



河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密 级：
分 类 号：
学校代码：10075
学 号：20171589

硕士学位论文

无损 DNA 提取技术以及分子鉴定在 甲螨中的应用研究

学位申请人：范成
指 导 教 师：陈军研究员、张锋教授
学 位 类 别：理学硕士
学 科 专 业：动物学
院 系 名 称：生命科学学院
答 辩 日 期：二零二零年六月

Classified Index:

CODE:10075

U.D.C.:

No.:20171589

Dissertation for the Degree of Master

Study on non-destructive DNA
extraction method and molecular
identification technology in oribatid
mites

Candidate: Fan Cheng

Supervisor: Professor Chen Jun, Professor Zhang Feng

Category of Academic Degree: Master of Science

Specialty: Zoology

College: College of Life Sciences

Date of Oral Defense: June, 2020

河北大学

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得河北大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

作者签名：_____范成_____ 日期：_____2020_____年_____6_____月_____18_____日

学位论文使用授权声明

本人完全了解河北大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

本学位论文属于

- 1、限制公开 ，在_____年_____月_____日限制期满后适用本授权声明。
- 2、不限制公开 。

（请在以上相应方格内打“√”）

作者签名：_____范成_____ 日期：_____2020_____年_____6_____月_____18_____日

导师签名：_____陈军 张辉_____ 日期：_____2020_____年_____6_____月_____18_____日

保护知识产权声明

本人为申请河北大学学位所提交的题目为（无损 DNA 提取技术以及分子鉴定在甲螨中的应用研究）的学位论文，是我个人在导师（陈军、张锋）指导并与导师合作下取得的研究成果，研究工作及取得的研究成果是在河北大学所提供的研究经费及导师的研究经费资助下完成的。本人完全了解并严格遵守中华人民共和国为保护知识产权所制定的各项法律、行政法规以及河北大学的相关规定。

本人声明如下：本论文的成果归河北大学所有，未经征得指导教师和河北大学的书面同意和授权，本人保证不以任何形式公开和传播科研成果和科研工作内容。如果违反本声明，本人愿意承担相应法律责任。

声明人： 范成 日期： 2020 年 6 月 18 日

摘要

甲螨是一类重要的土壤动物，体型微小，一般具有较厚的体壁。本研究分别对无损 DNA 提取技术以及分子鉴定在甲螨中的应用进行了探究。

在无损 DNA 提取部分，本研究针对甲螨这一特定类群，探讨了一种无形态特征损伤的 DNA 提取技术。通过结合试剂盒 DNA 提取法，并适当改进实验条件，设计出一套行之有效的 DNA 提取流程。然后将该方法应用于大翼甲螨、角翼甲螨、尖棱甲螨的 DNA 提取实验中，PCR 扩增并测序之后将所得序列与 GenBank 数据库进行 Blast 比对验证了甲螨 DNA 序列的正确性。随后对提取 DNA 之后的甲螨标本进行形态学观察，发现其外部形态结构保存完好，主要的分类学特征清晰可见，此标本可以作为凭证标本长期保存。因此本研究提供的 DNA 提取技术既可以提取出足够的 DNA 又能够保留凭证标本，这将会有效促进甲螨分子分类学的相关研究。

在分子鉴定技术在甲螨中的应用研究方面，本研究选取了目前常用的 28S 基因序列和 COI 基因序列作为分子标记。利用 28S 基因序列分析了大翼甲螨、角翼甲螨、尖棱甲螨、礼服甲螨不同科之间的序列差异情况，以 *Ischyropsalis strandi* (GenBank 登录号为: KP224374.1) 为外群，对 6 条序列进行了遗传距离的计算，同时基于 NJ 法（邻接法）、ME 法（最小进化法）、UPGMA 法（非加权组平均法）构建了甲螨的系统进化树。随后也对大翼甲螨科内两个不同物种的 28S 基因序列与 COI 基因序列的差异情况进行了比较分析。

研究结果显示：NJ、ME、UPGMA 三种建树方法均显著支持大翼甲螨科两物种聚为一支，bootstrap 值分别为 99%、99%和 100%。NJ 法和 ME 法构建的系统进化树将尖棱甲螨与角翼甲螨聚为一支，但 UPGMA 法构建的系统进化树并没有将其聚为一支，因此，这两者之间的进化关系还有待于进一步研究。NJ、ME、UPGMA 三种方法构建的系统进化树均将礼服甲螨与大翼甲螨、尖棱甲螨和角翼甲螨分开，可能是由于礼服甲螨与另外三种甲螨在 28S 基因序列上具有较大的遗传差异性。对大翼甲螨的研究表明：28S 基因在不同物种之间的序列差异要明显小于 COI 基因，且 COI 基因序列的差异程度达到了 28S 基因序列的 7 倍以

上，因此，COI 基因更加适合于较低阶元的物种进化关系的确定以及甲螨在种水平上的分子鉴定。

关键词：甲螨 无损 DNA 提取 凭证标本 28S 基因 COI 基因 分子鉴定

Abstract

The oribatid mites are of great significance in soil ecological system. They are small(0.1-1mm) and usually sclerotized heavily. In this study, a non-destructive DNA extraction method and molecular identification technology were applied to oribatid mites.

In the research of DNA extraction , We provided an efficient and non-destructive DNA extraction method for oribatid mites. By changing the method of DNA extraction and using DNeasy Blood and Tissue kit, a new method for DNA extraction without destroying morphological features can be applied to oribatida mites. Then we used this method to extract DNA of oribatid mites of Galumnidae、Achipteridae and Ceratozetidae. After Comparing these sequence with GenBank database by BLAST software for ensuring the DNA is correct, We found that the morphological characters valuable for identifying the specimens have not been destroyed after DNA extraction and the voucher specimen could be kept for further studies. So, this method can not only obtain high quality DNA templates but also keep voucher specimen. It could be an efficient way to help DNA taxonomy on oribatid mites.

In the research of molecular identification in oribatid mites, We chose commonly used 28S gene and COI gene as molecular markers. Based on 28S gene, we analyzed the sequence difference of oribatid mites(Galumnidae、Achipteridae、Ceratozetidae and Trhypochthoniidae). By using *Ischyropsalis strandi* (the GenBank accession number is KP224374.1) as a outgroup, We calculated the genetic distance and constructed the molecular system tree with NJ、ME and UPGMA method. After that, We compared the variation of 28S gene and COI gene in oribatid mites of Galumnidae.

The result of these research showed that: two species of Galumnidae grouped in a single cluster with a 99%、99% and 100% bootstrap support in NJ、ME and UPGMA tree. The species of Ceratozetide and Achipterioidea grouped in a single cluster with 98% bootstrap support in NJ and ME tree, but they were not grouped together in UPGMA tree. The species of Galumnidae、Ceratozetoidea and Achipterioidea all were not cluster with Trhypochthoniidae, which indicated the 28S gene of Trhypochthoniidae has a considerable difference with the other three families. And the research in Galumnidae showed that: The variation of COI gene has more

than seven times than 28S gene. So, the COI gene is more suitable for phylogenetic analysis in species and genus level of oribatid mites.

Keywords: oribatid mites non-destructive DNA extraction voucher specimen 28S gene COI gene molecular identification

目录

第一章 前言	1
1.1 甲螨概论	1
1.2 DNA 条形码技术	2
1.3 蜚螨分子系统学研究	7
1.4 甲螨分子系统学研究	13
1.5 研究目的和意义	14
第二章 无损 DNA 提取技术在甲螨中的应用	16
2.1 引言	16
2.2 材料试剂	17
2.2.1 实验材料	17
2.2.2 实验试剂	18
2.2.3 实验仪器和设备	18
2.3 实验流程/方法	18
2.3.1 甲螨材料的处理	18
2.3.2 甲螨基因组 DNA 的提取	19
2.3.3 提取总 DNA 效果检测与测序	19
2.3.4 玻片标本的制作	20
2.4 结果与讨论	21
2.4.1 DNA 序列分析结果	21
2.4.2 甲螨标本的形态对比	21
2.4.3 讨论与展望	24
第三章 分子标记在甲螨物种鉴定中的可行性探究	26
3.1 引言	26
3.2 材料与试剂	28
3.2.1 实验材料	28
3.2.2 实验试剂	28
3.2.3 实验仪器和设备	28

3.3 实验流程/方法	29
3.3.1 甲螨总 DNA 的提取	29
3.3.2 核糖体 28S 基因的 PCR 扩增	29
3.3.3 线粒体 COI 基因的 PCR 扩增	30
3.3.4 核糖体 28S 基因与线粒体 COI 基因的测序	30
3.3.5 实验数据的处理和分析	30
3.4 结果分析	31
3.4.1 甲螨 28S 基因序列不同科间的比较分析	31
3.4.2 基于甲螨 28S 基因序列构建的系统进化树	32
3.4.3 大翼甲螨 28S 基因序列与 COI 基因序列的比较分析	33
3.5 讨论与展望	38
第四章 总结	40
参考文献	41
致谢	47

第一章 前言

1.1 甲螨概论

甲螨 (oribatid mites) 是对蛛形纲 Arachnida 蜱螨亚纲 Acari 疥螨目 Sarcoptiformes 甲螨亚目 Oribatida 这一类小型节肢动物的总称。因为大部分甲螨种类在体表会出现不同程度的骨化或矿化, 且颜色深浅不一, 外形看起来与甲虫很相似, 所以在英文里经常称其为 “beetle mites” 或 “armored mites”; 除此之外, 因为许多甲螨经常被发现于苔藓之中, 所以有时英文也将其称作 “moss mites”。这些甲螨的 “俗名” 也在一定程度上反映了甲螨的外部形态特征和甲螨的常见生活环境。

甲螨个体微小, 大多数甲螨体长在 300-700 μm 之间, 少数小型甲螨的体长只有 100 μm 左右, 肉眼几乎是不可见的, 但也有体型较大的甲螨体长会超过 1mm。甲螨作为一类营自由生活的螨类, 在世界各地均有分布, 但主要生活在土壤腐殖质中, 有的生活于苔藓、植物地表部分, 甚至树冠, 还有一些甲螨能够在水中生存并且已经适应了水生或半水生环境。研究表明, 生活在土壤中的甲螨, 其种类和个体数量均是土壤节肢动物中最多的一类。有研究报道, 在温带森林地表 1 平方米范围内的土壤腐殖质中生活有 10 万头以上的甲螨, 其种类超过一百种, 由此可见甲螨众多的种类和极其巨大的数量^[1]。

甲螨对环境的变化非常敏感, 无论是自然环境的季节性变动, 还是由于人为因素导致的环境污染, 如化肥和农药的过量使用、未经处理排放的污水、放射性元素在土壤中的残存等都会对甲螨的种类和数量造成比较明显的影响。而由于甲螨具有分布广、种类多、数量大等优势, 能够在土壤中形成一个小型的动物群落, 而且对甲螨进行采集与调查不需要挖掘大量的土壤样本就能获得比较有效的分析数据, 不会对土壤环境产生较大的影响, 因此甲螨可作为监测土壤环境变化的指示生物^{[2][3]}。另一方面, 甲螨取食植物枯枝落叶和其他动物的死后残体, 会将其粉碎、瓦解, 这会加快土壤中有机物质的分解, 增加土壤肥力, 对治理退化土壤、恢复土壤生态平衡以及保持自然环境的可持续发展发挥着重要作用^{[4][5]}。虽然大多数甲螨以腐殖质和真菌类生物为食, 但也有一些甲螨能够捕食危害植物的瘿螨、蚜虫、膜翅目和双翅目幼虫等, 这些捕食特性在生物防

治上具有广阔的应用前景，目前已经有部分螨类在生物防治上得到了实际应用并取得了良好的效果^{[6]-[8]}。

甲螨不仅在生态方面具有关键的作用，在医学方面也逐渐显示出越来越重要的研究价值。有些甲螨种类是牛、羊等牲畜感染绦虫病的中间宿主，它们在环境中取食绦虫的卵后，绦虫卵可以在甲螨体内经六钩幼虫阶段发育为拟囊尾幼虫，这些甲螨在土壤腐殖质和地表植被等环境中生活时，可能会被牛、羊等牲畜误食，从而导致牛、羊等牲畜感染绦虫病，这会严重危害牲畜的健康，给农业和畜牧业带来巨大损失。目前已经发现能够造成牲畜感染绦虫病的甲螨主要包括若甲螨科 *Oribatulidae*、角翼甲螨科 *Achipteridae*、大翼甲螨科 *Galumnidae* 和尖棱甲螨科 *Ceratozetidae* 等的种类^{[9]-[12]}。

1.2 DNA 条形码技术

DNA 条形码技术 (DNA Barcoding) 是由加拿大分类学家 Paul D.N.Hebert 在 21 世纪初首次提出，并迅速成为动物分类学领域的研究热点^{[13][14]}。DNA 条形码技术可以作为传统形态学分类方法的有效补充，开辟了分类学在新世纪的一个新的发展方向，目前这项技术的发展与应用已经受到了越来越多不同领域的生物学家的关注^[15]。在几百年的分类学研究发展史中，DNA 条形码甚至被认为是自林奈 18 世纪提出双名法以来最为突出的变革。因为 DNA 条形码技术不仅促进了分类学和生物多样性领域研究的快速发展，而且也对生态学、遗传学以及系统进化等等不同领域的研究与发展起到了积极地助推作用^{[16][17]}。

DNA 条形码是可以用于准确区分与鉴定不同物种的一段特定的 DNA 序列。该技术的主要应用方法是通过分子生物学手段获得某一物种的这一段特定的 DNA 序列，在将序列进行测序之后，使用计算机软件程序将测序所得的序列片段与数据库已经提交的所有序列进行比较，进而鉴定并分析这一物种的分类学地位以及与其他相近物种的亲缘关系等。简单来说，DNA 条形码技术的核心就是通过对不同物种的同一特定 DNA 序列进行扫描，然后对这一特定 DNA 序列在不同物种间的相似程度进行比较与分析来确定某个未知物种或发现新种^[18]。

为了能够成功地应用 DNA 条形码技术进行研究，一般情况下需要满足以下几个条件。（1）能够得到待测物种的特定 DNA 序列片段，即被鉴定物种的 DNA 标准区域；（2）DNA 标准区域在不同物种间尤其是相似或亲缘关系较近的物种

间要存在足够的变异以便于区分这些物种；（3）对这一段 DNA 标准区域在同种与不同物种之间的界限有清晰的认识或了解^{[19]-[22]}。这其实就有点类似于商品零售业所使用的商品条形码，每件商品都有一个对应的编码，并且是唯一的，同样的道理，每种生物的 DNA 条形码也都是唯一且确定的。在所有生物的 DNA 序列组成上，理论上每一个位点都有 A、T、C、G 四种碱基可供选择。由于自然选择等因素，个别位点上的碱基是固定的，但在蛋白编码基因里由于密码子的简并性，其碱基序列中的第 3 位碱基通常不受自然选择的影响。所以只需要一段长度为 60bp（碱基对 base pair）的碱基序列就会有 4^{20} 种的可能的碱基序列排列方式，而 4^{20} 种可能的碱基排序已经远远大于目前地球上估计的几千万种生物，即使其他某些原因造成某些位点的碱基具有一定的偏好性，导致实际的碱基排序数目可能会偏小，但这也远大于地球上的所有物种数。况且以现在的技术手段，获得一段长度为几百 bp 的 DNA 序列，已经不是什么很困难的事了，所以，以一段几百 bp 的碱基序列对应或代表某一特定的物种，在理论上是完全可行的。在 21 世纪初，Hebert 就曾建议以 COI（细胞色素 C 氧化酶亚基 I cytochrome c oxidase subunit I）基因序列作为动物分类的 DNA 条形码，因为 Hebert 通过研究大量不同类群动物的 COI 基因序列后发现，不同物种间的 COI 基因序列差异要明显大于同一物种内的 COI 基因序列差异，并且通过初步估算种间的序列差异大致是种内序列差异的十倍。基于此，Hebert 建议以 COI 序列作为动物分类学研究的标准 DNA 条形码序列片段。

通过现在已经应用非常广泛的 PCR 扩增技术，将生物体基因组 DNA 的 DNA 条形码区域进行扩增，之后将获得的 DNA 条形码序列片段送到生物公司进行测序，然后对这段 DNA 条形码序列进行多重序列比对和聚类分析，最终将提供 DNA 模板的这一待定物种准确定位到某一个特定的分类单元中。对于某些物种来说，依据这段 DNA 序列甚至能将其精确定位到一个特定的地理种群^[23]。目前 DNA 条形码技术在这方面的应用已经比较成熟了，具体来说大致包括以下几个操作步骤：（1）样品的采集与前期处理，（2）提取样本的基因组 DNA，（3）DNA 条形码区域标准目的序列片段的 PCR 扩增，（4）PCR 扩增产物的纯化，（5）序列的测定以及分析。通过将测序获得的 DNA 序列与数据库中已经提交的序列进行比对，分析并计算其相似性以及差异值，在此基础上即可确定物种的分类学地位和相关物种之间的近源关系^{[24][25]}。

DNA 条形码是一种新兴的技术，在分类学研究与传统的形态学鉴定方法相比，DNA 条形码技术具有以下几个优点：（1）准确性高；有些亲缘关系较近的物种在外部形态上极其相似，甚至有些亲缘关系并不接近但由于趋同进化等原因导致不同物种之间在形态特征上并没有表现出明显的差异，这时候对于使用传统的形态学分类方法进行物种的鉴定将会使分类工作变的相当困难，而且鉴定结果的准确性也会随之降低，而 DNA 条形码技术是利用生物体的碱基序列进行数字化鉴定，避免了形态特征接近而导致的人为鉴定误差，具有更高的可信度以及准确性。（2）速度快，效率高；传统的形态学鉴定需要逐一比较各个物种之间的各种形态特征，有时候为了确保鉴定结果准确可靠还要到博物馆等标本收藏机构去检视模式标本，耗时耗力，而 DNA 条形码技术只需要使用常规的分子生物学手段获得 DNA 条形码区域的序列片段，然后将其与数据库进行比对即可准确定位所鉴定的物种，而且可以一次性进行大批量地操作，这无疑为分类工作节省了大量的时间，也节约了很多的人力成本。（3）非专业鉴定；依据形态特征进行物种的鉴定，往往需要分类学工作者对所研究的类群具有相当程度的了解，能够准确找到用于分类与鉴定的相关形态结构，并对形态结构在个体间的变化有一个整体的把握，这就需要研究人员大量观察所研究类群的标本，积累充足的背景知识。而 DNA 条形码技术就不存在这样的问题，它类似于一套机械程序，即使是毫无分类学经验的科研人员，只要掌握了简单的分子生物学操作流程，就可以准确地对物种进行鉴定。（4）适用于各物种不同的生长发育阶段；目前的分类学研究主要是根据物种成体的形态结构所构建的一套分类体系，对于非成体的标本，由于没有建立成熟的分类体系，一般情况下是没有办法进行鉴定的，但无论是处于何种发育阶段，同一物种不同个体基因组 DNA 都是固定的，基因组 DNA 不会随着物种的生长发育而改变，这一点不同于物种的外部形态结构。而 DNA 条形码技术正是基于物种的 DNA 序列对其进行鉴定，没有发育状态的限制，所以，DNA 条形码技术适用于物种的各个发育阶段。（5）对样本的要求低；传统的分类方法需要标本尽可能的保持完整，而 DNA 条形码技术只需要保存少量的样本组织就可以鉴定物种，甚至是经过加工或混合后的样本，只要能够通过分子生物学手段提取出该样本组织的 DNA，仍然可以对其进行鉴定^[26]。

尽管 DNA 条形码技术相比于传统的形态学鉴定具有诸多的优势，但也并不是说 DNA 条形码技术就没有任何缺点。依据目前 DNA 条形码技术的发展水平还不能完全取代传统的形态学分类研究。对于一个物种的描述也并不是简简单单地提供一段 DNA 条形码序列就可以完成的，地球上的生物种类繁多、个体数量庞大，尤其是节肢动物更是地球上目前发现的物种数最多的一类。除了提供这些生物的 DNA 条形码，对于它们的外部形态学描述、地理分布情况以及生物学习性的观察和研究都是非常必要的。总的来说，目前 DNA 条形码技术存在的问题主要在以下几个方面：（1）不同的 DNA 条形码区域其 PCR 扩增的引物是不同的，一段引物基本上只能扩增一段特定的 DNA 序列区域，其他的 DNA 序列区域还使用该引物是不能有效扩增的^[27]。而区别不同的分类阶元所使用的 DNA 条形码区域往往是不同的，对于种级阶元的区分一般情况下选取变异性较高的 DNA 序列区域作为 DNA 条形码，对于属级阶元或科级阶元的区分一般情况下选取保守性较高的 DNA 序列区域作为 DNA 条形码序列。（2）不同物种之间基因的水平转移以及同一物种之间基因的正常变异都会给 DNA 条形码技术鉴定物种造成干扰。而亲缘关系较近的一些物种其 DNA 条形码区域的序列差异不明显，也会降低 DNA 条形码技术的准确性。（3）对物种进行系统进化学研究或生物地理学研究时经常会遇到通过 DNA 条形码序列分析的结果与形态学研究的结果不一致的情况。DNA 序列分析得到的结果与形态学研究的结果谁更可靠一直是生物分类学专家争论的焦点。为了使 DNA 序列分析所得的结果更具有说服力，通常情况下会选取多个基因序列片段联合进行分析，怎样使 DNA 序列的分析结果更接近物种进化的真实历程将是今后研究的重点^[28]。（4）目前参与 DNA 条形码研究的科研机构或单位还不是非常多，研究领域还比较分散，数据共享也相对不足，这些都制约着 DNA 条形码技术的进一步发展。（5）DNA 条形码技术的前期成本相对较高，为了获得尽可能多不同物种的 DNA 条形码序列进而构建 DNA 条形码数据库，首先需要获得含有 DNA 的组织样品，而有些物种的标本非常珍贵或者非常稀少，研究人员可能不会选择为了获得 DNA 条形码序列而去破坏仅有的标本，这样的话，去标本采集地重新采集标本然后再进行鉴定也是目前 DNA 条形码技术推广与应用所面临的难题。

从当前该技术的发展情况来看，DNA 条形码技术的研究方向和应用领域主要集中在以下几个方面：（1）不同物种基因组 DNA 提取技术的开发与改进；

(2) 测序技术的升级与优化；(3) 微型 DNA 条形码鉴定技术的探究；(4) 根据 DNA 条形码序列信息设计相应的芯片，基于 DNA 条形码技术的原理设计并生产适用于不同场景实际应用的便携式物种鉴定分析扫描仪^{[29]-[34]}。同时 DNA 条形码技术作为一个精准的生物分类学手段与工具，为了能使此项技术的可靠性更高、应用面更广，我们不能仅仅局限于现行的通用分子标记，应该在现有研究基础上大胆尝试与发现一些新的可能对物种分类有价值的 DNA 条形码候选序列。我相信随着 DNA 条形码技术的快速发展，DNA 条形码将会对物种多样性研究和生物分类学研究起到越来越重要的作用，包括物种的区分与鉴定、发现新种与隐存种，并且能根据这些研究成果重建不同物种之间的系统进化关系甚至最终构建整个地球生命的物种进化树^{[35][36]}。

全世界的生物种类估计有上千万种，而目前世界上已经定名的物种仅有二百万种左右。还有大量的物种没有被发现与定名，所以说，在生物分类学研究中，DNA 条形码技术将会有长足的发展和空间。而且随着 DNA 测序技术的更新和大数据时代海量生物学数据的产生，DNA 条形码技术使用成本低、速度快、结果精确等特点以及现在正不断充实的包含各不同物种 DNA 序列信息的数据库的搭建，必将使该技术成为生物分类学领域有效且普遍的技术手段。例如在海关检验检疫工作中针对外来入侵种或其他有害物种的检疫，如果能构建一套涉及所有有害物种的 DNA 条形码芯片系统，并且有从各不同物种中提取基因组 DNA 的相应技术方法，相比较于目前的传统形态学鉴定可大幅度提高鉴定速度和鉴定准确率，避免相关检疫对象的蔓延给社会带来危害。在传统分类学发展的基础上，将生物技术与系统分类学进行结合，势必会带动生命科学的多元化发展，而由此提出的 DNA 条形码技术无疑也会成为 21 世纪生物分类学研究的必然趋势。

综上所述，DNA 条形码作为一种标准化的物种鉴定方法，由于具有可靠、快速、简便等优势使其在生物分类学、生物多样性研究、系统进化分析等领域具备了广阔的应用潜力及巨大的研究价值。随着 DNA 条形码技术的不断发展和完善，将会逐渐形成并建立针对不同物种的便捷的标准化测序系统，进而构建覆盖绝大多数已知物种的 DNA 条形码序列数据库，为物种鉴定或其他相关研究提供可靠的信息资源及数据支撑。

1.3 蜱螨分子系统学研究

蜱螨是一类体型微小的节肢动物，在分类学上属于蛛形纲 Arachnida、蜱螨亚纲 Acari，其下分为节腹螨目 Opilionacarida、巨螨目 Holothyrida、蜱目 Ixodida、中气孔目 Mesostigmata、绒螨目 Trombidiformes 和疥螨目 Sarcoptiformes 六个目。除节腹螨目、巨螨目和蜱目外，其余三目绝大多数种类体型微小，一般体长在 1mm 以下。

由于这些螨类的体型很小、生活周期复杂、生境多种多样，某些种类的形态结构还存在种类变异现象，因此只是根据物种的外部形态特征对一些近源或相似的种类很难准确地进行区分^[37]。20 世纪分子生物学的发展突飞猛进，特别是在 80 年代中期聚合酶链式反应技术的出现以及 DNA 测序技术的产生，促进了分子生物学相关技术手段在物种分类与进化研究方面的应用^[38]。

随着分子生物学与生物技术的快速发展，一些新的技术方法也在不断地被引入到蜱螨的系统学和分类学研究中。DNA 标记作为一种新的分子生物学标记技术正越来越受到不同领域的生物学家的关注。DNA 标记从本质上来说是一段特定的 DNA 序列，它能够在一定程度上反应生物个体或者生物种群基因组的差异性，是一种准确有效的标记手段。目前在蜱螨系统学研究中常用的 DNA 标记技术有随机扩增多态性 DNA 技术（RAPD）、限制性片段长度多态性技术（RFLP）、微卫星技术（Microsatellite）以及核酸序列分析技术。

RAPD 技术是由美国学者 Williams 和 Welsh 等于 1990 年利用 PCR 技术发展起来的一种 DNA 多态性标记技术^[39]。RAPD 技术首先需要设计一段引物，这些引物通常都是随机性的寡核苷酸单链（一般由 8-10 个碱基组成），然后使用该引物对目的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，一般情况下退火温度要低于普通 PCR 扩增反应所需温度，扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳或 PAGE 电泳检测。随机引物在基因组 DNA 上具有不同的结合位点，通过 PCR 扩增之后，不同的结合结果由 RAPD 图谱显示。由于不同物种基因组的差异性，随机引物的结合位点就会不同，最终在 RAPD 图谱上就会表现为具有一定差异性的条带。因此，RAPD 图谱的差异情况可以反映研究基因组相应区域的 DNA 的不同^{[40][41]}。

RAPD 技术发展到今天，在蜱螨的系统学研究中已经有过不少的应用。Ylimattila 等人于 2000 年对芬兰真缓螨（*Euseius finlandicus*）进行了相关分析，

研究表明尽管有两种芬兰真绥螨外部形态结构非常相似但根据 RAPD 技术的分析结果，它们仍然是两个不同的品系^[42]。Rodrigues 等人在 2004 年以细须螨科（*Tenuipalpidae*）中的紫红短须螨（*Brevipalpus phoenicis*）为实验材料，这些紫红短须螨分别采集自美国佛罗里达州和巴西圣保罗，他们同时运用 RAPD 技术和核酸序列分析技术对其进行系统学研究，结果发现这两种不同的分析方法得出的结论基本上是一致的，即使紫红短须螨的采集地相距甚远，但是研究结果仍然支持它们为同一物种^[43]。赵岩在 2011 年用 RAPD 技术对在人体内寄生的毛囊蠕形螨（*Demodex folliculorum*）和皮脂蠕形螨（*D. brevis*）以及在山羊体内寄生的山羊蠕形螨（*D. caprae*）进行亲缘关系的分析和分类学地位的确定，结果发现毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨虽然都是寄生于人体这一种宿主，但亲缘关系却比较远；皮脂蠕形螨和山羊蠕形螨虽然寄生宿主不一样，但亲缘关系反而更近^[44]。

从这些实际应用的效果可以看出 RAPD 技术具有以下几方面的优势：（1）运用 RAPD 技术研究的目的基因片段并不是固定的，可以对未知的基因组序列进行研究；（2）该技术操作相对简单，可以较短时间产生结果，同时对于基因组 DNA 的多态性检出率高，并且可以自动分析，应用前景广阔。

RFLP 技术首先需要使用特定种类的限制性核酸内切酶对基因组 DNA 序列进行酶切处理，由于不同种类的生物个体，其基因组 DNA 序列具有差异性，因此同一种限制性核酸内切酶会有不同的酶切位点，在进行酶切处理后，会产生具有种群特异性的 DNA 序列片段，依据酶切产生的 DNA 片段的差异性，就可以构建多态性酶切图谱。酶切图谱的差异情况可以反映出研究基因组相应区域 DNA 序列的不同。PCR-RFLP 技术出现的时间稍晚，是研究人员在传统 RFLP 技术的基础上的一种改进，区别是 PCR-RFLP 技术首先需要设计特异性引物，然后利用设计的引物对研究基因组的特定基因片段进行 PCR 扩增，最后再进行 RFLP 技术的相关分析。

PCR-RFLP 技术可以对基因组内的变异进行检测，在使用过程中不会受到待测物种的发育阶段的影响，目前在蜱螨系统进化研究中获得了比较广泛的应用。Wong 等人在 2011 年基于 ITS 2 基因建立了 PCR-RFLP 方法用来鉴定与分析腐食酪螨（*Tyrophagus putrescentiae*）、椭圆食粉螨（*Aleuroglyphus ovatus*）、屋尘螨（*Dermatophagoides pteronyssinus*）、粉尘螨（*D. farinae*）和热带无爪螨

(*Blomia tropicalis*) 这五种螨类, 研究表明基于 ITS 2 基因建立的 PCR-RFLP 技术可以成功地将这些螨种区分开来^[45]。Bouned 等人在 2014 年基于 COI 基因建立的 RCR-RFLP 方法, 可以准确快速且相当方便地检测瘿螨总科 (Eriophyoidea) 下的羽瘿螨科 (Juniperinus) 在树芽中的大致分布情况, 这在农业上将会有效促进对树芽害螨的防治^[46]。崔玉楠等在 2014 年依据 ITS 基因建立了 PCR-RFLP 方法同时结合了形态学特征研究手段, 对叶螨科 (Tetranychidae) 内不同的 6 种叶螨: 二斑叶螨 (*Tetranychus urticae*)、皮氏叶螨 (*T. piercei*)、卢氏叶螨 (*T. ludeni*)、神泽氏叶螨 (*T. kanzawai*)、截形叶螨 (*T. truncatus*) 和豆叶螨 (*T. phaselus*) 进行分析与鉴定, 结果发现联合形态学研究方法以及 ITS 基因的 PCR-RFLP 技术手段能够将这 6 种叶螨准确地鉴定出来^[47]。

PCR-RFLP 技术可以在分子水平上反应基因组 DNA 的差异, 结果稳定且可重复, 具有较高的可信度。同时由于该技术在种群多态性研究时含有较大的信息量, 所以在分析生物系统进化关系以及绘制群体遗传图谱时会显示出更加重要的应用价值。

微卫星序列 (Microsatellite) 又被称为短串联重复序列 (short tandem repeats) 或简单重复序列 (simple sequence repeats)。在真核生物的基因组 DNA 重复序列中, 微卫星 DNA 序列占主要部分。每个微卫星 DNA 都由两部分组成, 分别是核心序列和侧翼序列, 其中核心序列由重复单元串联重复排列, 每个重复单元只含有几个碱基 (一般为 2-6 个), 这些重复单元相互之间没有间隔, 整个核心序列的长度短的只有几十 bp 而长的会达到几百 bp 甚至更多。侧翼序列为单拷贝序列, 通常侧翼序列具有特异性同时具有较高的保守性, 一般位于核心序列的两端, 侧翼序列可以使微卫星特异地定位于染色体常染色质区的特定部位。微卫星标记的原理是根据保守性较高的侧翼序列设计特异性引物进行 PCR 扩增, 然后根据 PCR 扩增产物的差异情况反映微卫星序列的不同^[48]。

虽然微卫星序列通常被认为在真核生物基因组中普遍存在^[49], 但是已有的研究结果却发现, 节肢动物基因组中微卫星序列的含量比较少, 实际应用时开发的难度较大^[50]。Evans 等人在 2007 年对大峰螨 (*Varroa jacobsoni*) 的基因组进行分析与比较, 得到了 9 个微卫星位点^[51]。随后 Evans 等在 2008 年又进一步证明了微卫星标记技术能够对该螨的系统进化与遗传结构进行研究^[52]。我国学

者李婷在 2008 年使用微卫星标记对朱砂叶螨 (*T. cinnabarinus*) 和二斑叶螨 (*T. urticae*) 的遗传结构与序列差异进行了研究, 在比较了两者的基因序列差异之后, 又对两者的亲缘关系进行了分析, 这为今后的叶螨防治工作提供了分子数据的支持, 具有重要的理论意义^[53]。魏丹丹等在 2016 年构建了柑橘全爪螨 (*Panonychus citri*) 的微卫星富集文库, 进而发掘柑橘全爪螨基因组内微卫星序列, 同时还利用柑橘全爪螨转录组数据库, 筛选其功能微卫星 (EST-SSR) 分子标记, 随后设计了柑橘全爪螨微卫星序列引物并验证了引物的适用性, 这些工作进一步加深了我们对于蜱螨微卫星序列的理解^[54]。

通过这些研究成果可以看出微卫星技术具有如下一些优点: 操作简单、数据可靠、应用面广, 由于在基因组中微卫星序列多态性较高而且等位基因数目多同时呈共显性遗传, 所以在后续进行相关分析时效率会比较高, 结果也更加准确。

核酸序列分析技术从原理上来说是一种通过比较不同生物个体基因组 DNA 同源核酸序列之间的差异性然后进行综合分析的技术方法。由于不同物种之间基因组 DNA 是不同的, 根据不同物种之间基因组 DNA 核酸序列的差异情况, 可以构建系统进化树, 并推断不同生物类群之间的进化关系。在真核生物中, 大约有 95% 的 DNA 存在于细胞核内, 剩余的 5% 左右的 DNA 存在于细胞质中, 这些剩余的 5% 左右的 DNA 主要存在于细胞质中的线粒体和叶绿体中。当利用核酸序列在不同的分类阶元进行相关分析时, 依据分类阶元选取合适的基因片段进行分析非常重要。一般情况下研究高级阶元时选取进化速率较慢的基因, 研究低级阶元或同一物种不同地理种群时选取进化速率较快的基因。从目前已经发表的研究成果来看, 在蜱螨的核酸序列分析中常用的基因主要是: 核糖体基因和线粒体基因。

在蜱螨的核酸序列分析中, 经常使用的核糖体基因有 18S rDNA、28S rDNA 等。李国庆等人在 2010 年对叶螨科 6 个属 11 个物种的系统发育关系进行研究时选取了 28S rDNA 的 D1 和 D2 区段进行分析, 结果表明根据形态特征划分的全爪螨属 (*Panonychus*)、裂爪螨属 (*Schizotetranychus*)、缺爪螨属 (*Aponychus*)、叶螨属 (*Tetranychus*)、双叶螨属 (*Amphitetranychus*) 和岩螨属 (*Petrobia*) 6 个属分别形成一个单系, 但是叶螨属内二斑叶螨 (*T. urticae*)、朱砂叶螨 (*T. cinnabarinus*)、神泽叶螨 (*T. kanzawai*)、截形叶螨

(*T. truncatus*) 和土耳其斯坦叶螨 (*T. turkestanii*) 这五种叶螨以及全爪螨属内苹果全爪螨 (*Pa. ulmi*) 和柑橘全爪螨 (*Pa. citri*) 这两种全爪螨的分类学地位没有被很好地确定。这说明虽然 28S rDNA 序列的 D1 和 D2 区段不能很好地将这些螨类准确鉴定到种, 但在属水平上的鉴定却表现出了不错的鉴定效果^[55]。张素卿等在 2011 年使用 18S rDNA 序列和 28S rDNA 序列对肉食螨亚科内 4 种常见螨类: 强壮肉食螨 (*Cheyletus fortis*)、转开肉食螨 (*C. aversor*)、马六甲肉食螨 (*C. malaccensis*) 和鳞翅触足螨 (*Cheletomorpha lepidopterorm*) 的系统发生关系进行分析, 结果却发现强壮肉食螨与马六甲肉食螨是同一物种^[56]。Dabert 等人也在 2014 年依据 28S rDNA 序列的第二结构域 (D2) 和线粒体 COI 基因序列对异羽螨科 (Alloptidae) 两属的分类学地位与系统进化关系进行了分析, 并取得了良好的效果^[57]。

利用核糖体基因序列对蜱螨进行核酸序列分析时比较常用的序列片段还有转录间隔区 ITS 序列。Navajas 等人早在 1992 年就已经将 ITS 2 基因序列运用到蜱螨的系统学研究中^[58]。古小彬等人在 2009 年使用 ITS 2 序列对动物寄生螨类中的痒螨属 (*Chorioptes*) 和疥螨属 (*Sarcoptes*) 的一些常见种类进行了系统发生学研究^[59]。邹志文等人在 2011 年利用 ITS 1 基因序列和 ITS 2 基因序列对钝绥螨亚科 (*Amblyseiiinae*) 进行了系统进化分析, 探讨这两段序列作为分子标记应用于钝绥螨种类鉴定的可能性。在应用这两个分子标记对钝绥螨不同螨种的亲缘关系进行分析之后, 结果支持卵圆真绥螨 (*Euseius ovalis*) 和尼氏真绥螨 (*E. nicholsi*) 现在的分类学地位, 但钝绥螨属 (*Amblyseius*) 与小新绥螨属 (*Neoseiulus*) 可能并没有达到不同属之间的差异程度, 这表明这两个属之间的系统进化关系还有待于进一步的研究^[60]。

线粒体是真核生物细胞中由双层高度特化的单位膜围成的细胞器, 其主要功能是通过氧化磷酸化作用合成 ATP, 为细胞的各种生理活动提供能量。线粒体具有的一个显著特点是, 它本身就含有遗传物质 DNA 而且还具有自己的一套遗传体系, 这一点与叶绿体类似, 但明显不同于其他的细胞器。自 20 世纪 60 年代线粒体基因组被发现以来, 由于其分子量相对于核基因组明显更小而且遗传方式呈母系遗传同时线粒体基因突变率相对更高并且在细胞中基因拷贝数量更多等等特点, 线粒体基因组逐渐受到了进化生物学家们的格外青睐^[61]。目前线粒体基因组已经被广泛应用于种群遗传学、生物地理学、分子进化、系统发

生以及进化基因组学等多方面的研究当中，极大地加深了人们对于物种起源与系统进化的现象、过程以及机制的理解^[62]。近些年来，随着分子生物学技术的日趋成熟以及新一代测序技术的快速兴起，许多动物的线粒体基因组的测序工作得以顺利完成^[63]。线粒体基因组与单个线粒体基因相比不仅仅是包含更多的基因序列信息，更重要的是线粒体基因组具有一系列基因组水平上的特征，如基因排序、RNA 基因的二级结构以及 DNA 复制和转录的控制模式等等^[64]。因此，线粒体基因组作为 GenBank 数据库中数量最多的“全”基因组序列信息，为进化生物学家利用核酸序列解析各不同生物的系统进化机制提供了很好的材料。

目前线粒体基因已经广泛应用于真螨总目的系统进化研究中，常见的线粒体基因有 ND1、ND2、COI、12S rDNA 和 16S rDNA 等。这些线粒体基因为理解真螨总目各螨类种群之间的系统进化关系提供了新的分子生物学证据。

在蜱螨的核酸序列分析中使用较多的线粒体基因有 16S rDNA、12S rDNA 和 COI 基因。De RM 等人在 2001 年基于 16S rDNA 基因序列分析了 6 种鼻刺螨及两个亚种的系统进化关系，结果显示 6 种鼻刺螨可以被明显分为两大类群，这个结果与依据形态特征的传统分类结果是一致的，并且通过序列之间的差异情况还可以对两个亚种进行鉴定，这些事实说明 16S rDNA 序列可能比较适合对亲缘关系较近的种类进行系统发育研究^[65]。Skerratt 等人在 2002 年对来自不同宿主的疥螨的 12S rDNA 基因序列进行了研究，结果发现，基于 12S rDNA 序列能够将不同宿主的疥螨明显地区分开，这表明 12S rDNA 比较适合疥螨的分子鉴定研究^[66]。Suarez-Martinez 等人在 2005 年也以 12S rDNA 基因序列为依据分析了尘螨类的屋尘螨 (*D. pteronyssinus*)、私食甜螨 (*Glycyphagus privatus*)、椭圆食粉螨 (*A. ovatus*) 和热带无爪螨 (*Blomia tropicalis*) 的分类学地位与系统发育关系，为尘螨中部分螨种的分子鉴定提供了理论依据^[67]。Sastre 等人在 2012 年使用线粒体基因组中的 16S rDNA 序列分析了三种犬蠕形螨的系统发育关系，也取得了较好的效果^[68]。

我国学者程剑等人在 2008 年利用线粒体 COI 基因比较详细地研究了蚌螨的系统进化，从基因序列上对部分蚌螨进行了比较深入的系统进化研究^[69]。Yang 等人在 2011 年联合使用 ITS 2 基因序列和 COI 基因序列分析了无气门亚目 (Astigmata) 6 种螨类：椭圆食粉螨 (*A. ovatus*)、热带无爪螨 (*B. tropicalis*)、粉尘螨 (*D. farinae*)、屋尘螨 (*D. pteronyssinus*)、腐食酪螨 (*T.*

putrescentiae) 和梅氏嗜霉螨 (*Euroglyphus maynei*) 的系统发育关系, 研究结果证实了 ITS 2 基因和 COI 基因可以作为可靠的分子标记分析这些螨类的系统发育关系^[70]。古小彬等人在 2013 年报道的兔痒螨部分线粒体基因序列, 这些序列数据无疑也为痒螨分子分类学的进一步研究与发展奠定了基础^[71]。

分子标记技术的不断发展为蜱螨系统学的研究提供了新的研究手段, 以上介绍的几种分子标记技术的应用, 使蜱螨的系统进化研究建立在稳定可靠的分子数据基础之上, 同时这也在很大程度上提高了蜱螨分类学研究的效率和准确性^[72]。

这些 DNA 分子标记技术中, 核酸序列分析技术成为当前蜱螨系统学研究中的热门分子标记手段。在核酸序列分析技术中, 基因片段的选择尤为重要, 不同的分类阶元、不同的研究目的, 往往适用的基因片段也是不同的, 所以在选择基因序列时要特别慎重。核酸序列分析技术经过这么多年的蓬勃发展, 如今也已经有了一些相对成熟的应用方法, 部分蜱螨的基因组序列也已经被成功测定, 这些事实与成就都可以证明核酸序列分析技术的稳定可靠与广阔发展前景。然而在实际应用过程中, 如果仅仅依靠这些分子标记技术, 还是会出现分子标记技术所分析的结果与传统形态学研究的结果不一致的情况, 此时采取基于形态学与分子标记技术相结合的研究手段对蜱螨的系统学进行综合性研究不失为一种可靠的方法^[73]。随着分子标记技术的不断改进与发展, 我相信分子标记技术还将会在蜱螨系统学的研究中得到更广泛的应用。

1.4 甲螨分子系统学研究

甲螨的分子系统学研究起始于 21 世纪初, Maraun 等人在 2004 年基于核苷酸序列构建了甲螨这一类群的第一个分子系统树, 他们选取了 28S 基因序列的 D3 扩展区片段以及侧翼的核苷酸序列分析了甲螨有性生殖和无性生殖代表性种类的系统发生^[74], 随后 Maraun 等人在 2009 年研究关于甲螨树栖生活的趋同进化时基于 18S 基因序列再次构建了部分甲螨的系统进化树^[75]。由于 DNA 条形码技术的迅速发展以及测序技术的不断改进与优化, 最近几年以甲螨为研究对象的分子鉴定和系统进化研究逐渐多了起来, Lehmitz 等人在 2017 年探讨了 28S 基因序列的 D3 区域作为分子标记在甲螨中进行物种鉴定的应用潜力^[76], Schäffer 等人在 2018 年测序并组装完成了 *Paraleius leontonychus* 线粒体全基因

组，这是第二个组装完成的甲螨线粒体全基因组序列^[77]，Pfungstl 等人在 2018 年基于 COI、18S、EF-1 α 三段基因序列并联合形态学特征研究了在安达曼海和马六甲海峡潮间带生存的甲螨的系统学、遗传学以及生物地理学^[78]。

1.5 研究目的和意义

自 Hebert 在 2003 年提出 DNA 条形码技术以来，传统的基于形态学的生物分类学研究遭遇了前所未有的挑战。这不仅表现在形态学鉴定的速度远远落后于分子鉴定，而且根据外部形态结构进行物种鉴定的结果也受到了不少人的质疑。而分子鉴定是根据生物基因组 DNA 进行数字化鉴定，一次性可以对大批量的样本进行实验，而且不存在形态鉴定的主观误差，具有更高的客观性。随着 21 世纪生物学的迅猛发展，越来越多的生物学研究需要对生物个体进行准确的种类鉴定，此外还有很多生产应用部门，例如海关、疾控中心等，需要对目标生物进行快速准确的物种鉴定，这些工作无一不需要大量的生物分类学人才，但是目前生物分类学专家的人数远远不能满足如此巨大的物种鉴定需求。因此，许多学者将目光放到了利用 DNA 序列进行物种的分子鉴定上来，期望分子鉴定的发展和应用可以解决这些难题。

在分子鉴定技术 20 年左右的发展历程中，许多生物类群都已经广泛采用 DNA 序列对物种进行准确的分子鉴定，但是甲螨的分子鉴定研究仍然比较落后。首先，甲螨并不像其他生物那样可以很容易地提取出其基因组 DNA，因为甲螨体型微小且具有较为坚硬的体壁，如果采取彻底粉碎研磨标本的做法，虽然可以提取出甲螨的基因组 DNA，但是这样就不能保存原始凭证标本，从而导致无法将分子数据与形态特征数据准确对应起来。这不仅会影响甲螨的传统形态学研究，也会使人们对已经得到的甲螨 DNA 分子数据的可信度提出质疑。所以，研究如何在保存甲螨外部形态特征的基础上提取出其 DNA 序列是一项具有重要意义的工作。

在已经得到甲螨基因组 DNA 利用序列片段鉴定物种时，一项非常关键的工作就是分子标记的选取。由于甲螨分子鉴定研究起步较晚，目前还没有公认的可以对甲螨不同类群进行准确区分的分子标记，且相同的分子标记在不同生物类群中的进化速率也不完全相同，所以并不能简单地套用在其他生物类群中已经取得良好使用效果的分子标记。为此，本研究选取了目前在分子鉴定中获得

广泛应用的两段 DNA 序列作为分子标记，探讨这两段分子标记在甲螨物种鉴定中的可行性与有效性。

第二章 无损 DNA 提取技术在甲螨中的应用

2.1 引言

甲螨是一群形态结构、生活习性和生存环境多种多样的小型节肢动物。大部分甲螨栖息于土壤腐殖质中，体型微小（0.1-1mm），数量众多。其生活史包括卵、幼虫、第一至第三若螨和成螨，多数甲螨种类还具有较厚的体壁。

由于甲螨具有较小的个体、复杂的生活周期等特点，某些甲螨种类形态结构还存在种内变异现象，因而仅仅依靠甲螨的外部形态特征很难准确区分甲螨中的一些近源种类或相似种类。20 世纪在分子生物学领域发生的革命性变化，尤其是 80 年代中期聚合酶链式反应技术以及 DNA 测序技术的产生与发展，极大地促进了分子生物学在物种分类与进化研究方面的应用。进入 21 世纪，分子分类技术^[79]和 DNA 条形码技术等新研究手段的出现，以及相关技术在生物多样性研究中的广泛应用再一次大大推动了各个生物类群的分子分类学研究工作。一般而言，在进行上述相关研究时，往往首先需要提取生物的 DNA。但是，绝大多数甲螨种类个体微小，通常只有几百微米，从甲螨个体提取 DNA 而又不损伤其外部形态结构特征非常困难，从而使得分子分类学在甲螨多样性研究中尚未得到很好地应用，也给基于 DNA 序列的甲螨分子鉴定带来了不小的困难。

以往螨类的 DNA 提取方法多数情况下是取多头同一物种的螨类个体，将这些标本彻底粉碎研磨，以便于在之后的实验中获得足够的 DNA。但是这种 DNA 提取方法在甲螨研究的实际应用中面临着极大的障碍：甲螨物种众多，从一个生境中采集到的甲螨一般不止一种；甲螨形态特征多样且不易观察；大多数甲螨种类体表高度骨化。依据形态特征对甲螨进行物种鉴定时，必须对标本进行透明（一般为浸泡在乳酸中一周至一个月时间）后在显微镜下观察。可是经过这些步骤处理后的甲螨标本就很难再从中提取 DNA 了。为了保证甲螨的 DNA 分子数据与形态学鉴定所对应标本的一致性，只能先提取甲螨的 DNA，并尽可能保留其形态结构特征，然后再进行传统的形态学鉴定与研究^[80]。

为了解决这些问题，近年来有不少学者曾尝试探讨过保存凭证标本的无损 DNA 提取技术。高艳等人在 2014 年研究并改进了小型节肢动物无形态损伤的 DNA 提取方法^[81]；单振菊等人也在 2017 年研究过一种具厚几丁质外壳的微小节

肢动物无损伤 DNA 提取方法^[82]。不过他们研究的方法并非专门针对甲螨这一类群，在甲螨中的应用效果并不是很理想。国外也有学者做过这方面的研究，例如 Ota 等^[83]以及 Ahaniazad 等^[84]，他们虽然针对甲螨无形态损伤的 DNA 提取方法进行过探讨，并取得了一定的进步，但 Ota 等的方法只在某些甲螨类群（卷甲螨科 Phthiracaridae、洼甲螨科 Camisiidae 和长单翼甲螨科 Protoribatidae）中可以提取出足够的 DNA，不能在所有的甲螨 DNA 提取中取得良好的效果，而 Ahaniazad 等提供的方法需要自己配制试剂，这与应用商品化的 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取相比将会更加耗时，特别是当样本量非常多时，显然会耗费大量的时间，而且自己配制试剂进行 DNA 提取也不容易保证 DNA 质量的稳定性。

因此，非常有必要在无形态损伤的甲螨 DNA 提取方面继续改良技术。

本研究在前人研究的基础上，结合了试剂盒 DNA 提取法，提出一套针对甲螨无形态损伤的高效 DNA 提取方法。

2.2 材料试剂

2.2.1 实验材料

甲螨标本的获得

(1) 在北京奥林匹克森林公园柏树林下采集土壤样本，将土样放在布氏漏斗（Berlese-Tullgren funnel）中，自然风干 120 小时，并在布氏漏斗底部放一个盛有 30 ml 无水乙醇的 200 ml 烧杯用来收集甲螨标本，在收集过程中需及时向烧杯中补充无水乙醇，防止挥发导致无水乙醇的总量过低，影响甲螨的收集。120 小时之后，取出布氏漏斗底部的烧杯，将烧杯中收集到的甲螨标本在体视显微镜下查看，挑选数头外部形态特征相同的个体，通过蒸馏水清洗后，将这些甲螨标本编号为 A 组，保存于 95%乙醇中。

(2) 在内蒙古大青山自然保护区的森林土壤下，取土壤表层 5cm 左右的腐殖质，用布氏漏斗烘烤 12 小时，将布氏漏斗底部收集到的甲螨标本在体视显微镜下挑选数头外部形态特征相同的个体，通过蒸馏水清洗后，将这些甲螨标本编号为 B 组，保存于 95%乙醇中。

(3) 在甘肃祁连山自然保护区的森林中，取地表腐殖质，用布氏漏斗烘烤 12 小时，将布氏漏斗底部收集到的甲螨标本在体视显微镜下挑选数头外部形态特

征相同的个体，通过蒸馏水清洗后，将这些甲螨标本编号为 C 组，保存于 95% 乙醇中。

2.2.2 实验试剂

0.05 mol/L pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液；**QIAGEN 组织和血液 DNA 提取试剂盒**；几丁质酶 Chitodextrinase（上海源叶生物科技有限公司）；PCR 聚合酶 mix（Takala 公司）；琼脂糖（Biowest 公司）；TAE 缓冲液（Solarbio 公司）。

2.2.3 实验仪器和设备

PCR 扩增仪（Mastercycler 型，购自 Eppendorf 公司）

台式离心机（Centrifuge 5424R 型，购自 Eppendorf 公司）

冰箱（KA92NE09TI 型，购自西门子公司）

紫外仪（WD-9430F 型，购自北京六一公司）

移液器（10 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l，购自 Eppendorf 公司）

分析天平（ME204 型，购自梅特勒-托利多公司）

电泳仪（DYY-11 型，购自北京六一公司）

微波炉（M1-L213B 型，购自美的公司）

涡旋振荡器（MX-S 型，购自赛洛捷公司）

数显恒温水浴锅（SYG-2 型，购自北利公司）

压力蒸汽灭菌锅（LDZF-50KB-H 型，购自上海申安有限公司）

电热鼓风干燥箱（DHG-9070A 型，购自上海一恒有限公司）

EP 管（购自 Eppendorf 公司）

2.3 实验流程/方法

2.3.1 甲螨材料的处理

（1）甲螨标本的清洗

用蒸馏水先对甲螨标本进行初步的清洗，然后将甲螨标本放进 80%乙醇中保存。

（2）甲螨体壁的初步消化

用 0.05 mol/L pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液将几丁质酶配制成浓度为 1.00mg/ml 的溶液。向 6 个灭过菌的 1.5 ml 离心管中分别放进一头 A 组收集的甲螨标本。向 6 个灭过菌的 1.5 ml 离心管中分别放进两头 B 组收集的甲螨标本。

向 6 个灭过菌的 1.5 ml 离心管中分别放进三头 C 组收集的甲螨标本。然后向三组 18 个装有甲螨样品的离心管中分别加入 100 μ l 1.00 mg/ml 的几丁质酶溶液。最后 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴大约 30 小时。

2.3.2 甲螨基因组 DNA 的提取

水浴 30 小时后，从水浴锅中取出离心管并将离心管内的几丁质酶溶液用移液器吸走，只保留甲螨标本在原离心管中，分别向 18 个离心管中加入 180 μ l 的 Buffer ATL，之后再分别向每个离心管里加 20 μ l 的蛋白酶 K，将离心管内的溶液用移液器小心混匀后，待甲螨沉入离心管混合溶液液面以下时，将离心管小心放进水浴锅中 55 $^{\circ}$ C 水浴 24 小时。次日取出离心管，分别向每个离心管中加入 200 μ l 的 Buffer AL，然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。水浴结束后，从水浴锅里取出离心管，向每个离心管里加入 200 μ l 的无水乙醇。用移液器将离心管内的液体充分混匀之后，将离心管内的所有液体全部转移到吸附柱内，并将离心管内存留的甲螨标本用蒸馏水冲洗干净后放入 80%乙醇中保存。将吸附柱放进离心机中 8000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，换上新的收集管，向吸附柱内加入 500 μ l 的 Buffer AW1，再将吸附柱放进离心机中 8000 rpm 离心 1 分钟，再次倒掉收集管中的废液，换上新的收集管，向吸附柱内加入 500 μ l 的 Buffer AW2，此时将吸附柱放进离心机中 14000 rpm 离心 4 分钟。最后将收集管中的废液倒掉之后，将收集管换成灭过菌的离心管，向吸附柱内加入 100 μ l 的 Buffer AE，将吸附柱与离心管套紧后，放进离心机中 8000 rpm 离心 2 分钟。舍弃吸附柱，在 -20 $^{\circ}$ C 保存离心管内的 DNA 模板。

2.3.3 提取总 DNA 效果检测与测序

(1) PCR 扩增反应

PCR 反应体系：正反向引物各 1 μ l，PCR Master Mix 15 μ l，ddH₂O 10 μ l，DNA 模板 3 μ l。扩增反应引物如下：正向引物 bcdF01: 5'-CAT TTT CHA CTA AYC ATA ARG ATA TTG G-3'；反向引物 bcdR04: 5'-TAT AAA CYT CDG GAT GNC CAA AAA A-3'^[85]；引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增的反应条件如下：96 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟，95 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，50 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，运行 40 个循环；然后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟；最后 4 $^{\circ}$ C 保存 PCR 扩增产物。

PCR 反应体系：正反向引物各 1 μ l，2 \times Buffer 15 μ l，MightyAmp 0.5 μ l，ddH₂O 9.5 μ l，DNA 模板 3 μ l。扩增反应引物如下：正向引物：D2-3549：5'-AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG-3'；反向引物：D2-4068：5'-TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G-3'；引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增的反应条件如下：98 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟，98 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 15 秒，68 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，运行 35 个循环；然后再 68 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟；最后 4 $^{\circ}$ C 保存 PCR 扩增产物。

(2) PCR 反应产物检测

每个样本取 5 μ l PCR 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳，结果用凝胶电泳成像系统观察。

(3) 测序及比对

将电泳分析有目的条带的 PCR 产物原液送北京华大基因组测序部进行常规纯化双向测序。为了验证本实验所提取的 DNA 确实是来自于甲螨的 DNA，将测序所得结果与 GenBank 数据库进行 Blast 比对，以确定 PCR 扩增序列以及 DNA 模板是否正确。

2.3.4 玻片标本的制作

将经过本次 DNA 提取实验的甲螨标本与未进行 DNA 提取实验的甲螨标本分别制作成玻片标本在显微镜下进行形态对比。

本研究涉及到以下两种玻片制作方法：

(1) 永久玻片制片法：主要原理是利用可以长时间保存的封固液对制作的玻片标本进行封装，使标本能够以永久玻片的形式长期保存。

在凹形载玻片中央滴加一滴霍氏封固液 (Hoyer's medium)，将已经用蒸馏水清洗干净的标本轻轻放入凹形载玻片中央凹槽的封固液中，用细小的解剖针在体视显微镜下小心调整甲螨标本的姿势，然后盖上盖玻片，将玻片放到相对干燥的地方进行自然风干凝固。由于霍氏封固液是水溶性介质，比较容易吸收空气中的水分而使封固液出现溶解，在温度升高时会使封固液发生挥发，进而造成空胶现象。因此，在玻片完全干燥后，还需要在盖玻片的周围涂抹少量防水介质绝缘漆，也可以使用加拿大胶等其他具有防水特性的介质。

永久玻片一旦制作完成，可以非常方便地随时对玻片标本进行镜检。但是有一些甲螨类群的鉴别特征，需要在甲螨标本处于不同姿势时才能观察到，而固定玻片由于已经封固无法再次调整甲螨标本姿势，所以有时为了更精确地对甲螨标本进行形态观察与分类学鉴定，还需要制作临时玻片对标本进行进一步地检视与鉴定。

(2) 临时玻片制作法：滴一滴乳酸在凹形载玻片凹槽的一侧，将盖玻片轻轻盖在乳酸液滴上，缓慢移动盖玻片使盖玻片与凹形载玻片凹槽之间的空气被乳酸溶液挤压出去使得两者之间充满乳酸，再将已经用蒸馏水清洗好的甲螨标本小心放进乳酸中，然后在体视显微镜下轻轻移动盖玻片，对甲螨标本的位置与姿势进行调整，待调整好玻片标本的最佳观察状态后，立即将临时玻片转移到显微镜下进行进一步地观察，观察结束后，将甲螨标本取出，用蒸馏水清洗干净后放入 80%乙醇中保存，以便下一次继续观察。

2.4 结果与讨论

2.4.1 DNA 序列分析结果

将测序所得的结果与 GenBank 数据库进行比对，比对结果显示本次实验提取的 DNA 序列来源于 A 组甲螨样本的序列结果与甲螨亚目中的大翼甲螨科 Galumnidae 同源性最高；来源于 B 组甲螨样本的序列结果与甲螨亚目中的角翼甲螨科 Achipteridae 同源性最高；来源于 C 组甲螨样本的序列结果与甲螨亚目中的尖棱甲螨科 Ceratozetidae 同源性最高。故可据此初步判定此次实验提取的 DNA 确实是来自于甲螨。三组甲螨样本分别来自于甲螨亚目中三个不同的科。但由于 GenBank 数据库中缺少目标种类的 DNA 序列数据，所以造成数据库已有序列与本次实验提取的 DNA 序列的相似度并不是很高。比对结果显示：数据库已有序列与 A 组甲螨样本的 DNA 序列的最高相似度为 86%、与 B 组甲螨样本的 DNA 序列的最高相似度为 95%、与 C 组甲螨样本的 DNA 序列的最高相似度为 93%，并不能达到精确的种水平的鉴定。

2.4.2 甲螨标本的形态对比

将提取完 DNA 之后保留下来的甲螨标本放在凹型载玻片上，滴上少许双蒸水，稍微调整甲螨肢体的姿势使其便于观察；轻轻盖上盖玻片，用吸水纸在载

玻片上吸收多余的水；稍等片刻，待甲螨标本在双蒸水中保持稳定，在显微镜下观察并拍照。

玻片检视结果显示：提取过 DNA 的甲螨标本并没有发生明显的形态学改变，其主要的分类学特征均保存完好，因此此标本可以作为凭证标本长期保存。观察结束后，将甲螨标本再次放入 80%乙醇中保存。

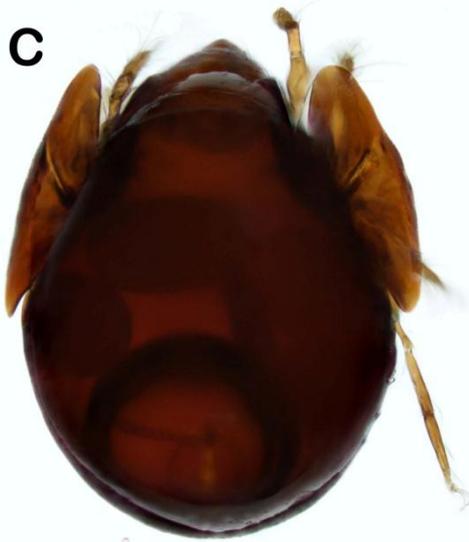


图 2-1 提取 DNA 的甲螨标本与未提取 DNA 的甲螨标本的形态对比图

Figure 2-1: The photographs of oribatid mites with DNA extraction and without DNA extraction

注：A, B: 腹面观；C, D: 背面观；E, F: 侧面观。A, C, E 为提取过 DNA 的甲螨标本；B, D, F 为未提取 DNA 的甲螨标本。比例尺=200 μ m。Note: A, B: Ventral view; C, D: Dorsal view; E, F: Lateral view. A, C and E: Specimen after being DNA extracted; B, D and F: Specimen without DNA extraction. Scale bar=200 μ m.

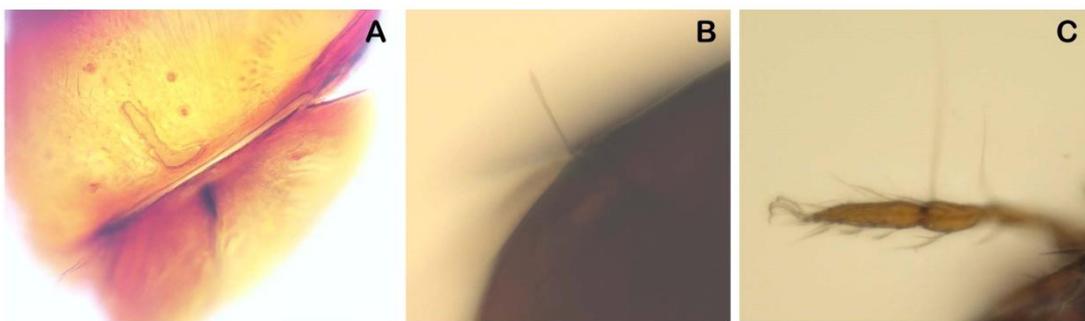


图 2-2 经过 DNA 提取之后的甲螨标本形态结构图

Figure 2-2: The photographs of morphological characters after being DNA extracted in oribatid mites

注：A: 孔区；B: 感器；C: 左足 I。比例尺=50 μ m。Note: A: Porose area; B: Bothridial setae; C: Leg I ,left. Scale bar=50 μ m.

2.4.3 讨论与展望

经过形态学鉴定，A 组样本里的甲螨标本是大翼甲螨科的显大翼甲螨中华亚种 *Galumna obvius sinensis*，这种甲螨的个体相对较大（体长 725-775 μ m，宽 525-550 μ m），使用此无损 DNA 提取方法，可以只用一头标本就能提取出足够的 DNA。B 组样本里的甲螨标本是角翼甲螨，这种甲螨的个体相对较小，使用此无损 DNA 提取方法，需要使用两头标本才能提取出足够的 DNA。C 组样本里的甲螨标本是尖棱甲螨，这种甲螨的个体最小，使用此无损 DNA 提取方法，需要使用三头标本才能提取出足够的 DNA。由此可以看出，虽然大翼甲螨可以只用一头标本就能够提取出可用于后续实验的足够的 DNA，但是角翼甲螨和尖棱甲螨需要使用两头或三头标本。经过对比实验发现，几丁质酶的浓度与水浴消化的时间，会对甲螨的 DNA 提取效率产生影响，当适当提高几丁质酶的浓度或延长甲螨的水浴消化时间，会提高甲螨 DNA 的提取效率。但是，为了在 DNA 提取之后还能保持甲螨标本的完整性，在用几丁质酶进行标本的初步消化时，还是应当控制好几丁质酶的使用浓度与标本的水浴消化时间，如果几丁质酶的浓度

过高或者水浴的时间过长，都会影响甲螨凭证标本的保存年限，甚至可能造成甲螨标本在实验过程中就发生明显破损。因此，为了对本实验方法进行更进一步的优化，可以对本次研究所用试剂的浓度和实验过程中相关理化条件的处理时间进行针对性地改进，以便取得更好的实验结果。

最近 20 年来，随着 DNA 条形码和分子分类学等新概念的提出，利用基因序列辅助鉴定物种已经越来越普遍了。许多分类学者都在积极地参与构建包含不同物种形态特征与分子数据的综合数据库。当前，虽然在各大数据库中也收录了一些甲螨物种的 DNA 序列数据，但是很多的 DNA 序列都没有凭证标本与之对应，这可能是由于很多情况下在进行 DNA 提取实验时已经将甲螨标本破坏了，只有一些在 DNA 提取之前借助显微镜拍摄的照片可供查阅、参考和比较。然而甲螨由于种类众多、形态特征多样、体型微小等因素影响，仅仅根据这些照片一般很难对这些标本进行重新检视与校正，与之对应的分子数据的应用价值和可靠性无疑会大打折扣，这些凭证标本的残缺或丢失在一定程度上也限制了甲螨分子生物学方面的相关研究。

目前对于甲螨的分子分类学工作者们而言，一个较为突出的难点就是如何将 DNA 分子数据与甲螨的形态特征数据准确无误地对应起来。在其他体型较大的动物类群中，通常采取的做法是取标本个体的一小部分来进行 DNA 提取，其余的部分作为凭证标本进行保存^[86]。甲螨个体微小，很难只取个体的一小部分进行 DNA 提取就能获得后续实验所需的足够的 DNA，况且甲螨一般具有较坚硬的体壁，在进行切取的时候很难保证不损伤重要的形态特征，实际操作中很容易造成甲螨整个个体都被破坏，从而导致后续无法再依据形态特征对甲螨进行物种鉴定。而使用本研究所提供的甲螨 DNA 提取方法，既能够获得足够的 DNA，而且还可以相当完好地保存凭证标本。这对于甲螨分子鉴定以及传统分类学的研究而言，无疑具有重要的意义。

第三章 分子标记在甲螨物种鉴定中的可行性探究

3.1 引言

甲螨的分类学研究历史悠久，早在 19 世纪，意大利的 Berlese 就记述过几种低等甲螨，同一时期英国学者 Michael 编研出版了关于甲螨的专著“*British Oribatidae*”。然而由于甲螨体型微小，绝大多数种类体型小于 1mm，并且大部分甲螨生活于土壤腐殖质中，不易采集，所以有相当长一段时间甲螨并没有被人们系统地研究。直到 20 世纪初，Berlese 发明了用于小型土壤动物收集的烘虫漏斗，十几年后，Tullgren 在 Berlese 发明的烘虫漏斗的基础上进行了改良，Tullgren 改良之后的烘虫漏斗极大地提高了小型土壤动物的收集效率，使得甲螨的标本采集效率得到了大幅度的提高，至此，甲螨的分类学研究进入了新的发展阶段。

甲螨的分类学研究虽然已经有着一百多年的历史，但是目前的研究手段主要还是依据显微镜对甲螨的外部形态进行观察，已经发表的甲螨分类学文章，大多数都是依据外部特征讨论相关物种的分类学地位或者基于形态结构对甲螨的种类进行鉴定。而分子生物学与生物技术的迅速发展，已经深刻影响到传统的生物分类学研究。目前，分子鉴定在一些节肢动物中已经得到了相当广泛的应用，并且取得了良好的效果。21 世纪初，DNA 条形码技术的提出，更是使研究人员可以在分子水平上进行物种的鉴定工作。DNA 条形码技术不仅可以极大地缩短物种鉴定的时间，并且能够避免传统形态鉴定存在的主观误差。因为 DNA 条形码是根据物种的 DNA 序列进行数字化鉴定，所以即使是没有分类学经验的研究人员，也能够通过序列比对将待定物种准确地鉴定出来。这也解决了目前分类学家的严重不足与越来越多需要进行物种鉴定的工作之间的矛盾。

“分子鉴定”这一新概念的提出已经有大约 20 年的时间了，虽然分子鉴定技术在昆虫研究中早已开展，使得大量的昆虫标本不再需要专业的昆虫学家进行形态学观察就可以通过 DNA 序列进行快速准确地鉴定。而且相关研究者还能够掌握不同物种的 DNA 序列片段数据之后通过不同的生物学软件选择合适的算法构建物种之间的系统进化树。但是目前来看，分子鉴定技术在甲螨研究中的应用还是相对落后的。

这主要有以下三个方面的原因：（1）甲螨的 DNA 提取相对其他生物来说更加困难；因为甲螨体型微小，并且多数种类具有较坚硬的体壁，使得 DNA 提取实验时化学试剂不容易进入甲螨体内，这严重影响了甲螨 DNA 提取的效率和成功率。（2）各大数据库中关于甲螨 DNA 序列的数据相当少；这部分原因是甲螨 DNA 提取难度较大造成的，还有可能是研究人员得到了甲螨的 DNA 序列数据，但是并不知道提取的 DNA 是来源于何种甲螨，因为常规的 DNA 提取实验是需要彻底粉碎标本的，凭证标本的缺失也造成了甲螨分子数据的研究成果难以像其他生物类群一样获得积累。（3）可以用于甲螨分子鉴定的成熟的分子标记很少；数据库中甲螨 DNA 序列片段的稀缺使得研究人员将更多的精力放到通过形态学特征进行种类的鉴定上去，但是随着分子生物学技术的进一步发展，势必会使生物个体的 DNA 提取效率再次得到提高，而数据库中甲螨的 DNA 序列数据也一定会在此基础上得到大幅度扩充。所以研究可用于甲螨分子鉴定的分子标记将会为未来分子鉴定技术在甲螨研究中的广泛应用奠定基础。

本次研究共涉及甲螨亚目下的四个科，分别是

礼服甲螨科 *Trhypochthoniidae*，其主要的分类学特征为：体中型至大型，骨化微弱。感器发达或退化。后背板毛 15 对。末体背腺大而明显。基节板毛式：3-1-(2-3)-2，生殖毛 5 至 20 对；侧殖毛退化。肛毛 1 至 2 对。肛侧毛 2 至 3 对。跗节爪 1 至 3 个。在我国主要分布于华北、华东、华中和华南地区。

尖棱甲螨科 *Ceratozetidae*，其主要的分类学特征为：前背板梁发达，内侧倾斜，梁顶端着生梁毛。感器短。后背板毛 10 至 15 对。翅形体较小，腹侧卷曲。生殖毛 6 对。在我国全国各地均有分布。

角翼甲螨科 *Achipteridae*，其主要的分类学特征为：前背板宽大，梁呈板条状，两梁相触或愈合，占据前背板一大部分。后背板翅形体固定不动，极度向前尖伸或横向平展。10 对后背板毛（或毛孔），具孔区或小囊。在我国全国各地均有分布。

大翼甲螨科 *Galumnidae*，其主要的分类学特征为：梁退化成梁脊线，亚梁线有或消失。后背板毛 10 对或仅具毛孔，翅形体发达，呈耳状，可活动，前端几乎与吻端水平，翅形体有饰纹，后背板具发达的孔区，生殖毛 6 对。在我国全国各地均有分布。

3.2 材料与试剂

3.2.1 实验材料

大翼甲螨科标本：采集自北京奥林匹克森林公园。

角翼甲螨科标本：采集自内蒙古大青山自然保护区。

尖棱甲螨科标本：采集自甘肃祁连山自然保护区。

礼服甲螨科标本：采集自乌拉山自然保护区。

3.2.2 实验试剂

DNA 提取试剂盒（购自 QIAGEN 公司）

PCR 聚合酶 mix（购自 Takala 公司）

DNA Marker（购自 Axygen）

Goldview 核酸染色剂（购自 Coolaber 公司）

琼脂糖（购自 Biowest 公司）

50×TAE（购自北京索莱宝 Solarbio 科技有限公司）

无水乙醇（购自国药集团化学试剂有限公司）

几丁质酶（购自上海源叶生物科技有限公司）

3.2.3 实验仪器和设备

PCR 扩增仪（Mastercycler 型，购自 Eppendorf 公司）

台式离心机（Centrifuge 5424R 型，购自 Eppendorf 公司）

冰箱（KA92NE09TI 型，购自西门子公司）

紫外仪（WD-9430F 型，购自北京六一公司）

移液器（10 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l，购自 Eppendorf 公司）

分析天平（ME204 型，购自梅特勒-托利多公司）

电泳仪（DYY-11 型，购自北京六一公司）

微波炉（M1-L213B 型，购自美的公司）

涡旋振荡器（MX-S 型，购自赛洛捷公司）

数显恒温水浴锅（SYG-2 型，购自北利公司）

压力蒸汽灭菌锅（LDZF-50KB-H 型，购自上海申安有限公司）

电热鼓风干燥箱（DHG-9070A 型，购自上海一恒有限公司）

EP 管（购自 Eppendorf 公司）

3.3 实验流程/方法

3.3.1 甲螨总 DNA 的提取

(1) 将供试甲螨放进培养皿中用蒸馏水进行初步的清洗，然后将不同种类的甲螨个体分装到 1.5ml 的 EP 管中，95%乙醇保存。

(2) 从不同的 EP 管中分别取每种甲螨的三头标本转移到灭过菌的 1.5ml 离心管中。为了防止甲螨的 DNA 提取实验结果不够理想，本次实验共设置三个重复组。

(3) 用 0.05 mol/L pH 值 6.0 的磷酸盐缓冲液将几丁质酶配制成浓度为 1.00mg/ml 的溶液，然后向若干个装有甲螨样品的 1.5ml 离心管中分别加入 100 μ l 1.00 mg/ml 的几丁质酶溶液。最后 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴大约 30 小时。

(4) 水浴 30 小时后，从水浴锅中取出离心管并将离心管内的几丁质酶溶液用移液器吸走，只保留甲螨标本在原离心管中，分别向所有的离心管中加入 180 μ l 的 Buffer ATL，之后再分别向每个离心管里加 20 μ l 的蛋白酶 K，将离心管内的溶液用移液器小心混匀后，待甲螨沉入离心管混合溶液液面以下时，将离心管小心放进水浴锅中 55 $^{\circ}$ C 水浴 24 小时。次日取出离心管，分别向每个离心管中加入 200 μ l 的 Buffer AL，然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。水浴结束后，从水浴锅里取出离心管，向每个离心管里加入 200 μ l 的无水乙醇。用移液器将离心管内的液体充分混匀之后，将离心管内所有的液体全部转移到吸附柱内，并将离心管内存留的甲螨标本用蒸馏水冲洗干净后放入 80%乙醇中保存。将吸附柱放进离心机中 8000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，换上新的收集管，向吸附柱内加入 500 μ l 的 Buffer AW1，再将吸附柱放进离心机中 8000 rpm 离心 1 分钟，再次倒掉收集管中的废液，换上新的收集管，向吸附柱内加入 500 μ l 的 Buffer AW2，此时将吸附柱放进离心机中 14000 rpm 离心 4 分钟。最后将收集管中的废液倒掉之后，将收集管换成灭过菌的离心管，向吸附柱内加入 100 μ l 的 Buffer AE，将吸附柱与离心管套紧后，放进离心机中 8000 rpm 离心 2 分钟。舍弃吸附柱，在 -20 $^{\circ}$ C 保存离心管内的 DNA 模板。

3.3.2 核糖体 28S 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系：正反向引物各 1 μ l，2 \times Buffer 15 μ l，MightyAmp 0.5 μ l，ddH₂O 9.5 μ l，DNA 模板 3 μ l。

扩增反应引物如下：正向引物：D2-3549：5'-AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG-3'；反向引物：D2-4068：5'-TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G-3'；引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增的反应条件如下：98℃预变性 2 分钟，98℃变性 10 秒，60℃退火 15 秒，68℃延伸 1 分钟，运行 35 个循环；然后再 68℃延伸 8 分钟；最后 4℃保存 PCR 扩增产物。

3.3.3 线粒体 COI 基因的 PCR 扩增

本次实验共选取了三对引物进行 PCR 扩增，引物序列分别是：

正向引物 A1：5'-TTT TCT ACH AAY CAT AAA GAT ATT GC-3'

反向引物 B：5'-TAT AAA CYT CDG GAT GNC CAA AAA A-3'

正向引物 A2：5'-TTT TCT ACH AAY CAY AAA GAT AT-3'

反向引物 B：5'-TAT AAA CYT CDG GAT GNC CAA AAA A-3'

正向引物 A3：5'-CAT TTT CHA CTA AYC ATA ARG ATA TTG G-3'

反向引物 B：5'-TAT AAA CYT CDG GAT GNC CAA AAA A-3'

所有的引物都由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系：正反向引物各 1μl，PCR Master Mix 15μl，ddH₂O 10 μl，DNA 模板 3μl。

PCR 扩增的反应条件如下：96℃预变性 3 分钟，95℃变性 10 秒，50℃退火 30 秒，72℃延伸 1 分钟，运行 40 个循环；然后再 72℃延伸 5 分钟；最后 4℃保存 PCR 扩增产物。

3.3.4 核糖体 28S 基因与线粒体 COI 基因的测序

将电泳分析有目的条带的 PCR 产物原液送北京华大基因组测序部进行常规纯化双向测序。

3.3.5 实验数据的处理和分析

分别将测序所得的 28S 序列片段以及 COI 序列片段在 GenBank 数据库中进行 BLAST 相似性搜索，以确定经过 DNA 提取和 PCR 扩增之后得到的是甲螨目的基因片段。

(1) 序列的比对：利用软件 ClustalX^[87]对测序所得序列片段进行初步处理，个别位点辅以人工校正。

(2) 序列组成分析：利用 MEGA7.0 软件^[88]统计序列的平均碱基组成和序列长度差异，不同序列之间的碱基转换/颠换值以及不同序列和不同密码子位点之间的碱基含量差异，并基于 Kimura 双参数模型 (Kimura-2 parameter) 计算遗传距离。

(3) 分子系统发育树的构建

以 *Ischyropsalis strandi* (GenBank 登录号为: KP224374.1) 为外群，采用 NJ 法 (Neighbor-Joining 邻接法)、ME 法 (Minimum Evolution 最小进化法) 和 UPGMA 法 (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean 非加权组平均法) 构建分子系统树。建树时参数设置为基于 Kimura 双参数模型 (Kimura 2-parameter) 进行计算，利用自展分析法 (Bootstrap Method, 重复次数为 1000 次)^[89]检验分子系统树各分支的置信度，并将序列中的转换和颠换位点均视为信息位点，而序列中的插入与缺失位点则成对删除。

3.4 结果分析

3.4.1 甲螨 28S 基因序列不同科间的比较分析

(1) 核苷酸组成及序列长度

用于分析的 6 条 28S 基因序列碱基 A、C、G、T 的平均含量分别为 21.3%、20.3%、29.5%、28.8%。其中碱基 A 和碱基 C 在所分析序列中的含量要明显低于碱基 G 和碱基 T。总共 6 条序列的长度几乎相等，只有几个 bp 的差异。6 条 28S 基因序列的碱基组成信息详见下表：

表 3-1 28S 基因序列碱基组成
Table 3-1 The Nucleotide Composition of 28S gene

类群	碱基 T	碱基 C	碱基 A	碱基 G	序列长度
Galumnidae	29.4%	19.8%	21.2%	29.6%	575bp
<i>Galumna obvius sinensis</i>	29.9%	19.5%	21.0%	29.6%	575bp
Ceratozetoidea	30.2%	18.9%	21.4%	29.5%	566bp
Achipterioidea	31.1%	18.5%	22.8%	27.6%	569bp
Trhypochthoniidae	26.5%	22.4%	21.2%	30.0%	567bp
<i>Ischyropsalis strandi</i>	26.0%	23.0%	20.0%	31.1%	566bp

Average	28.8%	20.3%	21.3%	29.5%	569.7bp
---------	-------	-------	-------	-------	---------

(2) 核苷酸位点分析

6 条序列排序得到 589 个碱基位点：其中有保守位点 276 个，变异位点 306 个，还有 69 个简约信息位点。

(3) 28S 基因的遗传距离分析

根据 Kimura 双参数模型 (Kimura 2-Parameter) 计算遗传距离 (Genetic Distance)，以自展分析法 (Bootstrap Method) 重复次数为 1000 次进行遗传距离的检验。得到 6 条序列两两之间的遗传距离，详细信息如下表所示：

表 3-2 28S 基因序列在种间的遗传距离
Table 3-1 The genetic distance of 28S gene among species

类群	1	2	3	4	5
1.Galumnidae					
2. <i>Galumna obvius sinensis</i>	0.0323				
3.Ceratozetoidea	0.1005	0.0982			
4.Achipterioidea	0.1607	0.1513	0.1124		
5.Trhypochthoniidae	0.2182	0.2296	0.2100	0.2412	
6. <i>Ischyropsalis strandi</i>	0.6128	0.6186	0.6536	0.7111	0.6666

3.4.2 基于甲螨 28S 基因序列构建的系统进化树

将 28S 基因序列输入到 MEGA7.0 软件中，选择 Kimura 双参数模型基于自展法检验 (Bootstrap Method, 重复次数为 1000 次) 构建系统进化树。

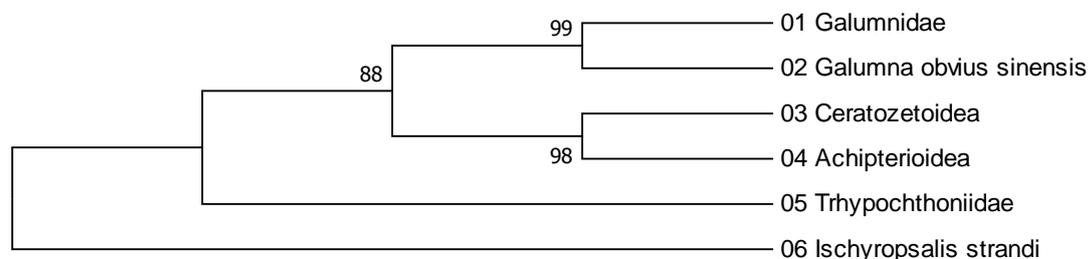


图 3-1 基于 NJ 法构建的系统进化树

Figure 3-1 The phylogenetic tree based on NJ method

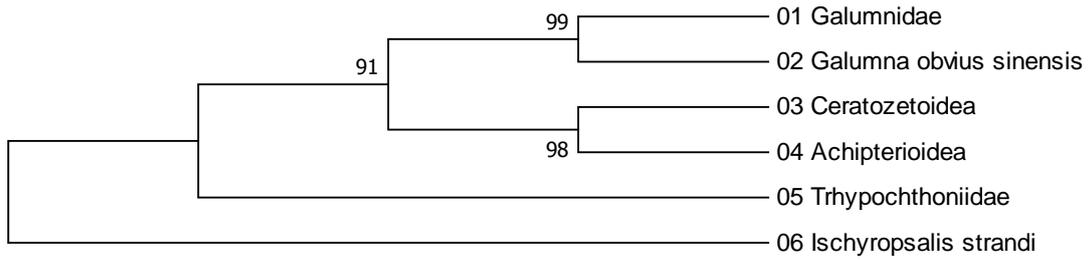


图 3-2 基于 ME 法构建的系统进化树

Figure 3-2 The phylogenetic tree based on ME meyhod

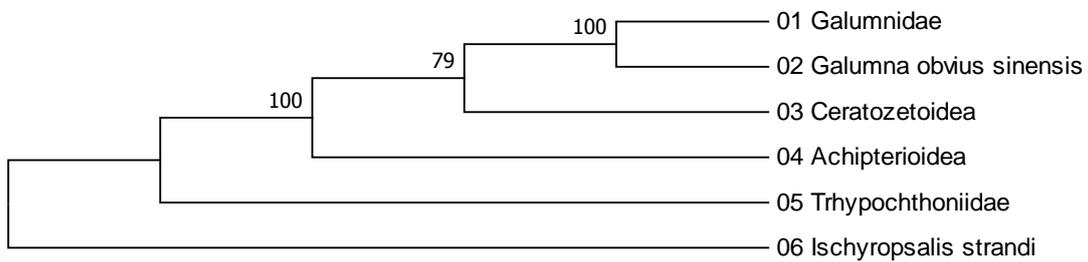


图 3-3 基于 UPGMA 法构建的系统进化树

Figure 3-3 The phylogenetic tree based on UPGMA method

如图所示，根据不同方法构建的系统进化树的拓扑结构一致性较高。

(1) 显著支持大翼甲螨科两物种聚为一支：NJ、ME 和 UPGMA 三种方法分析中 bootstrap 值分别为 99%、99%和 100%。

(2) 基于 NJ 法和 ME 法构建的系统进化树将尖棱甲螨与角翼甲螨聚为一支，且 bootstrap 值高达 98%，分析原因可能是由于尖棱甲螨和角翼甲螨有一定的亲缘关系，但在 UPGMA 法构建的系统进化树中并没有将尖棱甲螨与角翼甲螨聚为一支，因此这两者之间的关系还有待于进一步研究，在构建系统进化树时出现聚为一支的情况可能是由于参与分析的类群过少或序列片段的有效性不足造成的。

(3) 基于 NJ、ME、UPGMA 三种方法构建的系统进化树都将礼服甲螨与大翼甲螨、尖棱甲螨和角翼甲螨分开，分析原因可能是由于礼服甲螨与另外三种甲螨在 28S 基因序列上具有较大的遗传差异性。

3.4.3 大翼甲螨 28S 基因序列与 COI 基因序列的比较分析

使用 Dnaman 软件分别对测序所得的两种大翼甲螨的 28S 基因序列和 COI 基因序列进行拼接，而后使用 BioEdit 软件的 ClustalW Multiple alignment 程序分别对其进行多重序列比对。

28S 基因序列在大翼甲螨这两个物种之间的变异位点有 19 个，现将 28S 序列的变异位点列成下表：

表 3-3 28S 基因序列变异位点
Table 3-3 The Variable sites of 28S gene sequence

变异位点	145	146	180	190	191	206	273	278	280	315
种 1	C	G	T	T	C	G	C	T	G	A
种 2	T	A	C	G	T	A	T	G	A	G

变异位点	354	370	378	405	426	446	489	498	510
种 1	G	A	T	A	A	C	G	A	C
种 2	A	G	C	C	T	T	T	G	T

软件拼接结果显示大翼甲螨此段核糖体 28S 基因的序列长度为 575bp，其中有 556 个保守位点，有 14 个位点碱基发生变异是由于转换，有 5 个位点碱基发生变异是由于颠换，碱基发生转换的比例明显高于颠换。

COI 基因序列在大翼甲螨这两个物种之间的变异位点有 149 个，现将 COI 序列的变异位点列成下表：

表 3-4 COI 基因序列变异位点
Table 3-3 The Variable sites of COI gene sequence

变异位点	12	19	27	30	31	39	48	60	66	72
种 1	C	C	G	T	T	C	A	A	T	A
种 2	T	T	C	C	C	A	G	T	C	T

变异位点	75	76	79	81	84	87	90	102	103	105
种 1	A	A	C	C	C	T	G	A	A	T

种2	G	G	G	A	T	C	A	C	G	A
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

变异位点	108	114	120	124	126	132	138	144	147	150
种1	A	C	T	A	T	T	C	A	A	A
种2	G	A	G	G	A	C	T	T	G	T

变异位点	153	156	171	174	177	180	183	186	195	198
种1	T	G	A	T	A	A	T	T	T	A
种2	C	A	G	C	G	G	C	C	C	G

变异位点	201	213	219	222	223	225	231	240	244	246
种1	T	C	C	A	A	A	T	T	C	T
种2	C	A	A	G	C	G	C	C	T	G

变异位点	252	255	258	261	262	263	264	265	267	268
种1	A	A	A	G	T	T	T	C	C	C
种2	C	T	T	A	A	C	A	T	A	T

变异位点	270	273	279	282	288	289	291	293	297	299
种1	T	T	G	C	A	A	A	C	A	T
种2	A	A	A	A	T	G	C	T	G	C

变异位点	303	306	309	315	318	321	327	336	339	342
种1	A	T	T	G	T	T	C	G	C	A
种2	C	G	G	A	G	C	T	A	T	G

变异位点	348	351	352	354	355	356	357	363	366	372
种1	C	T	G	C	A	G	A	G	T	T
种2	T	A	A	A	T	T	T	A	C	A

变异位点	378	381	384	387	388	390	405	408	411	417
种1	C	A	T	C	T	A	C	T	A	C
种2	T	T	A	T	C	G	A	C	G	T

变异位点	423	432	435	450	459	460	465	474	477	480
种1	C	C	C	C	A	T	A	G	T	C
种2	T	T	T	T	T	A	T	A	C	T

变异位点	481	492	498	507	510	511	513	516	519	520
种1	T	A	T	T	C	A	C	A	T	T
种2	C	G	G	G	T	G	G	T	A	C

变异位点	522	523	525	528	529	534	537	543	546	555
种1	G	T	A	G	C	G	G	T	T	T
种2	T	C	T	T	T	A	T	A	G	G

变异位点	558	559	561	562	564	580	582	586	588	591
种1	G	C	A	T	A	A	T	A	G	C
种2	A	T	G	C	T	G	C	T	C	T

变异位点	594	597	603	606	615	622	624	633	634
种1	T	T	A	A	T	C	T	C	T
种2	C	C	G	G	C	T	A	T	C

软件拼接结果显示大翼甲螨此段线粒体 COI 基因的序列长度为 638bp，其中有 489 个保守位点，有 89 个位点碱基发生变异是由于转换，有 60 个位点碱基发生变异是由于颠换，碱基发生转换的比例高于颠换。

进一步分析大翼甲螨 COI 基因序列的碱基组成发现，碱基 A 与碱基 T 的总含量约占所有碱基的 61.1%，碱基 G 与碱基 C 的总含量约占所有碱基的 38.9%，可以看出碱基 A 和碱基 T 的含量要明显高于碱基 G 和碱基 C 的含量，因此大翼甲螨 COI 基因序列表现出了非常明显的碱基偏倚性。另一方面，在大翼甲螨 COI 基因序列中碱基 G 的平均含量仅为 17.9%，明显小于 25%，表现为反 G 偏倚，特别是在第三密码子位点，该偏倚性尤为突出，此时碱基 G 的平均含量仅为 10.6%，远远小于其他三种碱基在大翼甲螨 COI 基因序列中的含量。具体的在密码子第一位点、密码子第二位点、密码子第三位点上的各个碱基的含量信息详见下表：

表 3-5 COI 基因碱基组成及密码子不同位点碱基含量
Table 3-5 Base composition and content of different sites from COI gene

类群	碱基组成 (%)											
	第一位点				第二位点				第三位点			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
种1	30.0	16.9	27.7	25.4	41.8	27.7	14.1	16.4	33.0	18.4	41.0	7.5
种2	30.0	16.9	24.9	28.2	41.8	28.2	14.1	16.0	30.2	17.9	38.2	13.7
平均	30.0	16.9	26.3	26.8	41.8	27.9	14.1	16.2	31.6	18.2	39.6	10.6

通过对比发现大翼甲螨这两个物种在 28S 基因序列上的位点变异主要是由于转换导致，其中转换与颠换的比值为 2.8，在 COI 基因序列上的位点变异转换与颠换都起到了相当程度的作用，其中转换与颠换的比值为 1.48，明显小于 28S 基因序列上的转换与颠换比值。

由于大翼甲螨科内两个物种的 28S 基因序列差异要明显小于 COI 基因序列差异, 且 COI 序列在大翼甲螨这两个物种之间的差异程度达到了 28S 序列在这两个物种之间的差异程度的 7 倍以上。因此, COI 基因序列具有更低的保守性, 在甲螨中具有比 28S 基因序列更高的进化速率, 更加适合于较低阶元的物种进化关系的确定以及甲螨在种水平上的分子鉴定。

3.5 讨论与展望

本研究选取了 28S 基因序列的 D2 区域以及线粒体 COI 基因作为分子标记在甲螨中进行分子鉴定以及系统进化分析的可行性探究。由于 28S 基因的保守性较高, 所以利用提取出的甲螨基因组 DNA 比较容易扩增出目的片段, 一些在昆虫中取得良好使用效果的引物同样也可以在甲螨中使用。但是正因为 28S 基因的保守性较强, 所以在甲螨低级阶元的相关分析中序列之间的区分度并不大, 本研究对比了 COI 基因与 28S 基因在同一科内不同种间的序列差异情况, 结果发现 COI 基因在这两个物种之间的序列差异是 28S 基因的 7 倍以上, 由此可见 COI 基因在同一科内不同物种之间的区分能力要明显高于 28S 基因。

虽然 COI 基因在甲螨中具有更低的保守性、更高的进化速率, 更加适合于较低阶元的物种进化关系的确定以及甲螨种水平上的分子鉴定, 但是 COI 基因的 PCR 扩增成功率要显著低于 28S 基因。本研究使用的三对用于 PCR 扩增大翼甲螨 COI 基因的引物对, 有两对引物的 PCR 扩增成功率都不高, 只有最后一对引物的 PCR 扩增效果比较理想。而在角翼甲螨、尖棱甲螨和礼服甲螨中本实验所使用的三对扩增 COI 基因的引物对, 进行 PCR 扩增时均不能取得良好的效果。出现这种情况可能也是由于 COI 基因的保守性较低导致的, 在其他类群中该引物能够很好地与 COI 基因结合, 换了一个类群 COI 基因出现了比较大的变异, 即使引物结合的是 COI 基因的保守区, 但结合效率也会有不同程度的降低。

因此, 在今后的研究中, 应该开发出更加有效的用于 PCR 扩增甲螨目的基因的引物。同时为了使构建的系统进化树更加符合物种的真实进化历程, 应该联合使用多个基因片段进行综合分析。然而在目前的甲螨分子鉴定研究中, 还没有获得广泛应用且使用效果相当理想的分子标记, 所以, 开发出更加有效的分子标记也是一项重要的研究课题。随着测序技术的进一步发展以及 DNA 提取

技术的不断改进与完善甚至可以尝试使用基因组来对甲螨不同物种的进化关系进行全面彻底的分析研究。

第四章 总结

甲螨作为一类重要的小型土壤动物，其分类与进化研究由来已久。在 21 世纪初 DNA 条形码技术与分子鉴定技术的提出，给甲螨的传统分类学研究带来了新的发展机遇。但甲螨的分子分类学研究还存在两个仍需解决的问题：（1）在保存凭证标本前提下的甲螨 DNA 提取。（2）分子标记在甲螨物种鉴定中的准确性以及在不同物种进化关系分析中的有效性。这两个问题的解决对于分子生物学技术手段在甲螨中的应用以及甲螨分子分类学的发展至关重要。本研究工作的出发点正是基于这两个方面。在甲螨的 DNA 提取方面，本研究给出了一种有效的 DNA 提取方法同时使用此方法进行 DNA 提取实验时能够相当完整地保存甲螨凭证标本。在甲螨的分子鉴定方面，本研究探讨了目前常用的两段 DNA 分子标记（28S 基因、COI 基因）在甲螨中的应用效果并对不同分子标记的优势与不足进行了评价。

虽然本研究针对甲螨分子分类学存在的两个问题给出了一定的回答，但是并不代表这两个问题已经彻底解决。虽然使用本研究提供的方法能够既提取出甲螨的 DNA 也能保存凭证标本，但是在体型相当小（300 μm 左右）的甲螨类群中并不能只使用一头标本就能提取出足够的 DNA 且完整保存凭证标本，因此，在未来的研究中，仍需对甲螨的无损 DNA 提取技术进行改进与完善。另一方面，本研究只选用了两段 DNA 分子标记对分子鉴定技术在甲螨中的应用效果进行了探讨，但目前已经开发的分子标记远远不止这两种，因此，在未来还需继续将更多的分子标记应用到甲螨的研究中来。

参考文献

- [1] Krantz GW, Walter DE. A manual of acarology. 3rd Edition. Texas Tech University Press, Lubbock, 2009, 807pp.
- [2] Behan-Pelletier V M. Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. Agriculture[J]. Ecosystems and Environment, 1999,74: 411-423.
- [3] 忻介六. 应用蜱螨学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1988, 223-228.
- [4] Luxton M. Studies on the oribatid mites of a Danish beech wood soil. I. Nutritional Biology[J]. Pedobiologia, 1972, 12: 434-463.
- [5] Schneider K, Migge S, Norton R A, et al. Trophic niche differentiation in soil microarthropods (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36: 1769-1774.
- [6] Enami Y, Nakamura Y. Influence of *Schelorbitates azumaensis* (Schelorbitatidae) on *Rhizoctonia solani*, the cause of the radish-root rot[J]. Pedobiologia, 1996, 40: 251-254.
- [7] Wu L, Xin J L, Aoki J. Two new species of oribatid mites of economic importance from China (Acari, Oribatida) [J]. Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology, 1986, 34: 27-31.
- [8] McClure M S. *Diapterobates humeralis* (Oribatida: Ceratozetidae): an effective control agent of hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae) in Japan[J]. Environmental Entomology, 1995, 24(5): 1207-1215.
- [9] Denegri G M. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae [J]. Experimental and Applied Acarology, 1993, 17:567-580.
- [10] Senizak S, Seniczak A. Morphology of juvenile stages of *Parachipteria bella* (Sellnick, 1928) and *P. willmanni* Hammen, 1952 (Acari: Oribatida: Achipteriidae) [J]. Annales Zoologici, 2007, 57(3): 533-540.
- [11] Stunkard H W. The life cycle of *Moniezia expansa* [J]. Science, 1937,86(2231): 312.
- [12] 林宇光, 何玉成, 孙毓兰. 扩张莫氏绦虫病的流行学及其自然传播媒介的考察[J]. 动物学报, 1975, 21 (2) :141-152.
- [13] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2003a, 270: 313-321.
- [14] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2003b, 270: S596-S599.
- [15] 肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向-DNA 条形码[J]. 动物学报, 2004, 50 (5) :852-855.

- [16] Hajibabaei M, Singer G A, Hebert P D. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics [J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(4): 167-172.
- [17] Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2008, 8: 727-736.
- [18] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLOS Biol*, 2004, 2(10): 312.
- [19] Mark Stoeckle. Taxonomy, DNA, and the barcode of life [J]. *Bioscience*, 2003, 53(9): 796-797.
- [20] Craig Moritz, Carla Cicero. DNA Barcoding: promise and pitfalls [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): 354.
- [21] Marshall E. Taxonomy: Will DNA barcodes breathe life into classification [J]. *Science*, 2005, 307: 1037.
- [22] Schindel D E, Miller S E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, 435: 17.
- [23] Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy [J]. *Nature*, 2005, 434: 1067.
- [24] Fang S G, Wan Q H, Fijihara N. Formalin removal from archival, tissue by critical point drying [J]. *Bio Techniques*, 2002, 33(3): 604-611.
- [25] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(4): 968-971.
- [26] 彭居俐, 王绪楨, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. *水生生物学报*, 2008, 32 (6) :916-919.
- [27] Ivanova N V, Borisenko A V, Hebert P D N. Express barcodes: racing from specimen to identification [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(1): 35-41.
- [28] Rubinoff D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation [J]. *Conservation Biology*, 2006, 20(4): 1026-1033.
- [29] Hudson M E. Sequencing break throughs for genomicecology and evolutionary biology [J]. *Molecular Ecology Resource*, 2008, 8(1): 3-17.
- [30] Lorenz J G, Jackson W E, Beck J C, et al. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials[J]. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 2005, 360: 1869-1877.
- [31] Hunter S J, Goodall T I, Walsh K A, et al. Nondestructive DNA extraction from blackflies (Diptera: Simuliidae): retaining voucher specimens for DNA barcoding projects [J]. *Molecular Ecology Resource*, 2008, 8(1): 56-61.
- [32] Meusnier I, Singer G A C, Langry J F, et al. A universal DNA minibarcode for biodiversity analysis[J]. *British Medical Council Genomics*, 2008, 9: 214-217.
- [33] 陈念, 付晓燕, 赵树进等. DNA 条形码: 物种分类和鉴定技术[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19 (4) :629-631.

- [34] 欧阳小艳, 莫帮辉, 余华丽等. DNA 条形码识别—DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒准确性的比较[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30 (6) :349-352.
- [35] 赵明, 谭玲, 莫帮辉等. DNA 条形码识别III. 媒介蚊类 DNA 条形码芯片的初步研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19 (2) :99-103.
- [36] 傅美兰, 彭建军, 王莹等. DNA 条形码技术的应用与分析[J]. 河南师范大学学报, 2010, 38 (4) :118-122.
- [37] Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review[J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, 24: 751-774.
- [38] Cruickshank RH. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks[J]. *Systematic and Applied Acarology*, 2010, 7: 3-14.
- [39] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [40] 张旭, 金道超, 郭建军等. 螨类系统学研究中的分子标记[J]. 应用昆虫学报, 2008, 45 (2) :198-203.
- [41] 赵岩. 几种分子标记技术在蠕形螨研究上的应用分析[J]. 医学动物防制, 2011, (7) :622-623.
- [42] Yli-Mattila T, Paavanen-Huhtala S, Fenton B, et al. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences[J]. *Exp Appl Acarol*, 2000, 24(10-11): 863-880.
- [43] Rodrigues JCV, Gallo-Meagher M, Ochoa R, et al. Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) [J]. *Exp Appl Acarol*, 2004, 34(3-4): 275-290.
- [44] 赵岩. 三种蠕形螨的形态学和 RAPD 研究[D]. 山东大学, 2007: 47-52.
- [45] Wong SF, Chong AL, Mak JW, et al. Molecular identification of house dust mites and storage mites[J]. *Exp Appl Acarol*, 2011, 55(2): 123-133.
- [46] Bouned M, De LE, Roversi PF, et al. Molecular detection assay of the bud mite *Trisetacus juniperinus* on *Cupressus sempervirens* in nurseries of central Italy[J]. *Exp Appl Acarol*, 2014, 62(2): 161-170.
- [47] 崔玉楠. 基于形态与分子技术相结合的叶螨鉴定法研究[D]. 南京农业大学, 2014: 35-39.
- [48] 杨万云, 王桂武, 杨福合等. 微卫星分子标记及其在动物遗传育种中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (11) : 4644-4649.
- [49] Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction[J]. *Am J Hum Gene*, 1989, 44(3): 388-396.

- [50] Fagerberg AJ, Fulton RE, Black Iv WC. Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* [J]. *Insect Mol Biol*, 2001, 10(3): 225-236.
- [51] Evans JD, Pettis JS, Smith IB. A diagnostic genetic test for the honey bee tracheal mite, *Acarapis woodi* [J]. *J Apicult Res*, 2007, 46(3): 195-197.
- [52] Evans LM, Allan GJ, Shuster SM, et al. Tree hybridization and genotypic variation drive cryptic speciation of a specialist mite herbivore[J]. *Evolution*, 2008, 62(12): 3027-3040.
- [53] 李婷. 基于微卫星分子标记的二斑叶螨和朱砂叶螨种群遗传结构研究[D]. 南京农业大学, 2008: 21-26.
- [54] 魏丹丹, 刘燕, 杜洋等. 柑橘全爪螨微卫星位点鉴定与信息分析[J]. *中国农业科学*, 2016, (2): 282-293.
- [55] 李国庆, 于明志, 洪晓月. 基于核糖体 28S rRNA 对叶螨的鉴定及其系统发育分析[J]. *南京农业大学学报*, 2010, 33 (5): 49-54.
- [56] 张素卿. 基于核糖体 18S rRNA 和 28S rRNA 基因的常见肉食螨系统关系分析[D]. 南昌大学, 2011: 18-26.
- [57] Dabert M, Coulson SJ, Gwiazdowicz DJ, et al. Differences in speciation progress in feather mites (Analgoidea) inhabiting the same host: the case of *Zachvatkinia* and *Alloptes* living on arctic and long-tailed skuas [J]. *Exp Appl Acarol*, 2014, 65(2): 163-179.
- [58] Navajas M, Cotton D, Kreiter S, et al. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences[J]. *Exp Appl Acarol*, 1992, 15(4): 211-218.
- [59] 古小彬, 张晓谦, 杨光友等. 11 株螨虫分离株的 ITS-2 序列分析与系统关系研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40 (2): 235-242.
- [60] 邹志文, 陈芬, 夏斌等. 几种钝绥满 ITS 基因片段的序列分析[J]. *中国农业科学*, 2011, 44 (23): 4945-4951.
- [61] Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species[J]. *Heredity*, 2008, 101(4): 301-320.
- [62] Wang IJ. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography [J]. *Mol Ecol*, 2010, 19(13): 2605-2608.
- [63] Nabholz B, Jarvis ED, Ellegren H. Obtaining mtDNA genomes from next generation transcriptome sequencing: a case study on the basal Passerida (Aves: Passeriformes) phylogeny[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 57(1): 466-470.
- [64] Masta SE. Mitochondrial rRNA secondary structures and genome arrangements distinguish chelicerates: comparisons with a harvestman (Arachnida: Opiliones: Phalangium opilio) [J]. *Gene*, 2010, 449(1-2): 9-21.

- [65] De RM, Mora MD, Ubeda JM, et al. Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences[J]. *Exp Appl Acarol*, 2001, 25(12): 957-967.
- [66] Skerratt L, Campbell N, Murrell A, et al. The mitochondrial 12S gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and humans in Australia[J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(4): 376-379.
- [67] Suarez-Martinez EB, Montealegre F, Sierra-Montes JM, et al. Molecular identification of pathogenic house dust mites using 12S rRNA sequences[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(15): 2927-2934.
- [68] Sastre N, Ravera I, Villanueva S, et al. Phylogenetic relationships in three species of canine *Demodex* mite based on partial sequences of mitochondrial 16S rDNA [J]. *Vet Dermatol*, 2012, 23(6): 509-e101.
- [69] 程剑, 胡宝庆, 文春根. 利用线粒体 COI 基因序列探讨蜱螨的系统发育[C]. 第五届广东、湖南、江西、湖北四省动物学学术研讨会论文摘要汇编, 2008.
- [70] Yang B, Cai J, Cheng X. Identification of astigmatid mites using ITS2 and COI regions[J]. *Parasitol Res*, 2011, 108(2): 497-503
- [71] 古小彬, 陈祖琴, 朱俊扬等. 兔痒螨部分线粒体基因组序列的分析[C]. 中国畜牧兽医学学会家畜寄生虫学分会第七次代表大会暨第十二次学术研讨会论文集, 2013.
- [72] 张旭, 金道超, 郭建军等. 螨类系统学研究中的分子标记[J]. *应用昆虫学报*, 2008, 45 (2) :198-203.
- [73] 李浩森. 基于形态和分子标记的瘿螨分类与系统进化研究(蜱螨亚纲: 瘿螨总科)[D]. 南京农业大学, 2014:28-30.
- [74] Mark Maraun, Michael Heethoff, Katja Schneider, et al. Molecular phylogeny of oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages[J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2004, 33: 183-201.
- [75] Mark Maraun, Georgia Erdmann, Garvin Schulz, et al. Multiple convergent evolution of arboreal life in oribatid mites indicates the primacy of ecology[J]. *Proc R Soc B*, 2009, 276: 3219-3227.
- [76] Ricarda Lehmitz, Peter Decker. The nuclear 28S gene fragment D3 as species marker in oribatid mites (Acari, Oribatida) from German peatlands[J]. *Exp Appl Acarol*, 2017, 71: 259-276.
- [77] Sylvia Schäfer, Stephan Koblmüller, Ingeborg Klymiuk, et al. The mitochondrial genome of the oribatid mite *Paraleius leontonychus*: new insights into tRNA evolution and phylogenetic relationships in acariform mites[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 7758.
- [78] Tobias Pflingstl, Andrea Lienhard, Satoshi Shimano, et al. Systematics, genetics, and biogeography of intertidal mites (Acari, Oribatida) from the Andaman Sea and Strait of Malacca[J]. *J Zool Syst Evol Res*, 2019, 57: 91-112.

- [79] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18: 70–74.
- [80] Rowley DL, Coddington JA, Gates MW, et al. Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 915–924.
- [81] 高艳, 卜云. 一种改进的小型节肢动物无形态损伤的 DNA 提取方法[J]. *四川动物*, 2014, 33 (1) :216–220.
- [82] 单振菊, 邱德义, 岳巧云. 一种具厚几丁质外壳微小节肢动物无损伤凭证标本高质量 DNA 模板的获取方法[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2017, 28 (1) :27–30.
- [83] Ota A, Karasawa Sh, Nakamura T, et al. Non-destructive DNA extraction protocol for oribatid mites (Acari: Oribatida)[J]. *Edaphologia*, 2011, 89: 19–24.
- [84] Ahaniazad M, Bagheri M, Roumi V, et al. An efficient and non-destructive DNA extraction method for oribatid mites[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2018, 51: 187–196.
- [85] Dabert M, Witalinski W, Kazmierski A, et al. Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56: 222–241.
- [86] Starks PT, Peters JM. Semi-nondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscus*[J]. *Insectes Sociaux*, 2002, 49: 20–22.
- [87] Thompson JD, Gibson TJ, Plewnia F. The Clustal-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nuc Aci Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [88] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis), Version 3.0. Tempe: Arizona State University. 2001, 18.
- [89] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.

致谢

三年的时间很快就过去了，现在依然记得当初入学时的情景，回首过往的三年研究生生活，有忙碌、有清闲、有欣喜、有感动，所有的这些经历都将是我人生中最宝贵的回忆。

在我读研的学习与生活中，我的两位导师都给了我非常大的关心与帮助。张锋老师是我在河北大学的导师，他和蔼可亲、乐观幽默，在他的带领下实验室就好像一个大家庭一样充满欢声笑语，同时张老师在学术问题上的广阔视野也令我印象深刻。陈军老师是我在中科院动物所的导师，除了在科研上指导我论文工作的开展，也在生活中教育我为人处世的道理。而且陈老师自己工作也非常认真负责，他对待学术研究极其严谨的态度深深地影响了我。

我还要感谢动物所的朱朝东老师，朱老师在分子研究方面给了我很大的指导，我的分子生物学实验也是在他们实验室做的。此外还有梁红斌老师、张超老师等，他们都在学习或生活中给我提供了不少的帮助。也要感谢实验室所有的同学以及宿舍舍友在我研究生期间对我的帮助。

最后感谢我的家人一直以来对我的理解与支持，是你们让我在前进道路上充满力量。