

武军元,程尚鹏,闫峰峰,等. 新疆边境库车县图兰扇头蜱形态学及分子生物学鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):149-151.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.042

新疆边境库车县图兰扇头蜱形态学及分子生物学鉴定

武军元^{1,2}, 程尚鹏¹, 闫峰峰¹, 王远志³

(1. 塔里木大学,新疆阿拉尔 843300;

2. 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300;3. 石河子大学医学院,新疆石河子 832000)

摘要:应用数码体视显微镜观察采自新疆库车县羊体寄生蜱虫的形态学特征,应用分子生物学分析方法对采集的蜱虫进行线粒体 16S rDNA 基因序列扩增、测序,运用 MEGA 6.0 软件邻接法(neighbour-joining,简称 NJ)构建遗传进化树,确定蜱虫的进化生物学特征。结果表明,新疆库车县的蜱种主要为图兰扇头蜱,分子水平上具有较高的生物多样性。

关键词:新疆;蜱;形态学结构;16S rDNA 基因;遗传进化

中图分类号: S852.74⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0149-03

蜱类是寄生于两栖类、鸟类、爬行类和哺乳类等动物体表的专性吸血寄生虫,全世界共有 896 种,我国明确定名的有 117 种,其中最常见、危害最严重的是硬蜱^[1-4]。我国现有大部分蜱类具有传播病原体的潜能,部分蜱可以传播 2 种以上病原体^[5],对人类健康和畜牧业生产带来极大的危害。新疆地处亚欧大陆腹地,中国西北边陲,复杂多样的生态地理环境为多种蜱虫提供了繁衍生息所需的适宜条件,因此,加强对新疆蜱种及蜱传疫病的监测有利于我国对蜱传病的控制,以及对蜱传病原外来入侵的联防联控具有重要意义。库车县位于新疆南疆边境地区,目前,对库车县牲畜寄生蜱种的报道较少,本研究应用分子生物学方法结合形态学手段对新疆库车县的蜱虫进行分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蜱虫来源 2016 年 3 月下旬,在新疆库车县随机选取未经药浴的 4 个羊场,采集其体表寄生的蜱虫,采集的蜱虫放置于专用的采样管中,保持其存活并带回实验室。

1.1.2 主要试剂与仪器 PCR 所用试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 提取试剂盒 TIANamp Genomic DNA kit、DNA marker、DNA 回收试剂盒、T₄ DNA 连接酶试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;其他所用试剂均为国产分析纯。梯度 PCR 仪、全自动凝胶成像分析系统、高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品;LEICAM165 C 数码体视显微镜,购自同舟同德(北京)仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照杜景云所报道的蜱虫线粒体 16S rDNA 基因序列^[6]设计以下引物,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

表 1 蜱虫线粒体 PCR 引物设计

| 扩增片段 | 引物名称 | 引物序列 (5'-3') | 片段大小 (kb) |
|----------|-------|-------------------------------|--------------|
| 16S rDNA | 16S-F | CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG | 460 |
| | 16S-R | CCGGTCTGAACCTCAGATCAAGT | |

1.2.2 形态学鉴定 采集的虫体在温度为 22~24℃、相对湿度为 75%~85% 的温箱内培养^[7]。参照《中国经济昆虫志》和《新疆蜱类志》^[8],用配备数码照相功能的解剖显微镜拍摄图片,对蜱虫的盾板、假头、假头基、肛侧板(雄蜱)、气门板、第一缘垛、孔区(雌蜱)形态进行对比观察并测量

长度。

1.2.3 虫体处理和 DNA 提取 经形态学鉴定后的虫体分别用浓度为 70%、50%、30%、10% 的乙醇溶液于 37℃ 摇床冲洗 1 h,再用超纯水反复冲洗、干燥,放置于消毒灭菌的 1.5 mL EP 管中。按照 DNA 提取试剂盒提取蜱虫 DNA,放置于 -20℃ 条件下保存备用。

1.2.4 16S rDNA 基因克隆 用设计的 16S rDNA 基因引物进行 PCR 扩增,采用 25 μL 的反应体系:10×PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mmol/L dNTPs 2 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U)0.25 μL,上、下游引物各 1 μL(10 μmol/L),cDNA 模板 2 μL,补足水至 25 μL。反应条件:95℃,5 min;94℃预变性 5 min,92℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 38 个循环;72℃终延伸 8 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下观察结果。

收稿日期:2016-06-23

基金项目:新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技兵团重点实验室基金(编号:HS201608);塔里木大学大学生创新训练计划(编号:2016011)。

作者简介:武军元(1980—),男,甘肃武威人,博士,副教授,主要从事人兽共患病学研究。E-mail:wjyn-w@126.com。

通信作者:王远志,博士,副教授,主要从事感染与免疫研究。E-mail:wyzshz@sina.com。

1.2.5 序列分析及遗传进化树构建 应用序列分析软件 DNASTar 将所得序列与 GenBank 中公布的蜱虫序列进行同源性比较,用 MEGA 6.0 软件的 Neighbour – Joining 方法构建进化树,分析其遗传进化关系。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定结果

本次采集的蜱虫体型较小,雌虫体长 3.2 ~ 5.5 mm,雄虫体长约 2.9 ~ 3.6 mm,均呈褐色,背腹扁平似卵圆形,芝麻至米粒大,雌虫吸饱血后可膨胀达蓖麻籽大,身体主要分为假头部和躯体部 2 个部分(图 1);假头呈星六角形,侧角明显,后缘微凹(图 2 – A),虫体完全被盾板覆盖(雄蜱)(图 1 – C),或前部盾板覆盖(雌蜱)(图 1 – A),前部较窄,后部圆钝,盾板有花斑、复眼,复眼在靠近盾板的边缘,有缘垛(图 2 – D),须肢粗短,中部最宽,前端稍窄,气门板逗点状(图 2 – B),中垛大于边垛,常有尾突(图 2 – C、D),有肛沟,雄性肛侧板后缘内斜明显,内缘具角突,长约为宽的 2.5 ~ 3.0 倍,内缘中部稍凹,后缘向内显著倾斜,其后方凸角明显(2 – B)。上述特征符合热孜万等报道的硬蜱科扇头蜱属图兰扇头蜱的特征^[9]。

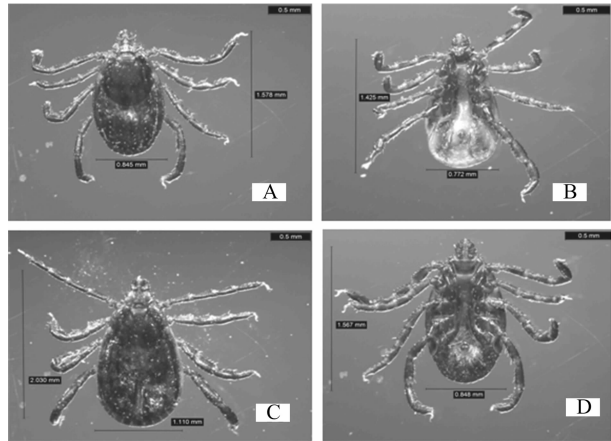


图1 蜱虫的背部和腹部形态

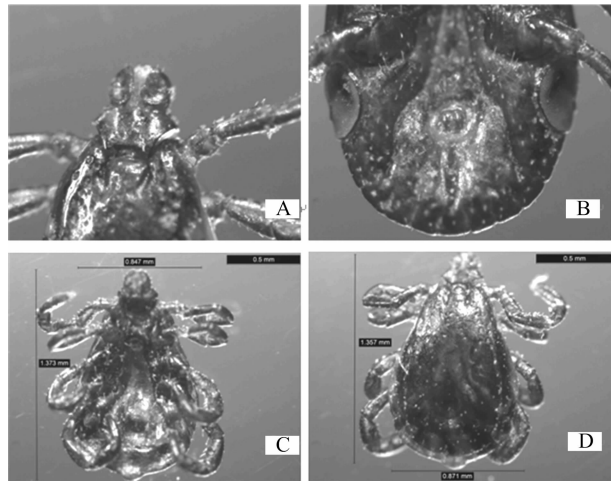
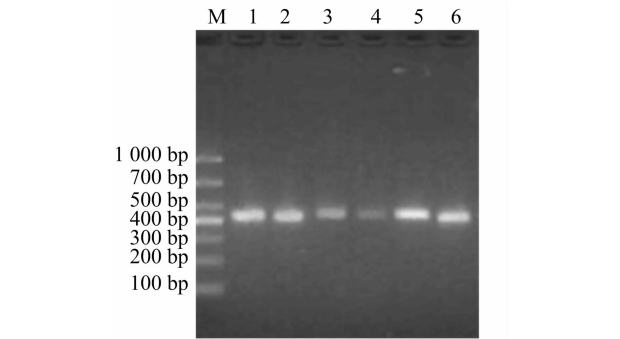


图2 蜱虫的局部结构

2.2 16S rDNA 基因扩增结果

PCR 扩增蜱虫线粒体 16S rDNA 基因,产物经 1.2% 的琼

脂糖凝胶电泳分析,得到 460 bp 左右核酸片段,与预期片段大小相符(图 3)。



M—DNA marker; 1~6表示阳性样品。

图3 蜱虫16S rDNA的PCR结果

2.3 序列比对与系统进化树构建

通过测序 50 头蜱虫的 16S rDNA 基因片段得到 3 种不同的序列,登录 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi> 比对分析,表明蜱虫为图兰扇头蜱(*Rhipicephalus turanicus*)。应用 MEGA 6.0 软件的 Neighbour – Joining 方法构建进化树(图 4)。基于 16S rDNA 的系统进化树显示,此次采集的蜱虫主要为图兰扇头蜱,可分为 3 种类型,第 1 种类型与以色列的图兰扇头蜱分子进化水平相似,第 2 种类型与张璘报道的图兰扇头蜱相似^[10],第 3 种与美国的图兰扇头蜱相似,说明本次采集的图兰扇头蜱呈现分子水平上的生物多样性。

3 讨论

近年来,随着分子流行病学研究手段的不断深入,我国从蜱种内分离到部分新发蜱传病原体^[11],对当地人畜健康造成了一定的危害。新疆地区陆续分离到的蜱传病原主要有脑炎病毒、东方马脑炎病毒、新疆出血热病毒、新环状病毒、辛德毕斯病毒、西方马脑炎病毒、乙脑病毒、西尼罗病毒、辽宁病毒、Tahyna 病毒等,其中,部分病毒系新疆首次发现^[12]。研究报道,蜱传疫病与蜱种孳生环境以及蜱虫种类有着密切的关系,亲缘关系越近的蜱种传播同种病原的概率越大^[13]。因此,开展蜱种分布的调查对地方性蜱类与蜱传疾病的防治工作具有重要的意义。本研究形态学调查结果表明,库车县羊体寄生的蜱种主要为图兰扇头蜱。该县位于新疆南疆阿克苏地区东部边缘的塔里木盆地,常年干旱少雨,适合图兰扇头蜱的生存繁衍,此次调查蜱种主要为图兰扇头蜱,可能与这一特殊的地理环境有关。近年来,随着全球气候的不断变化,蜱种不断增多,以及宿主与生境关系的改变,传统依靠形态学鉴定的方法已不能有效地对蜱种进行分类,线粒体 DNA 序列作为进化生物学重要的遗传标记,不仅能体现物种分子的进化规律,更能用于种内遗传的差异分析,16S rDNA 基因序列由于具有高度保守性,目前已被应用于蜱种分类学研究^[14]。本研究在对采集蜱种形态学观察的基础之上,通过分析线粒体 16S rDNA 的基因序列,进一步明确新疆南疆库车县羊体寄生的蜱种主要为图兰扇头蜱。本研究结果为系统研究当地蜱种生态分布,以及预防和控制当地虫媒病的传播具有重要意义。



参考文献:

- [1] Guglielmone A A, Robbins R G, Apanaskevich D A, et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodidae) of the world: a list of valid species names[J]. Zootaxa, 2010, 2528: 1-28.
- [2] Chen Z, Yang X, Bu F, et al. Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae: Ixodidae) of China[J]. Experimental and Applied Acarology, 2010, 51(4): 393-404.
- [3] Klompen J S H, Black W C, Keirans J E, et al. Evolution of ticks[J]. Annual Review of Entomology, 1996, 41(1): 141-161.
- [4] 周锦萍, 张维谊, 鞠厚斌. 蜱及蜱媒传染病[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011(4): 52-53.
- [5] Yu Z, Wang H, Wang T, et al. Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China[J]. Parasites and Vectors, 2015, 8(1): 1-8.
- [6] 杜景云. 新疆北疆蜱种鉴定及蜱传疾病调查研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [7] 冯玉明, 张晓雪, 黄赤忠, 等. 实验室条件下全沟硬蜱生活史观察[J]. 地方病通报, 2002, 17(1): 67-69.
- [8] 热孜万·阿不力孜, 于心, 阿不力米提·买托呼提, 等. 塔里木盆地三种扇头蜱的鉴别要点[J]. 地方病通报, 2007, 22(2): 4-5.
- [9] 张 璘. 新疆北疆地区蜱种分布及蜱源性病原检测方法的建立[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [10] 闻 静, 焦 丹, 鞠文东, 等. 新发蜱传病原体——劳氏立克次体的研究现状[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4): 361-364.
- [11] 寇 春, 段晓梅, 张渝疆, 等. 新疆地区虫媒病毒调查研究状况[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(3): 301-305.
- [12] Switzer W M, Salemi M, Shanmugam V, et al. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates[J]. Nature, 2005, 434(7031): 376-380.
- [13] Gylfe A, Yabuki M, Drotz M, et al. Phylogeographic relationships of *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) and their significance to transequatorial dispersal of *Borrelia garinii*[J]. Hereditas, 2001, 134(3): 195-199.