質 (soluble proteins)，均有特異性 (specificity) 存在 (Chen, 1967; Warren & Breland, 1969; Desowitz, 1969; Kimura *et al.*, 1971; Lunt, 1976; 1977; 1979; Igbokwe *et al.*, 1978a, b; Igbokwe, 1979)。某些昆蟲，如果蠅和蚊蟲，於不同種類、器官、性別，酶亦出現多型性 (polymorphism) (Dickinson & Sullivan, 1975; Freyvogel, 1968)。有關蚊蟲酯酶 (esterase) 異構酶之研究論文頗多，其中涉及該酶於發育期之變化者，首見於 Simon (1969) 及 Briegel 和 Freyvogel (1971) 之論文中，而其他種酶之探討則較少見。

臺灣產蚊蟲有 14 屬，計約有 130 種 (連日清, 1978)。其中，瘧蚊之形態、生態和防治，被研究地相當詳細；有關媒介日本腦炎之蚊蟲生態和季節消長，連等人也曾加以調查。同一報告指出，臺灣地區媒介日本腦炎之蚊蟲，主要為三斑家蚊 (*Culex tritaeniorhynchus summosus* Dyar)、環紋家蚊 (*Culex annulus* Theobald) 及白頭家蚊 (*Culex fascocephala* Theobald)。此外，尚未被視為病媒，但經實驗證實可感染或可經由卵傳播日本腦炎病

毒給下一代的蚊蟲，有熱帶家蚊 (*Culex pipiens fatigans* Wiedemann) (Hodes, 1946; Reeves and Hammon, 1946) 及白腹叢蚊 (*Armigeres subalbatus* (Coquillett)) (Lien, 1980)。鹹水家蚊 (*Culex sitiens* Wiedemann) 在分類上與三斑家蚊和環紋家蚊同屬 *Culex sitiens* series，喜吸食鳥及豬血 (Colless 1959)，故亦有傳播日本腦炎之可能；實際上，且已有傳播日本腦炎病毒之實驗記錄 (Hodes, 1946)。

近年來，有關上述臺灣蚊蟲形態之研究報告僅 Chen (1972) 及 Yan (1977) 兩篇，而以生化方法研究此等蚊蟲，除 McDonald 等人 (1972) 曾探討過數種蚊蟲之可溶性蛋白質外，目前尚未有其他報告。故本文之目的乃利用電泳方法，就分類詳盡之臺灣蚊蟲中，先探討與日本腦炎病毒之傳播有關之五種常見蚊蟲異構酶組型，及其於發育時期之變化，俾便未來研究蚊蟲之族羣遺傳學及抗藥性。

材 料 和 方 法

蚊蟲之培養：

實驗所用之下列五種蚊蟲，多由臺灣省傳染病研究所培育數年乃至十數年，其採集地及採集年代分別為：三斑家蚊 (臺北北投, 1971)；環紋家蚊 (新竹, 1964)；鹹水家蚊 (屏東枋寮, 1979)；熱

* 國立臺灣師範大學生物系

帶家蚊(臺北景美, 1979); 白腹潑蚊(臺東東河, 1968)。

自該所取回之幼蟲, 於昆蟲室中, 以清水培養(鹹水家蚊以 0.5% NaCl 水溶液培育), 每天酌餵酵母粉與豬肝粉(1:1)。生活史之各期皆飼養於室溫 26~28°C, 70~75%相對濕度和 15 小時光照(5:00 am ~8:00 pm)之情況下(AMCA, 1970)。

蚊蟲體液之抽取:

蚊蟲體液之抽取仿 Narang 及 Narang (1975), 唯稍加改變。取 20~25 隻第四齡幼蟲或蛹(24~36 小時), 置蒸餾水中換洗三次; 成蟲(羽化後 24~48 小時, 未曾吸血)則予以麻醉, 分開雌雄性別。稱完重量, 置冰冷之玻璃研磨器內, 加入適量之 0.1 M, pH 7.4 磷酸緩衝液(1 ml/0.1 gm 蚊重), 於 0°C 研磨後, 置冷凍高速離心機中, 以 12,000 g 離心 10 分鐘, 取上澄液做電泳分析。

電泳分析及呈色:

電泳所使用之 polyacrylamide gel, 係依 Davis (1964) 之方法, 並稍加改變。下層膠體濃度為 7.5%, 上層膠體為 4.0%, 電泳槽之緩衝液為 0.05 M, pH 8.3 之 Tris-glycine, 先以 4 mA/tube 之電流通電(pre-run) 30 分鐘後, 另以蚊蟲體液混合於 acrylamide 溶液製成 4% 膠體(sample gel), 加於上層膠體之上, 再以 5 mA/tube 電流電泳 60 分鐘。通電前, 滴入兩滴 0.01% Bromophenol blue 做為追蹤染料(tracking dye)。

電泳後, 膠體之呈色, 酯酶依 de Stordeur (1976) 與 Shaw 等人(1970)之混合方法; 乳酸去氫酶則仿 Shaw 等(1970)之方法。呈色後之膠體, 保存於 methyl alcohol: H₂O: acetic acid=5:5:1 之溶液中。各電泳帶之「相對移動值」(relative mobility, 簡稱 Rmb), 係以 Bromophenol blue 之位置為 1 比較而得。

結 果

本研究係探討臺灣產五種常見蚊蟲體液之酯酶及乳酸去氫酶之可能組型, 所示之結果係經 3~5 次重複試驗而得。染色帶依酶活性之大小分為三級: 染色深而極明顯者為「一級帶」(primary band), 以黑色實線示之; 染色略淺者為「二級帶」(secondary band), 以長虛線示之; 而染色更淡者為

「三級帶」(tertiary band), 以細、短虛線表示。

結果顯示酯酶之酶帶組型, 不論於第四齡幼蟲時期、蛹期, 亦或於成蟲期, 均相當複雜(圖 1~圖 3)。各蚊種間只有少數弱酶帶具相同之 Rmb 值(圖 1, Rmb: 0.62, 0.71, 0.82; 圖 2, 0.22, 0.38, 0.70; 圖 3, 0.30, 0.82), 而大多數酶帶, 尤其呈色深而顯明之「一級帶」, 則於各蚊種間有極大差異。此外, 各蚊種酯酶之組型亦隨發育時期, 而發生或多或少之變化(圖 4)。其改變之方式有酶帶的消失(圖 4, A~E), 有的只是酶帶的活性減弱而已(圖 4, C: Rmb=0.35; 圖 4, E: 0.32)。大抵觀之, 酯酶之活性於第四齡幼蟲期最高, 蛹及成蟲時期則降低; 有的酶帶甚至只見於其中之一時期(圖 4, 標示 l, p, a 者)。除鹹水家蚊(Cs)外, 多數蚊種之一級帶均出現於其發育之三個月時期, 而最特殊的是三斑家蚊具雌雄二型性(sex dimorphism)(圖 3, Ct)。

乳酸去氫酶之組型, 於該五種蚊蟲之各時期均極單純(圖 5~8), 只含 1~4 條酶帶, 以熱帶家蚊(Cf)之活性最低(圖 5、6、7, Cf)。自發育時期之酶圖觀之, 該酶之活性仍於第四齡幼蟲期最高, 而 Ct, Cs 及 Ca 三蚊種之主酶帶只有活性之改變(圖 8, A: Rmb=0.51; B: Rmb=0.52; C: Rmb=0.42)。該酶於成蟲期之雌雄個體, 並未出現性別不同之組型(圖 7)。

然而, 自第四齡幼蟲期乳酸去氫酶之組型看, Ct, Cs 及 Ca 三蚊種顯然具有極類似之組型(圖 5)。

討 論

於蚊蟲之異構酶中, 酯酶是最早且最廣被研究者。本研究結果顯示, 臺灣產三斑家蚊等五種蚊蟲, 於不同之發育時期, 均具不同之酯酶組型; 該酶之組型亦隨發育時期發生變化, 三斑家蚊更表現出不同性別之組型。這些現象於 Briegel 及 Freyvogel (1971) 和 Simon (1969) 從事熱帶家蚊酯酶之研究中亦曾發現之, 而 Kreutzer (1979) 於 *Culex erraticus* 之研究中亦證實; 唯 Simon (1969) 所稱熱帶家蚊成蟲之酯酶具雌雄二型性的現象, 於 Briegel 等人(1972)及本實驗中, 研究同一蚊種之結果均未發現。這種同一種蚊蟲却出現不同酶組

ESTERASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES
AT FOURTH INSTAR LARVAL STAGE

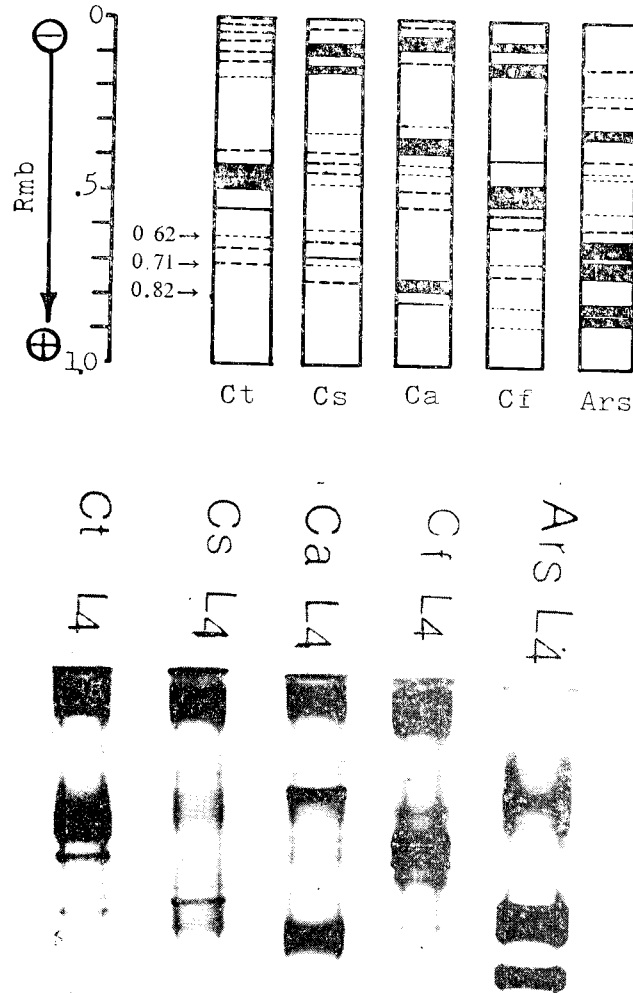


圖 1 五種常見蚊蟲第四齡幼蟲期酯酶異構酶之組型
 Ct: *Culex tritaeniorhynchus* (三斑家蚊)
 Cs: *Culex sitiens* (鹹水家蚊)
 Ca: *Culex annulus* (環紋家蚊)
 Cf: *Culex fatigans* (熱帶家蚊)
 Ars: *Annigeres subalbatus* (白腹叢蚊)

ESTERASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES
AT PUPAL STAGE

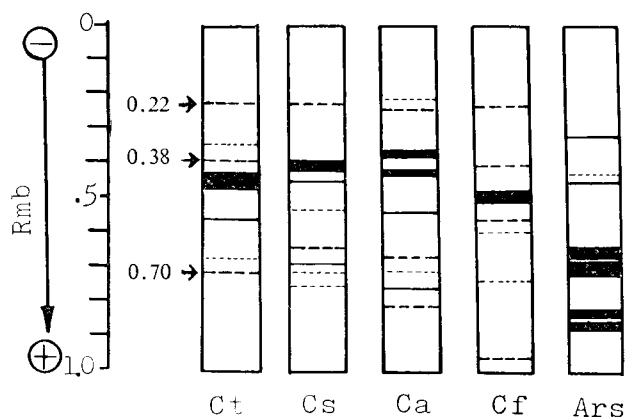


圖 2 五種常見蚊蟲蛹期之酯酶異構酶組型

ESTERASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES
AT ADULT STAGE

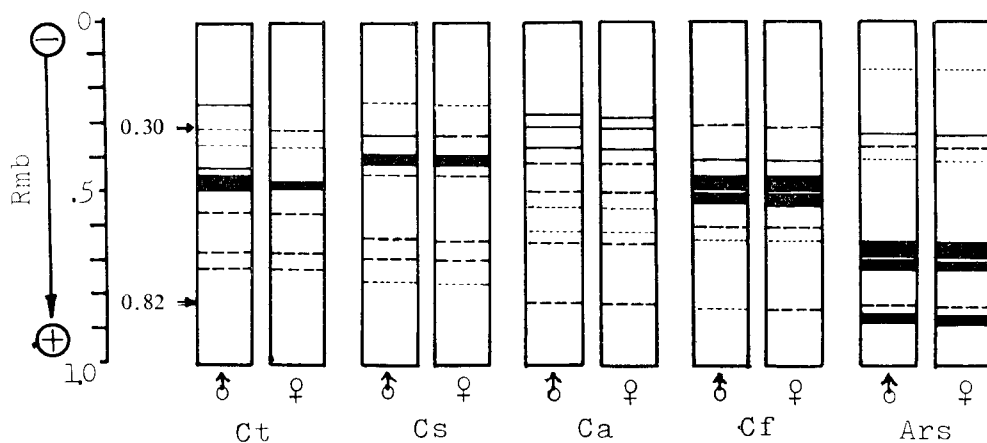


圖 3 五種常見蚊蟲成蟲期之酯酶異構酶組型

DEVELOPMENTAL CHANGES OF ESTERASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES

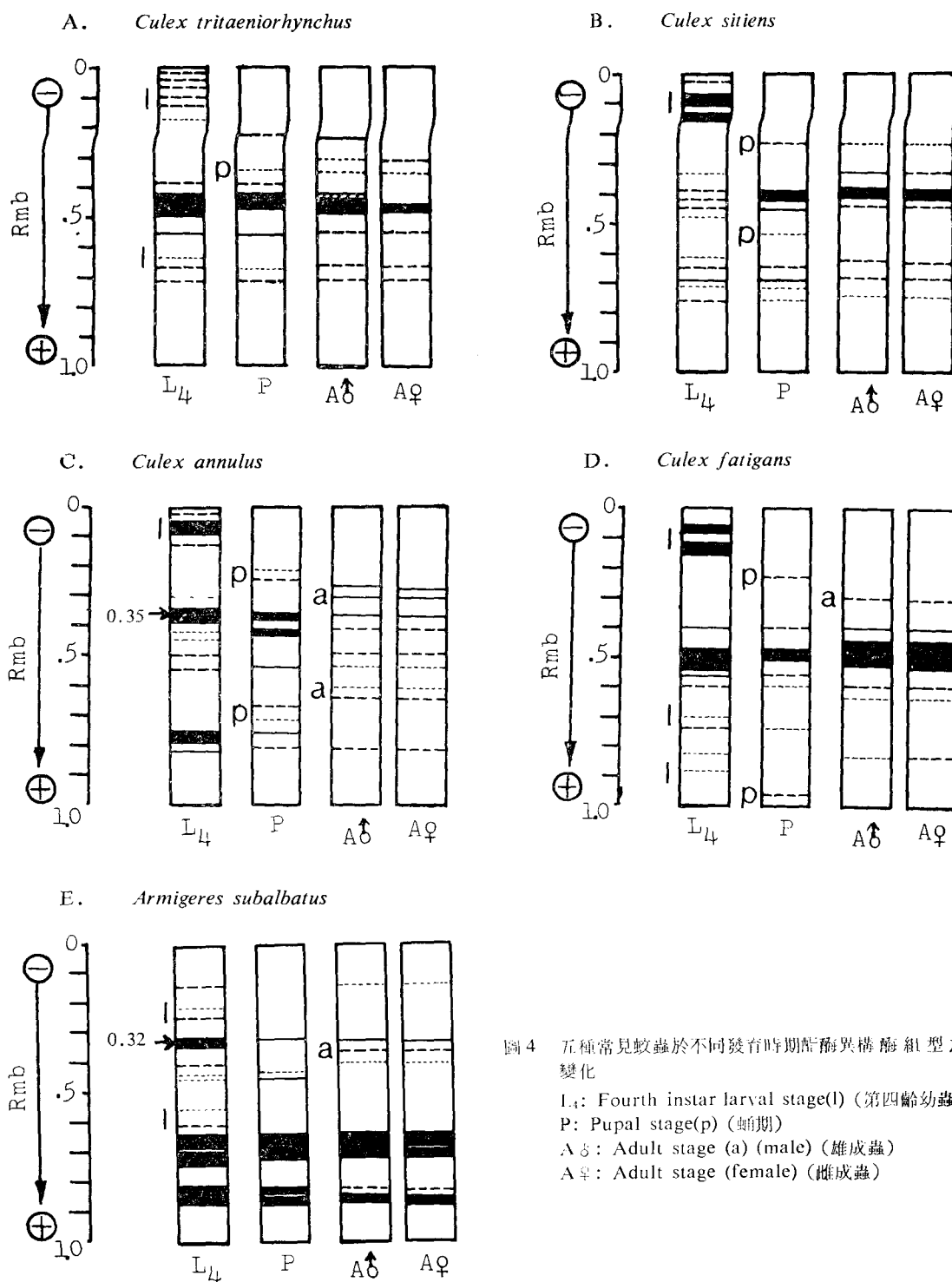


圖4 五種常見蚊蟲於不同發育時期酯酶異構酶組型之變化

L₄: Fourth instar larval stage(l) (第四齡幼蟲)

P: Pupal stage(p) (蛹期)

A♂: Adult stage (a) (male) (雄成蟲)

A♀: Adult stage (a) (female) (雌成蟲)

LACTATE DEHYDROGENASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES
OF MOSQUITOES AT FOURTH INSTAR LARVAL STAGE

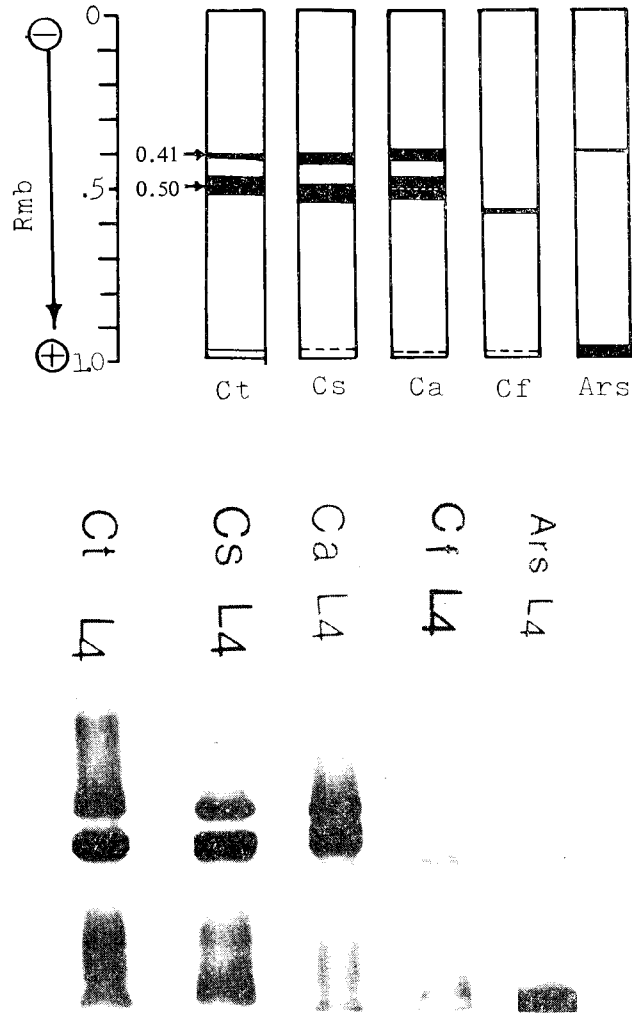


圖 5 五種常見蚊蟲第四齡幼蟲期乳酸去氫酶之組型

Ct: *Culex tritaeniorhynchus* (三斑家蚊)

Cs: *Culex sitiens* (鹹水家蚊)

Ca: *Culex annulus* (環紋家蚊)

Cf: *Culex fatigans* (熱帶家蚊)

Ars: *Armigeres subalbatus* (白腹叢蚊)

LACTATE DEHYDROGENASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES AT PUPAL STAGE

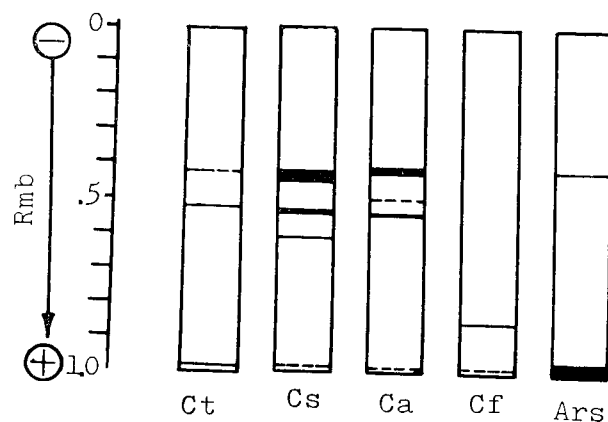


圖6 五種常見蚊蟲蛹期乳酸去氫酶之組型

LACTATE DEHYDROGENASE ZYMOGRAMS OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES AT ADULT STAGE

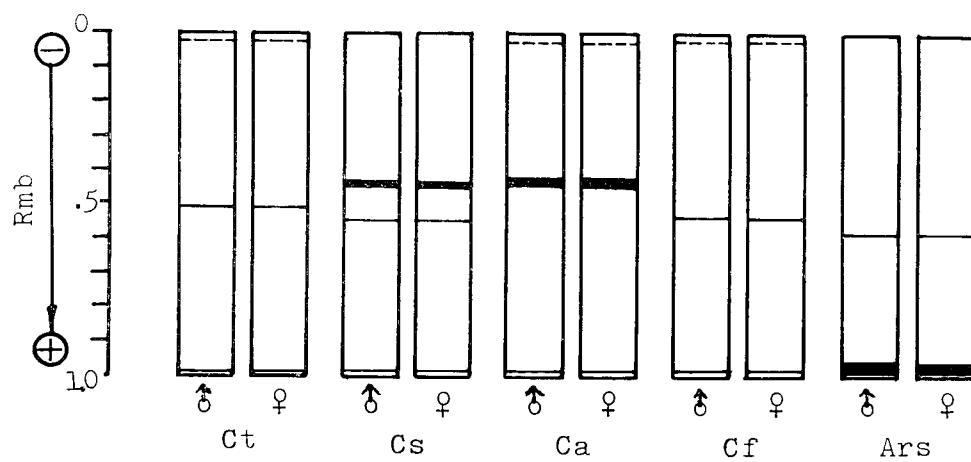


圖7 五種常見蚊蟲成蟲期乳酸去氫酶之組型

DEVELOPMENTAL CHANGES OF LACTATE DEHYDROGENASE ZYMOGRAMS
OF FIVE COMMON SPECIES OF MOSQUITOES

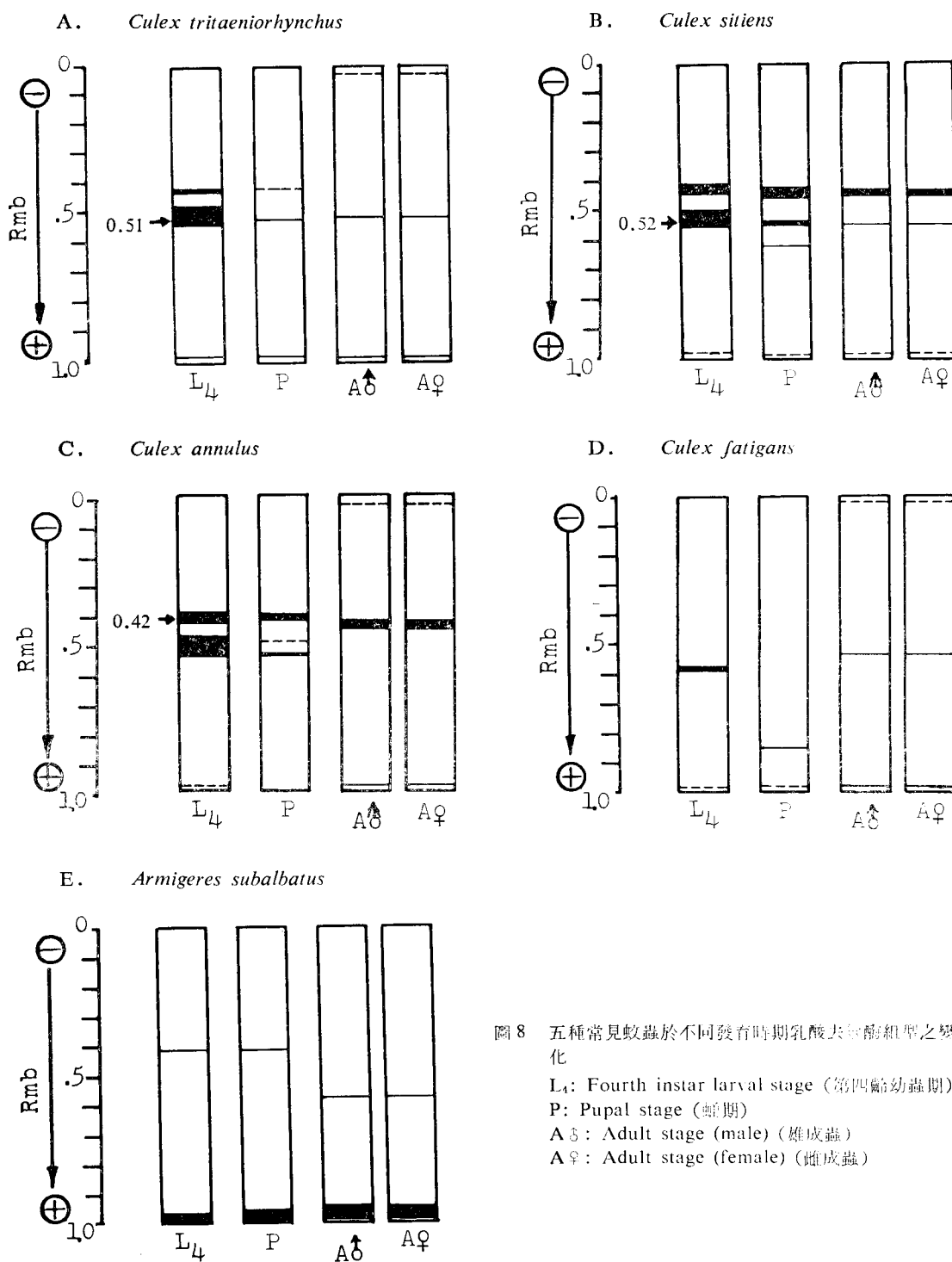


圖 8 五種常見蚊蟲於不同發育時期乳酸去氫酶組型之變化

L₄: Fourth instar larval stage (第四齡幼蟲期)

P: Pupal stage (蛹期)

A♂: Adult stage (male) (雄成蟲)

A♀: Adult stage (female) (雌成蟲)

型之現象，或許因使用電泳方法及地理分佈不同所致 (Bullini and Colluzzi, 1972)，因為「種內差異性」(intra-species difference) 確存在於許多昆蟲中 (Wagner and Selender, 1974)。

Simon 及 Freyvogel 等之報告也指出，大多數蚊蟲自第一至第四齡幼蟲期之間，並無新的酶帶出現；Simon 及 Geering 等人 (1975) 也曾分別指出成蟲期之酯酶組型，隨年齡和吸血情況而發生變化。因此本實驗乃捨棄前三齡幼蟲而獨採用第四齡幼蟲，且對成蟲之羽化時間及吸血加以控制。

由於酯酶具廣泛之受質專一性 (substrate specificity)，其於蚊蟲又受 4~6 個基因座 (gene loci) 之控制 (Steiner and Joslyn, 1979)，故組型極為複雜。特異性酯酶 (specific esterase) 常用於蚊蟲抗藥性 (及 Georghiou and Pasteur, 1978) 及遺傳學 (deStordeur, 1976; Garnett, et al., 1971; Kreutzer, 1979; Ramabrahman et al., 1979; Townson, 1971)，唯本文乃在探討蚊蟲之非特異性酯酶之組型，雖未涉及特異性酯酶，然藉其複雜且明顯不同之組型，可分辨出不同蚊種而做為分類之參考。

哺乳類之乳酸去氫酶 (LDH)，已被研究詳盡，證實其含五種異構酶且依發育時期而變化 (Fine et al., 1963)。於蚊蟲中，該酶之研究至今仍鮮有報導。據 Trebatoski 及 Haynes (1969) 稱 *Aedes* 蚊蟲具三酶帶，而 *Culex pipiens* 則無酶帶出現，本研究結果發現 *Culex* 蚊蟲均具二~三條酶帶，顯然不同於 Trebatoski 兩人之研究結果。

Townson 等 (1977) 之報告亦指出 *Aedes scutellaris* 族中，LDH 於不同品系 (strain) 具不同組型。Barnes 等 (1977) 比較 *Aedes aegypti* 之整隻與分段個體，其 LDH 有量而無質之差異，且與哺乳類一樣亦具五條依序之酶帶。本研究結果，五種蚊蟲之 LDH 雖有種及發育時期之特異性，然其活性多偏低，且無依序之酶帶出現，顯然大異於哺乳類之 LDH。又 Ved Brat 及 Whitt (1974) 指出 *Anopheles albimanus* 於羽化後，其 LDH 量有升高現象，此又異於本文之結果。故於發育過程中，控制蚊蟲 LDH 合成之基因表現，可能因種且因時而異，其詳細機制尚待研究。

自該五種蚊蟲第四齡幼蟲期 LDH 組型來看，熱帶家蚊與白腹叢蚊迥異於前三種蚊，由此或可提

供部份生化證據以印證三斑家蚊，鹹水家蚊及環紋家蚊同屬 *Culex sitiens* series 之說法 (Lien, 1980)。可見相近種蚊蟲之酶組型，定有類似之處，至於何種酶具相似之組型，則有待探討多種酶或特異性酯酶後，始能解答。

三斑家蚊成蟲出現性別不同之酯酶組型，其原因是否如 Green (1977) 所稱，係由於雄蚊之副腺 (accessory gland) 含決定性別之酯酶所致，尚未可知，須詳細解剖器官分析酯酶來確認。

總之，本結果只限於研究實驗室內培育多年之蚊蟲，至於野生自然族羣之酶組型如何，以及其組型與實驗室培養種之差異情形如何，均有待來年進一步之探求。

致 謝

本研究承吾師連日清博士之悉心指導，本系主任史金燾先生之支持，諸亞儂、劉慕昭兩位教授之鼓勵，童武夫教授之詳閱初稿，以及鄭湧涇先生多方之協助，始克完成，謹致衷心謝忱。

參 考 文 獻

1. 連日清, 1978。本省產蚊蟲生態及其防治。中央研究院「昆蟲生態與防治研討會」講稿集, 37~69 頁。
2. American Mosquito Control Association, 1970. Manual for rearing mosquitoes.
3. BARNES, C. S., CUPP, E. W., and TOOM, P. M. 1977. Lactate dehydrogenase isoenzymes in *Aedes aegypti*. Insect Biochem. 7: 387-391.
4. BRIEGEL, H., and FREYVOGEL, T. A. 1971. Non-specific esterase during development of culicine mosquitoes. Acta Tropica 28: 291-297.
5. BULLINI, L., COLUZZI, M., BIANCHI BULLINI, A. P., and RENNA, L. 1972. Stability of frequencies of phosphoglucumutase alleles in *Culex pipiens* breeding in ecologically different environments. (Abstract).
6. CHEN, C. Y. 1972. Studies on morphology of the cibarium in culicine mosquitoes common in the Taipei area, Taiwan. Formosan Med. Asso. J. 71: 282-291.
7. CHEN, P. S. 1967. Electrophoretic patterns of larval hemolymph-proteins in autogenous and anautogenous forms of *Culex pipiens* L. Nature 215: 316-317.
8. COLLESS, D. H. 1959. Notes on the culicine mosquitoes of Singapore. VII. Host preference in relation to the transmission of disease. Ann Trop. Med. Parasit. 53: 259-267.

9. DAVIS, B. J. and ORNSTEIN, I. 1964. Procedures for disc electrophoresis of anionic gels. *Ann. N. Y. Acad.* **121**: 404-406.
10. DESOWITZ, R. S. 1969. Developmental changes in the protein constitution of a mosquito, *Armigeres subalbatus* as revealed by disc electrophoresis. *J. Parasitol.* **55**: 476.
11. de STORDEUR, E. 1976. Esterases in the mosquito, *Culex pipiens pipiens* L.: Formal genetics and polymorphism of adult esterase. *Biochem. Genet.* **14**: 481-493.
12. DICKINSON, W. J., and SULLIVAN, D. T. 1975. Gene-enzyme system in *Drosophila*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
13. FINE, I. H., KAPLAN, N. O., and KUFTINE, D. 1963. Developmental changes in mammalian lactic dehydrogenase. *Biochem.* **2**: 116-121.
14. FREYVOGEL, T. A., HUNTER, R. L., and SMITH, E. M. 1968. Non-specific esterases in mosquitoes. *J. Histochem. Cytochem.* **16**: 765-790.
15. GARNETT, P. and FRENCH, W. L. 1971. A genetic study of an esterase in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Mosquito News* **31**: 379-386.
16. GEERING, K. and OBERLIN, U. P. 1975. The-esterase PATTERNS in ovaries and the embryonated eggs of *Aedes aegypti* L. *Acta. Trop.* **32**: 48-56.
17. GEORGHIOU, G. P., and PASTEUR, N. 1978. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* **71**: 201-205.
18. GREEN, C. A. 1977. A sex-limited esterase in the accessory glands of males of *Anopheles funestus*. *Mosq. News* **37**: 46-48.
19. HODES, H. L. 1946. Experimental transmission of Japanese B encephalitis by mosquitoes and mosquito larvae. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **79**: 358-360.
20. IGBOKWE, E. C., and DOWNE, A. E. R. 1978a. Differential electrophoretic behavior among strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **14**: 662-665.
21. IGBOKWE, E. C., and DOWNE, A. E. R. 1978b. Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.* **60B**: 131-136.
22. IGBOKWE, E. C. 1979. Numerical electrophoretic analysis and the behavior of larval proteins among *Aedes* mosquitoes. *Can. J. Zool.* **57**: 979-982.
23. KIMURA, T., YOSHII, A., and TIPTON, V. J. 1971. Disc-electrophoretic analysis of some members of the *Culex pipiens* complex. *J. Med. Entomol.* **8**: 1-6.
24. KREUTZER, R. D. 1979. Esterase isozymes in the mosquito *Culex (Melanoconion) erraticus*. *Mosq. News* **39**: 500-505.
25. LIEN, J. C. 1980. Personal communication and unpublished information.
26. LUNT, S. R. 1976. Protein bands studies of fourth instar larvae in the *Aedes varipalpus* group. *Mosq. System.* **8**: 200-204.
27. LUNT, S. R. 1977. Protein band studies of the subspecies in the *Aedes atropalpus* group. *Mosq. News* **37**: 470-473.
28. LUNT, S. R. 1979. The use of electrophoresis in a taxonomic study of the *Aedes varipalpus* group. *Mosq. System.* **11**: 278-279.
29. McDONALD, J. L., Tang, F., and Cross, J. H. 1972. Preliminary observations on the use of electrophoresis for separating and identifying several genera and species of Taiwanese mosquitoes. *Mosq. News* **32**: 1-5.
30. NARANG, S., and NARANG, N. 1975. Malate dehydrogenase of a mosquito, *Culex p. quinquefasciatus*: Developmental changes, polymorphism and physio-chemical characterization. *Biochem. Genet.* **13**: 73-84.
31. RAMABRAHMAN, P., and SUBRAHMANYAM, D. 1979. Choline esterase of *Culex pipiens fatigans*. *Insect Biochem.* **9**: 315-322.
32. REEVES, W. C., and HAMMON, W. Mcd. 1946. Laboratory transmission of Japanese B encephalitis virus by seven species (three genera) of North American mosquitoes. *J. Exp. Med.* **83**: 185-194.
33. SHAW, C. R., and PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzyme—A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* **4**: 297-320.
34. SIMON, J. B. 1969. Esterase isozymes in the mosquito, *Culex pipiens fatigans*, developmental and genetic variation. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **62**: 1307-1311.
35. STEINER, W. W. M., and JOSLYN, D. J. 1979. Electrophoretic techniques for the genetic study of Mosquitoes. *Mosq. News* **39**: 35-54.
36. TOWNSON, H., MEREDITH, S. E. O., and Thomas, K. 1977. Studies of enzymes in the *Aedes scutellaris* group. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**: 110.
37. TREBATOSKI, A. M., and HAYNES, J. F. 1969. Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **62**: 327-335.
38. VEDBRAT, S. S., and WHITT, G. S. 1974. Lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene expression during ontogeny of the mosquito (*Anopheles albimanus*). *J. Exp. Zool.* **187**: 135-140.
39. WAGNER, R. P., and SELANDER, R. K. 1974. Isozymes in insects and their significance. *Ann. Rev. Entomol.* **19**: 117-138.
40. WARREN, M. E., and BRELAND, O. P. 1969. Electrophoretic patterns in mosquitoes. *Mosq. News* **29**: 172-182.

41. YAN, S.L. 1977. External structures of all larval instars of five common *Culex* species in Taiwan. Chinese J. Microbiol. 10: 80-86.

**Preliminary Studies on Isozyme Patterns of Five Common
Species of Mosquitoes in Taiwan
Part (I). Esterase and Lactate Dehydrogenase**

TZAY-SHOW TSAI

Department of Biology, National Taiwan Normal University

ABSTRACT

Esterase and lactate dehydrogenase (LDH) isozyme patterns were studied from five common species of laboratory colony culicine mosquitoes, may be involved in transmission of Japanese B encephalitis. By using 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis, the zymograms proved to be species-specific, and changed during development. Sex dimorphism was shown to occur in the esterase zymogram of one species, *Culex tritaeniorhynchus summosus*. The enzyme activity was the highest at the fourth instar larval stage and decreased at pupal and adult stages.

Zymograms of lactate dehydrogenase of 3 species, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex sitiens*, *Culex annulus*, were also shown to be very similar at 4th instar larval stage. This similarity of LDH isozyme patterns may provide biochemical evidence to support the classification system which classifies them into the *Culex sitiens* series in Culicinae (Diptera: Culicidae).