

速生薄口螨休眠体的形态和分子特征鉴定

许薇¹, 朱志伟², 孙恩涛², 赵金红¹

(1. 皖南医学院基础医学院, 安徽 芜湖 214002;

2. 皖南医学院检验学院, 安徽 芜湖 214002)

摘要:目的 通过形态和分子特征鉴定速生薄口螨休眠体。方法 从采集到的生姜样本中分离出速生薄口螨休眠体, 分别在光镜和扫描电镜下观察其外部形态和超微形态并进行拍照鉴定。同时提取基因组DNA对 *cox1* 和 ITS 基因进行测序和分析。结果 速生薄口螨休眠体足4对, 背面躯体呈扁平状, 表皮骨化, 前足体呈三角状, 足三表皮内突相连, 形成一条拱线, 分隔开胸板和腹板。足爪和前附节发达, 有刚毛附着, 躯体末端吸盘板发达, 板上有八个吸盘呈2-4-2分布。经PCR扩增得到 *cox1* 基因片段大小为487 bp, ITS全序列长度为1667 bp。结论 根据光镜和电镜下速生薄口螨休眠体的形态, 结合 *cox1* 和 ITS 基因序列, 为速生薄口螨休眠体的鉴定和生物学分类提供了依据, 也可为控制速生薄口螨及其引起的过敏性疾病奠定基础。

关键词:速生薄口螨; 休眠体; 外部形态; 分子特征

中图分类号: R384.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2019)03-0246-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.03.002

Identification of morphological and molecular characteristics of *Histiostoma feroniarum* hypopus

Xu Wei¹, Zhu Zhiwei², Sun Entao², Zhao Jinhong¹

(1. School of Basic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;

2. School of Medical Laboratory Science, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To identify *Histiostoma feroniarum* hypopus according to the morphological and molecular characteristics. **Methods** The *Histiostoma feroniarum* hypopus was isolated from the collected ginger samples, and its external morphology and ultrastructure were observed under light microscope and scanning electron microscope, and photographed for identification. Meanwhile, genomic DNA was extracted for sequencing and analysis of *cox1* and ITS genes. **Results** The *Histiostoma feroniarum* hypopus was composed of 4 pairs of feet, the dorsal body was flat, the the epidermis was of significant ossification, the forefoot body was triangular, and the epidermal processes of foot III were connected to form an arch line separating the thoracic plate from the abdominal plate. The foot claw and anterior tarsus were developed, there were bristles attached, the sucker plate at the end of the body was developed, and there were eight suckers on the plate with 2-4-2 distribution. The size of *cox1* gene fragment obtained by PCR amplification was 487 bp, and the total sequence length of ITS was 1667 bp. **Conclusion** The morphology of the *Histiostoma feroniarum* hypopus under light microscope and electron microscope combined with the *cox1* and ITS gene sequences provide a basis for the identification and biological classification of the *Histiostoma feroniarum* hypopus and also lay a foundation for the control of the *Histiostoma feroniarum* hypopus and allergic diseases caused by it.

Key words: *Histiostoma feroniarum*; hypopus; external morphology; molecular characteristics

速生薄口螨 (*Histiostoma feroniarum*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、蛛形纲 (Arachnida)、蜱螨亚纲 (Acari)、真螨总目 (Acariformes)、疥螨目 (Sarcoptiformes)、无气门股 (Astigmata)、薄口螨科 (*Histiosto-*

midae)、薄口螨属 (*Histiostoma*)。速生薄口螨主要营腐生生活, 喜潮湿腐烂的隐蔽环境, 常在潮湿腐败的食物或液体、半液体上生活。它一方面取食菌丝、子实体, 蛀蚀栽培料, 另一方面又可以携带并传播病原杂

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(1608085MC77);安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016171)

第一作者简介:许薇(1993-),女,在读硕士研究生,研究方向:媒介生物与感染性疾病, E-mail:1606473833@qq.com

通信作者简介:赵金红(1979-),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:媒介生物与感染性疾病, E-mail:jhzhzhao@aliyun.com

菌,对食用菌生产产生双重威胁^[1]。此外,速生薄口螨还可引起人体螨病,危害人体健康^[2]。目前薄口螨科报道的主要有速生薄口螨(*Histiostoma feroniarum*)、吸腐薄口螨(*Histiostoma sapromyzae*)、实验室薄口螨(*Histiostoma laboratorum*)和美丽薄口螨(*Histiostoma pulchrum*)四种,他们的形态尤其是其休眠体的形态非常相似,难以鉴别。分子鉴定是鉴别螨类的一种比较简单并准确的方法。目前对速生薄口螨的研究中,大多建立在光镜下形态特征和生活环境观察上,较少涉及到分子特征的鉴定,目前也尚未见报道速生薄口螨的内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)片段。本研究首先在光镜和扫描电镜下观察速生薄口螨休眠体的外部形态特征,然后对速生薄口螨休眠体的细胞色素氧化酶亚基 1(cytochrome oxidase 1, *cox1*)和 ITS 基因进行扩增和序列分析,为其休眠体的鉴定和生物学分类提供依据,为进一步开展速生薄口螨的种群遗传学研究、物种间亲缘关系和系统进化及害虫防治等提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所采集样本为实验室中储存时间 ≥ 1 年的生姜。主要仪器和试剂:光学显微镜(日本 OLYMPUS, BX-1 型)、扫描电子显微镜(日本 JEOL, JSM-6490LA 型)、解剖镜(中国 MOTIC, ST-39 型)、永久封固剂(蒸馏水 50 ml, 10%水合氯醛 5 ml, 甘油 20 ml, 阿拉伯胶 30 g)、乙醚、无水乙醇、戊二醛、Taq PCR Master Mix、Proteinase K、DNA Polymerase 和 DNA marker DL2000, 购于上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本制作 光镜下,用零号毛笔从生姜样品中挑出螨休眠体,震荡洗涤,整理姿势,封片固定并拍照^[3],根据 Hughes(1976)^[4]方法进行虫种鉴定、分类。同时挑取部分速生薄口螨休眠体,蒸馏水反复多次振荡清洗后,保存在 75%乙醇溶液中用于基因组 DNA 提取。

1.2.2 电镜样本制备 取 2.5%戊二醛固定速生薄口螨休眠体数只,再用 5%醋酸戊酯置换,然后用洁净毛发针整姿并将其固定在覆盖导电双面胶的电镜样品托上,临界点干燥后在电镜下(5~10 kV 加速电压)进行扫描观察,选择清晰图像并拍照。

1.2.3 DNA 提取、引物设计和 PCR 克隆扩增 从单头螨体中提取总 DNA,方法参照温硕洋等^[5],并稍加改动。根据 GenBank 中粉螨亚目的屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, NC_012218.1)、伯氏嗜木螨(*Caloglyphus berlesei*, NC_024637.1)、椭圆食粉螨(*Aleuroglyphus ovatus*, NC_023778.1)、长食酪螨(*Tyrophagus longior*, NC_028725.1)、腐食酪螨(*Tyrophagus putrescentia*, NC_026079.1)的 *cox1* 序列,

利用 DNAMAN 进行比较分析,在保守区设计 *cox1* 兼并引物,序列如下:

COIF: 5'-TTGCDGGKGTWTCTTCTAT-3',
COIR: 5'-ACAGCAATRATAGTAGCAG-3'。

ITS 扩增引物序列如下^[6]:

ITSF: 5'-TGCTTGGGATTGGGGATTGT-3',
ITSR: 5'-GCCTAATACTAACAACGCCG-3'。

引物由通用生物技术有限公司合成。PCR 反应总体积为 25 μ l, 含 2.5 μ l 10 \times Buffer、2.0 μ l MgCl₂ (2.5 μ mol/L)、1.5 μ l dNTPs (2.5 mM/L aech)、上下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ l、100 ng 模板基因组 DNA 和 1 U Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l), 加无菌水补足。PCR 反应参数是:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 46 $^{\circ}$ C~49 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳和 DNA 胶回收试剂盒纯化后, 连接到载体 pMD19-T 上, 转化至大肠杆菌(DH5 α 感受态细胞)中, 通过蓝白斑筛选, 将阳性克隆委托上海生工生物技术有限公司采用 DNA 测序仪(ABI-3730)进行双向测序。

1.2.4 测序与序列分析 目的条带测序工作由通用生物技术有限公司完成。测定序列经过 DNAMAN 软件拼接, 所得序列用 DNASTar 软件中的 EditSeq 编辑, 分析其碱基组成。

2 结果

2.1 速生薄口螨休眠体光镜形态 速生薄口螨休眠体呈扁平状, 向后缘逐渐变尖, 表皮骨化较明显, 前足体呈明显的三角状, 足 III 表皮内突相连形成一条拱形线, 胸板和腹板被这条拱形线分开(图 1A)。躯体腹面末端有十分发达的吸盘板, 其上有八个吸盘, 吸盘呈现 2-4-2 排列。各个足体较长, 后两足向外伸展(图 1B)。

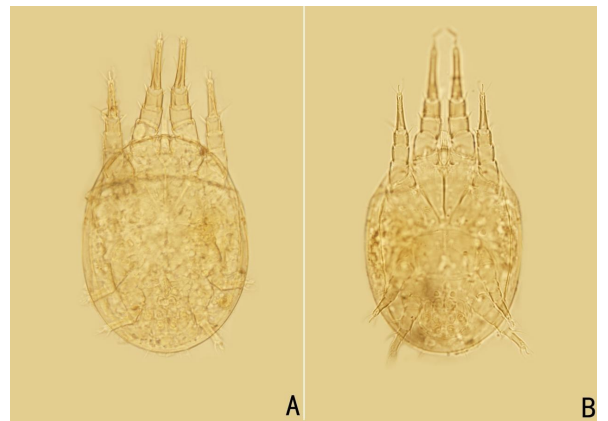


图 1 速生薄口螨休眠体光镜特征结构($\times 1000$)

注: A. 速生薄口螨休眠体背面; B. 速生薄口螨休眠体腹面

2.2 速生薄口螨休眠体电镜形态 速生薄口螨电镜下躯体长约 230 μ m, 足四对(图 2A、图 2B), 前足体呈

三角形,向前由宽而圆变为窄而尖,足爪上有刚毛附着(图2C、图2D、图2E、图2F),躯体表面骨化明显,躯体背面刚毛均为短杆状,刚毛末端无分叉,肛后毛较短(图2A、图2B),躯体腹面生殖区未发育完全,可隐约看到生殖感觉器(图2B、图2I),足Ⅲ、Ⅳ短而粗(图2H),躯体末端可见到明显的吸盘板,吸盘板上共有四对成对的吸盘,呈2-4-2分布,吸盘表面较为光滑(图2G)。

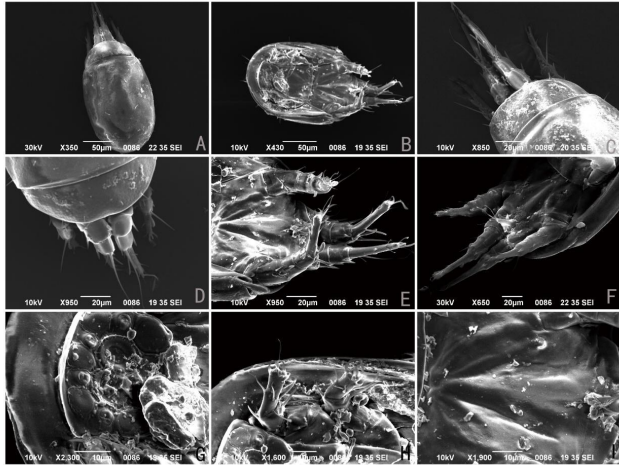


图2 速生薄口螨休眠体的电镜结构特征

注:A.休眠体背面观;B.休眠体腹面观;C.休眠体前足体背面观;D.休眠体前足体侧面观;E.休眠体前足体腹面观;F.休眠体前足体侧面观;G.休眠体腹部吸盘板;H.休眠体后足体;I.休眠体生殖区

2.3 速生薄口螨 *cox1* 扩增结果 速生薄口螨基因组DNA提取后进行PCR扩增,经PCR扩增得到速生薄口螨清晰的*cox1*基因片段扩增产物图,克隆扩增去掉引物后,基因片段大小为487 bp,利用DNAStar软件包的Editseq软件进行分析得出碱基序列A、G、T、C含量分别为21.15%、19.71%、43.74%、15.40%,G+C含量为35.11%,A+T含量为64.89%。与其他几种粉螨亚目中粉螨碱基组成方式较为接近,见表1。所测的速生薄口螨*cox1*片段用BLAST与Genbank中的线粒体DNA序列进行比较,发现速生薄口螨与其它粉螨亚目中粉螨的*cox1*有很高的同源性,其中与腐食酪螨(NC_026079.1)同源性为82.34%,与伯氏嗜木螨(NC_024637.1)同源性为81.31%,与屋尘螨(NC_012218.1)同源性为77.82%,与椭圆食粉螨(NC_023778.1)同源性为79.26%,与长食酪螨(NC_028725.1)同源性为80.90%。

2.4 速生薄口螨 ITS 扩增结果 PCR扩增得到速生薄口螨清晰的ITS基因片段扩增产物图,克隆扩增去掉引物后,全序列长度为1667 bp(MK250038)。利用DNAStar软件包的Editseq软件进行分析得出碱基序列A、G、T、C含量分别为28.97%、21.36%、27.53%、

表1 速生薄口螨与粉螨亚目螨类的*cox1*序列碱基组成

种类名称	A(%)	G(%)	T(%)	C(%)	A+T(%)	Total(bp)
屋尘螨	19.10	20.33	46.00	14.58	65.09	487
伯氏嗜木螨	20.12	17.66	47.02	15.20	67.15	487
椭圆食粉螨	20.12	17.97	45.38	14.78	65.50	487
长食酪螨	20.94	18.28	45.79	14.99	66.74	487
腐食酪螨	21.65	16.84	46.00	16.02	67.15	487
速生薄口螨	21.15	19.71	43.74	15.40	64.89	487

22.14%,G+C含量为43.49%,A+T含量为56.51%。在GenBank中粉螨亚目有两种已明确报道的粉螨ITS全序列,分别为刺足根螨(*Rhizoglyphus echinopus*)和罗宾根螨(*Rhizoglyphus robini*),将所获得速生薄口螨ITS序列片段与其比较碱基组成,发现速生薄口螨(MK250038)与刺足根螨(DQ372567.1)同源性为34.30%,与罗宾根螨(DQ372568.1)同源性为36.10%,其碱基组成方式也十分接近。见表2。

表2 速生薄口螨与粉螨亚目螨类的ITS序列碱基组成

种类名称	A(%)	G(%)	T(%)	C(%)	A+T(%)	Total(bp)
刺足根螨	28.76	19.29	34.32	17.64	63.07	1457
罗宾根螨	26.58	20.94	32.09	20.39	58.68	1452
速生薄口螨	28.97	21.36	27.53	22.14	56.51	1667

3 讨论

速生薄口螨是仓储类害螨的一种,其生长期包括卵、幼螨、若螨、成螨^[7],第一与第三若螨期之间有一个休眠体期。速生薄口螨的休眠体可以孳生在食用菌栽培料中,也可以附着在各种节肢动物身上,借此转移到适合生长的场所^[8],休眠体是该螨生活史中的重要阶段,是借助携带传播者进行传播的特殊形式。段彬彬等^[9]在食用菌中发现了该螨的休眠体,并进行光镜下的形态观察。洪勇等^[10]在储藏洋葱中发现速生薄口螨并对其形态进行观察。柴强等^[11]在中药材生姜中发现了孳生的速生薄口螨并对其形态进行观察。通过光镜进行观察是对速生薄口螨休眠体最简单直接的观察方法,可以清楚了解速生薄口螨休眠体的外部形态特征,但是由于设备的精准度有限,标本的超微结构不容易被观察,借助SEM扫描电镜则可以观察物种的细微结构,可明显观察螨类的表皮、刚毛、吸盘、生殖区的结构特征。故本研究结合扫描电镜和光镜的观察,系统描述了该粉螨休眠体的形态特征,结果发现速生薄口螨休眠体的光镜形态特征与之前的研究相同,而电镜形态特征主要包括:①刚毛:背面刚毛均为短杆状末端无分叉、肛毛较短;②外生殖器:生殖器官未发育完全,未见明显的生殖毛;③足:足4对,足上有刚毛附着,前足体呈三角状,后足体短而粗;④吸盘:躯体末端有三排成对的8个吸盘,吸盘板较光滑。本研究通过光镜和扫描电镜结合观察到的速生薄口螨这些形态特

征,丰富了该螨的形态鉴定、分类等科学资料,为速生薄口螨控制和螨病防治提供了有效的参考。

在遗传进化研究中,*cox1* 是常用的分子标记,在动物分子鉴定以及系统重建过程中具有重要的意义。邓洁等^[12]利用线粒体 *cox1* 基因对印度新曲厉螨 (*Neocypholaelaps indica* Evans) 进行分子鉴定,并做系统发育树和遗传距离分析,发现基于 *cox1* 基因的印度新曲厉螨种内遗传距离和同属新曲厉螨属 (*Neocypholaelaps apicola*) 的种间遗传距离不存在重叠区域,并且种内和种间的遗传距离差异显著,说明 *cox1* 序列可以用于印度新曲厉螨的分子鉴定。吴太葆等^[13]对椭圆食粉螨线粒体 DNA *cox1* 基因片段进行测定,并与其他几种粉螨的 *cox1* 进行比较分析,发现 *cox1* 含较高的 AT 含量是粉螨共同的现象。孔里微^[14]利用 443bp 的线粒体 DNA *cox1* 片段对中国 6 个地理种群的柑橘全爪螨共 305 个个体进行种群遗传结构及遗传多样性研究。本研究成功获得了速生薄口螨的 *cox1* 基因序列。根据来自 GenBank 的数据,比较速生薄口螨和粉螨亚目中其它几种粉螨的 *cox1* 碱基组成,所得速生薄口螨 *cox1* 片段的碱基组成中,A+T 的百分含量占 64.89%,与粉螨亚目其它几种粉螨的碱基组成方式十分接近,说明粉螨亚目螨类的 *cox1* 片段中 AT 含量普遍较高,与粉螨亚目几种粉螨的 *cox1* 序列同源性为 77.82%~82.34%。

ITS 是对粉螨进行发育研究常应用的核基因。真核生物基因组中编码核糖体的基因包括 28S rDNA、5S rDNA、18S rDNA 和 5.8S rDNA 4 种,它们在染色体上头尾相连、串联排列,相互之间由间隔区分隔。其中 18S、5.8S 和 28S rDNA 基因组成一个转录单元,三者高度保守,适合于较高等级水平的生物群体间的系统分析,其间的间隔区为 ITS。Ben 等^[15]利用 rDNA-ITS2 片段将以色列的 16 种叶螨成功地区分开来。邹志文等^[16]对几种钝绥螨进行 ITS 基因片段的序列分析,对其亲缘关系进行分析,对研究其系统发育和完善分类有重要意义。本研究成功获得速生薄口螨的 ITS 基因序列,并且比较了速生薄口螨和粉螨亚目中其它两种粉螨的 ITS 碱基组成,所得速生薄口螨 ITS 片段的碱基组成中,A+T 的含量占 56.51%,与表中所列出的两种粉螨的碱基组成一样 AT 含量较高。而相较于粉螨亚目 *cox1* 序列较大的同源性,不同种间粉螨在 ITS 序列水平上虽然有一定的相似性,但也有一定程度的差异,同科的粉螨如刺足根螨和罗宾根螨则在 ITS 序列水平上相似性很高,说明相较 *cox1* 基因片段而言,ITS 作为分子标记差距较大,适合作为种间鉴定的工具。

本文测定了速生薄口螨核基因 ITS、线粒体基因 *cox1* 片段序列,可以作为速生薄口螨系统发育研究的

分子标记,更准确地探讨速生薄口螨及其与其它粉螨种间的系统进化关系。本文结合光镜和电镜对速生薄口螨休眠体的形态进行细微观察,总结了速生薄口螨休眠体的形态及鉴别要点。电镜拍摄的图片真实、放大倍数高、图像较为清晰,有利于对其进行形态学鉴定,后续也可以推广应用于丰富其他螨类的形态学观察。同时,本文测定了速生薄口螨休眠体核基因 ITS、线粒体基因 *cox1* 片段序列,可以作为速生薄口螨系统发育研究的分子标记,有利于更准确地探讨速生薄口螨及其与其它粉螨种间的系统进化关系。

致谢! 本研究得到安徽师范大学生命科学院电镜室闫浩老师大力协助,在此谨表谢意。

参考文献:

- [1] 邹萍,高建荣.蘑菇螨类的常见种简介[J].食用菌,1987,9(3):29-30.
- [2] 莫颂轶,蒋敏丽,孔保庆,等.239名壮、汉族城乡女大学生面部蠕形螨感染情况及影响因素分析[J].右江民族医学院学报,2013,35(2):141-143.
- [3] 李朝品,武前文.房舍和储藏物:粉螨[M].北京:中国科学技术出版社,1996:376-378.
- [4] 李朝品,沈兆鹏.中国粉螨概论[M].北京:中国科学技术出版社,2016:454-462.
- [5] 温硕洋,何晓芳.一种适用于昆虫痕量 DNA 模板制备的方法[J].昆虫知识,2003,40(3):276-279.
- [6] 孙恩涛.椭圆食粉螨线粒体基因组测序及种群遗传结构的研究[D].芜湖:安徽师范大学,2014.
- [7] 张曼丽,范青海.螨类休眠体的发育与治理[J].昆虫学报,2007,50(12):1293-1299.
- [8] 赵晓平,刘晓光.实验室薄口螨的大量培养及休眠体的诱导[J].动物学杂志,2011,46(4):42-46.
- [9] 段彬彬,湛孝东,宋红玉,等.食用菌速生薄口螨休眠体光镜下形态观察[J].中国血吸虫病防治杂志,2015,27(4):414.
- [10] 洪勇,陶宁,湛孝东,等.洋葱害螨速生薄口螨的形态观察[J].中国血吸虫病防治杂志,2016,28(3):301-303.
- [11] 柴强,郭娇娇,陶宁,等.中药材生姜孳生速生薄口螨的情况调查及形态观察[J].中国血吸虫病防治杂志,2017,29(6):776-777.
- [12] 邓洁,郭浩杰,黄少康,等.基于线粒体 COI 基因的印度新曲厉螨的分子鉴定[J].环境昆虫学报,2018,41(2):1-11.
- [13] 吴太葆,夏斌,邹志文,等.椭圆食粉螨线粒体 DNACO I 基因片段序列分析[J].蛛形学报,2007,16(2):79-82.
- [14] 孔里微.三种叶螨的线粒体基因组进化机制研究[D].南京:南京农业大学,2016.
- [15] Ben DT, Melamed S, Gerson U, et al. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae)[J]. Experimental and Applied Acarology, 2007, 41(3): 169-181.
- [16] 邹志文,陈芬,夏斌,等.几种钝绥螨 ITS 基因片段的序列分析[J].中国农业科学,2011,44(23):4945-4951.

收稿日期:2019-03-22;修回日期:2019-04-30