

DOI:10.13350/j.cjpb.230413

• 论著 •

吸腐薄口螨休眠体的形态和分子特征鉴定*

王澜, 蒋峰, 汪梅青, 汤非凡, 付晓, 王婧伊, 李朝品, 湛孝东**

(皖南医学院医学寄生虫学教研室, 安徽芜湖 241002)

【摘要】 目的 利用形态学和分子学方法对吸腐薄口螨的休眠体进行鉴定, 了解其形态和分子特征。方法 采用光镜和扫描电镜方法对生姜样品中的吸腐薄口螨进行表面和超微结构观察, 同时提取休眠体基因组 DNA, 测序分析 *cox1* 和 *ITS* 基因。结果 吸腐薄口螨休眠体足 4 对, 腹面凹而背面凸, 体壁较硬, 清晰可见前足体和后足体被背沟分开。足上有刚毛, 背毛短, 躯体末端清晰可见吸盘板, 共 4 对。经 PCR 扩增得到基因片段, 大小为 417 bp, *ITS* 序列长度为 1 613 bp。结论 利用吸腐薄口螨休眠体光镜和电子显微镜观察结合 *cox1* 和 *ITS* 序列, 可鉴定吸腐薄口螨的休眠体, 为吸腐薄口螨的生物学研究奠定了基础。

【关键词】 吸腐薄口螨; 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】 1673-5234(2023)04-0439-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):439-442.]

Identification of the morphological and molecular characteristics of the *Histiostoma sapromyzae* hypopus

WANG Lan, JIANG Feng, WANG Mei-qing, TANG Fei-fan, FU Xiao, WANG Jing-yi, LI Chao-pin, ZHAN Xiao-dong (Department of Medical parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

【Abstract】 **Objective** Morphological and molecular methods were used to identify *Histiostoma sapromyzae* hypopus and to understand its morphological and molecular characteristics. **Methods** The *Histiostoma sapromyzae* hypopus was isolated from the collected ginger samples, and its external morphology and ultrastructure were observed under light microscope and scanning electron microscope for identification. Meanwhile, genomic hypopus 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 ventral surface was concave but dorsally convex, the body wall was hard, and it was clearly seen that the forefoot and hindfoot bodies were separated by the dorsal sulcus. There were bristles on the feet, short dorsal hair, and a suction disc plate was clearly visible at the end of the soma in 4 pairs. The size of *cox1* gene fragment obtained by PCR amplification was 417 bp, and the total sequence length of *ITS* was 1 613 bp. **Conclusion** The morphology of the *Histiostoma sapromyzae* hypopus under light microscope and electron microscope combined with the *cox1* and *ITS* gene sequences, identify *Histiostoma sapromyzae* hypopus, which provide a basis for biological studies of it.

【Key words】 *Histiostoma sapromyzae*; hypopus; external morphology; molecular characteristics

***吸腐薄口螨(*Histiostoma sapromyzae*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、蛛形纲(Arachnida)、蜱螨亚纲(Acari)、真螨总目(Acarina)、疥螨目(Sarcoptiformes)、无气门股(Astigmata)、薄口螨科(Histiostomidae)、薄口螨属(*Histiostoma*)^[1]。薄口螨属的螨类主要营腐生生活,多孳生与潮湿、腐烂、隐蔽的环境。该螨不仅直接取食菌丝、子实体、蛀蚀栽培料,而且还可携带并传播病原杂菌,轻则使菌床退菌,推迟出菇,重则大幅减产,甚至造成绝收^[2]。目前记录的薄口螨有速生薄口螨(*H. feroniarum*)、吸腐薄口螨(*H. sapromyzae*)、实验室薄口螨(*H. laboratorium*)、美丽薄口螨(*H. pulchrum*)和圆孔薄口螨(*H. formosani*)等。薄口螨属螨类休眠体能附

着在各种节肢动物身上,借此迁移到其他适宜的场所以^[3],很容易造成传播。薄口螨的休眠体形态特征与普通形态特征基本一致,很难区分,可见休眠体对薄口螨属螨类的鉴别具有重要意义,而采用分子鉴别法对螨类的鉴别方法简单、准确。本研究采用光学显微镜和扫描电子显微镜对吸食薄口螨的休眠体进行形态学观察,并对其进行线粒体细胞色素氧化酶亚基 1 (Cytochrome oxidase 1, *cox1*)及核糖体内部转录间隔

* **【基金项目】** 安徽省高校自然科学研究重点项目(No. KJ2019A0403)。

** **【通讯作者】** 湛孝东, E-mail: xdzhan@126.com

【作者简介】 王澜(1997-),女,安徽人,在读硕士研究生。研究方向:螨类生态及防控。E-mail: 846840936@qq.com

区(internal transcribed spacer, ITS)基因扩增和序列分析,为吸腐薄口螨的生物学研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 样品 生姜样品采自芜湖市一家超市。

1.2 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), DNeasy Blood & Tissue Kit, Prime STAR Max Premix(2×), 蛋白酶 K, 6×DNA Loading Buffer(Blue), Marker DL2000, 4S Red Plus 核酸染色剂(10 000×水溶液)和琼脂糖(上海生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 标本制作 在光学显微镜下,用零号毛笔将生姜样品中的休眠体挑出,振荡清洗,摆正姿势,封片固定后拍照^[4],按照 Hughes^[5]方法鉴定和分类。同时,从吸腐薄口螨中挑选出一部分休眠体,经多次振荡和洗涤后将其置于 75%的酒精中,以提取 DNA。

2.2 电镜标本制作 采用 2.5%戊二醛固定吸腐薄口螨的休眠体 1~2 h,然后用磷酸缓冲液冲洗,再分别用 30%~95%的乙醇脱水 10~15 min,最后将其放入无水乙醇中,彻底脱水。将脱水后的标本转移到二甲苯中脱脂,然后用纯乙酸异戊酯置换至少 30 min。用干净的毛发针头将其固定在涂有导电双面胶的电镜样品支架上,在电镜下(5~10 kV 加速电压)下进行扫描,选取清晰的图像,并对其进行拍摄。

2.3 DNA 提取、引物设计和 PCR 克隆扩增 参照文献^[6]的提取单头螨总 DNA。根据 GenBank 中屋尘螨、伯氏嗜木螨、椭圆食粉螨、长食酪螨和腐食酪螨的 *cox1* 及 ITS 序列,采用 DNAMAN 对其进行比较,在保守区设计 *cox1* 结合引物。COIF:5'-TTGCDGGKGTWTCTTCTAT-3'; COIR:5'-ACAGCAATRATAGTAGCAG-3'。ITS 扩增引物 ITSF:5'-TGCTTGGGATTGGGATTGT-3'; ITS R:5'-GCACTAATACA CTAACGCCG-3'^[7]。

引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应总体积为 25 μ L,含 2.5 μ L Prime STAR Max Premix (2×),吸腐薄口螨 DNA 2 μ L,上、下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补全至 25 μ L。PCR 反应参数:98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 循环 35 次, 4 $^{\circ}$ C 下保存。取 PCR 产物 5 μ L,与 6×DNA Loading Buffer 1 μ L 混合后进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

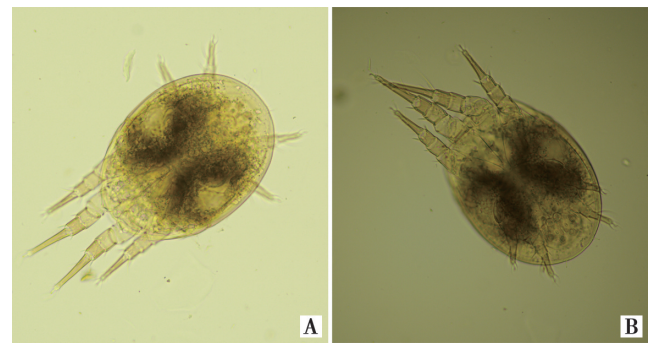
2.4 测序与序列分析 目的片段测序由上海生物工

程有限公司完成。通过 DNAMAN 软件对测定序列进行拼接,然后用 DNASTar 中的 Editseq 对其进行编辑,并对其碱基组成进行分析。在 GenBank 上下载薄口螨科的 *cox1* 和 ITS 序列,通过 DNAMAN 进行对比,建立系统发育树。

结果

1 吸腐薄口螨休眠体光镜形态

吸腐薄口螨的休眠体躯体呈卵圆形,后缘尖狭,体壁较硬。有 4 对足,清晰可见背沟,以背沟为界将足体分为前足体(足 I、II)和后足体(足 III、IV)(图 1A)。末体腺明显,富有黑色分泌物。隐约可见吸盘。各个足体的长度均较长,前足体朝前,后足体朝外。(图 1B)。



A 休眠体背面 B 休眠体腹面。

图 1 吸腐薄口螨休眠体光镜特征结构(200×)

A Dorsal surface of hypopus B Ventral surface of hypopus.

Fig. 1 *Histiotostoma sapromyzarum* hypopus light microscopic features structured(200×)

2 吸腐薄口螨休眠体电镜形态

吸腐薄口螨休眠体电镜下可见腹面凹而背面凸,有 4 对足(图 2A、图 2B),前足体为三角形,足上有刚毛,未见鄂体,刚毛呈杆状(图 2C、2D、2E),背毛短呈杆状,肛后毛很短(图 2A、2B),腹面生殖区还没有完全发育,生殖感觉器隐约可见(图 2F、2G),后足体明显弯向前方(图 2G),躯体末端可见到吸盘板(图 2F、2G、2H),吸盘板上共有 4 对吸盘,其中位于中间的 2 个中央吸盘最明显,以中央吸盘为中心,周围有 6 个小吸盘(图 2F、2H)。

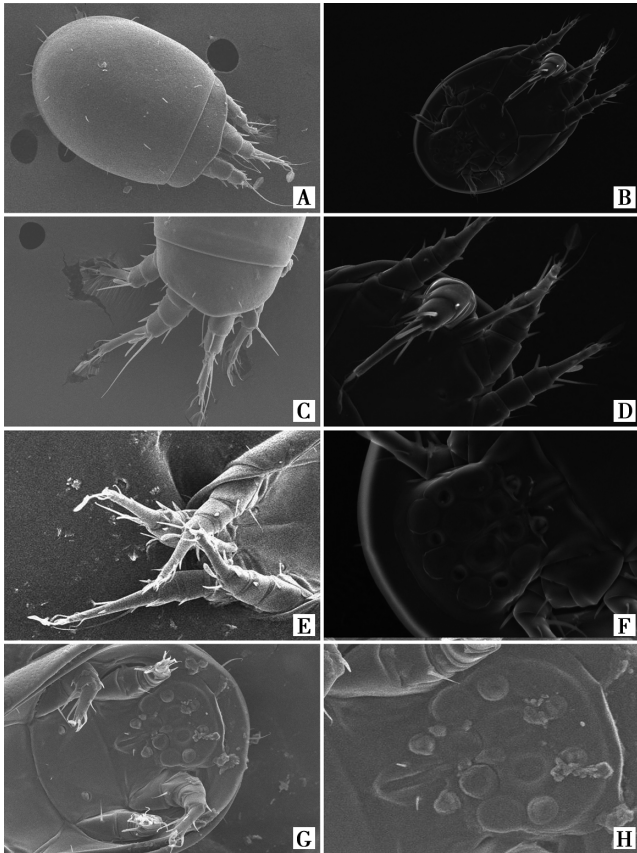
3 吸腐薄口螨 *cox1* 扩增结果与系统发育树的建立

提取吸腐薄口螨基因组 DNA 后通过 PCR 扩增,获得吸腐薄口螨清晰的 *cox1* 基因片段扩增产物,片段大小为 417 bp。经 BLAST 分析,为吸腐薄口螨(GenBank 登录号为 OP028202.1)。

用 DNASTar 软件包的 Editseq 软件进行分析得到的碱基序列 A、G、T、C 含量分别为 23.50%、17.51%、44.84%、14.15%,G+C 含量为 31.65%,A+T 含量为 68.35%。与其他几种粉螨亚目中粉螨碱

基组成方式相似,表明在粉螨亚目螨类中的 *cox1*, A+T 含量总体较高。

吸腐薄口螨 *cox1* 基因片段与 GenBank 中的已报道的 7 种粉螨亚目粉螨的 *cox1* 序列具有高度的同源性,其中吸腐薄口螨和腐食酪螨序列的相似性最高,为 84.3%;与其他粉螨序列相似性为 81.27%~83.49%。基于 *cox1* 序列构建的系统发育树中,7 种粉螨聚集在一起,范张食酪螨和弯食酪螨亲缘关系最近,然后与卵圆真绥螨汇成一枝(图 3)。



A 背面观 B 腹面观 C 前足体背面观 D 前足体腹面观 E 前足体侧面观 F 腹部吸盘板 G 后足体 H 生殖区

图 2 吸腐薄口螨休眠体的电镜结构特征

A Dorsal view B Ventral view C Dorsal view of the forefoot D Ventral view of the forefoot E Lateral view of the forefoot F Abdominal suction plate G Podosomes H Genital region

Fig. 2 *H. sapromyzae* hypopus structural features by electron microscopy

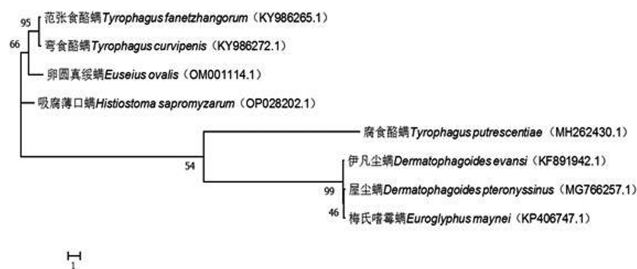


图 3 7 种粉螨亚目基于 *cox1* 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences in seven powdery mite suborders

4 吸腐薄口螨 ITS 扩增结果及系统发育树的建立

PCR 扩增得到吸腐薄口螨清晰的 ITS 基因片段扩增产物图,除去引物后,全序列长度为 1 613 bp。经 BLAST 分析,为吸腐薄口螨(GenBank 登录号为 OP113838.1)。用 DNASTar 软件包的 Editseq 软件进行分析得到的碱基序列 A、G、C、T 含量分别为 27.71%、21.95%、20.89%、29.45%,G+C 含量为 42.84%,A+T 含量为 57.16%。

吸腐薄口螨 ITS 基因片段与 GenBank 中的已报道的 7 种粉螨亚目粉螨的 ITS 序列具有高度的同源性,其中吸腐薄口螨和拱殖嗜渣螨序列的相似性最高,94.47%;与其他粉螨序列相似性为 83.93%~93.19%。基于 ITS 序列建立的系统发育树中,7 种粉螨聚集在一枝上,吸腐薄口螨与腐食酪螨的亲缘关系最近,刺根足螨和罗宾根螨亲缘关系最近(图 4)。



图 4 7 种粉螨亚目粉螨基于 ITS 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS gene sequences in seven powdery mite suborders

讨论

吸腐薄口螨是一种储藏物有害螨,主要营腐生生活,栖息于腐烂植物、腐败菌类和潮湿谷物^[2-5]。初期,成螨和若螨在菌盖或菌褶内为害,以后蛀入子实体内繁殖^[7]。休眠体是该螨生活史的重要阶段,是借助携带者进行传播的特殊形式^[8]。此外,在薄口螨科中,通常以休眠体作为分属和分种的依据^[9]。张曼丽等^[10]报道吸腐薄口螨的休眠体可利用甲虫、蝇类和多足纲动物作为传播工具。柴强等^[11]在中药白及中查出吸腐薄口螨,并用光学显微镜观察了螨的形态学特点。本研究利用光学显微镜能够清楚观察到吸腐薄口螨休眠体的外部形态特征,这也是观察吸腐薄口螨休眠体的最简便、最直观的方法。但是,由于仪器的精度限制,无法观测到标本的微观组织。利用扫描电镜可以清楚观察吸腐薄口螨的表皮、刚毛、吸盘和生殖区的结构特点。因此,本研究将光镜与扫描电子显微镜相结合,系统地描述了该螨休眠体的形态:在躯体的末端有三列 4 对吸盘。

cox1 是基因进化中常见的分子标记,在动物的分子识别和系统重构中起着非常重要的作用。张兰香等^[12]报道基于线粒体 COI 基因 5' 端区段可用于 7 种常见储藏物粉螨到的物种鉴定,构建了系统发育树并

进行了遗传距离分析,发现种内序列差异小于种间,种间遗传距离与种内之比大于10倍以上,提示COI基因5'端区段可用于7种常见储藏物粉螨的物种鉴定。聂跃等^[13]利用线粒体COI基因序列对不同地区橡胶树上的螨标本进行了种群的遗传多样性分析,通过比较六点始叶螨的线粒体COI基因和NCBI数据库其他螨虫的基因发现,六点始叶螨最高相似度(92.69%)是叶螨科COI基因(登录号MN338390),与其他叶螨科螨类差异性较大,可作为种间鉴定分析的DNA条形码用于快速鉴定。Jansson等^[14]利用642 bp的线粒体DNA *cox1* 片段对5个群落的林禽刺螨进行了种群遗传结构及遗传多样性分析。本研究得到了吸腐薄口螨 *cox1* 基因序列,从GenBank获得的资料,通过对吸腐薄口螨与粉螨亚目中其他种类的 *cox1* 碱基组成进行对比,得到的 *cox1* 片段中 A+T 的比例为 68.35%,表明粉螨亚目 *cox1* 中 A+T 的含量较高。根据7种粉螨亚目 *cox1* 基因的同源关系及系统发生树的建立,结果表明,它们与其他粉螨的相似度在 81.27%~84.30%之间。

ITS 是对粉螨进行发育研究常应用的核基因。郑凌霄^[15]报道 ITS 序列可作为粉螨种内地理种群之间分子系统发育研究的分子标记。白映禄等^[16]基于 ITS 序列探讨了甘肃省叶螨属和全爪螨属种群的系统关系,明确了叶螨属和全爪螨属的系统发生地位。本研究得到了吸腐薄口螨的 ITS 序列,通过对7种粉螨的 ITS 片段进行分析,发现在 ITS 片段的碱基成分中 A+T 的百分比为 57.16%,根据7种粉螨亚目 *cox1* 基因的同源关系及系统发生树分析,它们与其它粉螨的相似度在 83.93%~94.47%之间。

本研究对吸腐薄口螨的线粒体基因 *cox1* 和核基因 ITS 进行了分析,结果表明该基因可以作为吸腐薄口螨的分子标志,可以更好地了解吸腐薄口螨和其它粉螨种间的演化关系。通过光学显微镜和扫描电镜,细致地观察了吸腐薄口螨休眠体的形态特征,并对其鉴定要点进行了归纳。此外,电子显微镜还能观测到

微小的、连续变化的、具有较高的放大倍数的、清晰、立体的图像,有助于形态学的鉴别,并可用于其他螨种的形态学观察。

【参考文献】

- [1] 李朝品,沈兆鹏. 中国粉螨概论 [M]. 北京:科学出版社,2016:462-463.
- [2] 陆云华. 食用菌害螨——吸腐薄口螨[J]. 食用菌,2002,24(4):35-36.
- [3] 曾宪森,黄玉清,李平,等. 福建省蘑菇螨的种类及螨源的初步研究[J]. 福建省农科院学报,1989,4(2):84-86.
- [4] 李朝品,武前文. 房舍和储藏物粉螨:粉螨[M]. 中国科学技术大学出版社,1996:376-378.
- [5] Hughes AM. The mites of stored food and houses [M]. London:HMSO,1976.
- [6] 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(3):276-279.
- [7] 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]. 安徽师范大学,2014.
- [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] 李朝品,沈兆鹏主编. 房舍和储藏物粉螨 [M]. 第2版. 北京:科学出版社,2018:65-70.
- [10] 张曼丽,范青海. 螨类休眠体的发育与治理[J]. 昆虫学报,2007(12):1293-1299.
- [11] 柴强,陶宁,湛孝东,等. 中药材白及寄生吸腐薄口螨的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2016,28(04):453-455.
- [12] 张兰香,詹雨娟,李梦珠,等. 基于线粒体 COI 基因 5'端区段粉螨 DNA 条形码研究[J]. 皖南医学院学报,2021,40(1):9-12.
- [13] 聂跃,卢塘飞,陈俊谕,等. 基于 COI 基因的橡胶树六点始叶螨遗传多样性分析[J]. 热带作物学报,2020,41(4):773-778.
- [14] Jansson DS, Otman F, Lundqvist L, et al. Northern fowl mite (*Ornithonyssus sylviarum*) in Sweden [J]. Medical & Veterinary Entomology, 2015, 28(4):443-446.
- [15] 郑凌霄. 常见储藏物粉螨的分子鉴定与系统发育研究[D]. 芜湖:皖南医学院,2019.
- [16] 白映禄,薛玉丽,常芸,等. 基于 rDNA ITS1 序列的甘肃省叶螨属 *Tetranychus* 和全爪螨属 *Panonychus* 种群的系统关系[J]. 甘肃农业大学学报,2019,54(5):128-134.

【收稿日期】 2022-09-23 【修回日期】 2022-12-10