

实验室薄口螨的大量培养及休眠体的诱导

赵晓平 刘晓光

包头师范学院生物科学与技术学院 包头 014030

摘要: 用玉米粉培养基、BY(牛肉膏+酵母膏)软琼脂培养基、BY培养液3种培养基对实验室薄口螨(*Histiostoma laboratorum*)进行了培养。其最适培养基是玉米粉培养基;该螨在BY软琼脂培养基上也能生长,但生长速度比较缓慢,经过BY软琼脂培养基的培养,能够收集到大量干净的个体,为DNA提取和分子生物学研究提供了方便;在BY培养液中,实验室薄口螨不能进行继代生长,但能够产生大量的卵,可收集卵做更进一步的深入研究。休眠体是该螨生活史中的重要阶段,是借助携播者进行传播的特殊形式。对孳生于培养有果蝇的玻璃指管中的实验室薄口螨产生的休眠体及其在果蝇体表的吸附状况进行了观察,利用较高温度(30~35℃)培养基逐步干燥、较低温度(10~15℃)、BY液体培养3种方法,可以诱导该螨休眠体集中大量地形成,方便收集休眠体,是对其进行生理生化、基因表达、疾病传播机理等方面研究的先决条件。

关键词: 实验室薄口螨;培养;休眠体;诱导

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)04-42-05

Mass Culture of *Histiostoma laboratorum* and Their Hypopi Induction

ZHAO Xiao-Ping LIU Xiao-Guang

Faculty of Biological Science and Technology, Baotou Teachers' College, Baotou 014030, China

Abstract: *Histiostoma laboratorum* Hughes individuals were cultured in corn powder culture medium, BY (beef extract + yeast extract) soft agar culture medium, and BY (beef extract + yeast extract) culture liquid. The most suitable culture medium for the mites was corn powder culture medium; they grew more slowly when culturing in BY soft agar culture medium than in corn powder culture medium but numerous clean individuals could be collected for DNA extraction and molecular biology research. Although *H. laboratorum* Hughes could not grow generation by generation in BY culture liquid, they could produce numerous ova which could be collected for research. Hypopi were specialized forms of the mites to disperse by means of other animals. Hypopi of *H. laboratorum* Hughes could propagate in thin glass pipe where fruit flies had been existed as well as on the body of fruit flies. Several methods including progressively drying of culture medium at high temperature (30 – 35℃), culture at lower temperature (10 – 15℃), and liquid culture could induce *H. laboratorum* to form hypopi mass that could be collected for its physiological, biochemical, gene expression, disease spreading mechanism and other researches.

Key words: *Histiostoma laboratorum*; Culture; Hypopus; Induction

基金项目 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No. NJ09151);

第一作者简介 赵晓平,男,教授;研究方向:动物遗传育种与繁殖学;E-mail: zxpnmmt@163.com。

收稿日期:2010-10-30,修回日期:2011-04-11

螨类的生活环境多种多样,与人类生活关系非常密切。有些种类是疾病的传播媒介,有些是土壤形成的参与者和生物防治的重要因素。农业害螨造成粮食减产,而有一些种类又是害虫的天敌,空气中的螨类是人体的过敏源。尽管螨类有多种多样,但是由于螨类个体微小、肉眼不容易观察、世代历期短、发生和生长具有明显的季节性,多数螨类不能够在实验室连续进行培养,进而限制了对螨类的深入研究,其研究水平十分滞后。

王敦清等^[1]于1992年在养殖果蝇(*Drosophila melanogaster*)的培养管中发现了实验室薄口螨(*Histiostoma laboratorium*),对其进行了分类地位的确定,该螨隶属于蜱螨亚纲(Acari)真螨总目(Acariformes)薄口螨总科(Histiostomatoidea)薄口螨科(Histiostomatidae)。同时也对该螨的形态特征及生活史进行了描述。

实验室薄口螨生活周期短,子代数量巨大,不同生活阶段的个体形态差异明显。黄国城等^[2]为了观察该螨的形态和个体发育,对其进行了单只塑料凹孔板密闭培养。为了在短期内能够收集到大量干净的个体和成批的休眠体,以便对其进行DNA提取、生理生化、分子生物学等方面的研究,我们利用几种不同的培养基和诱导方法对该螨的培养效果、螨体的收集方法、影响休眠体形成的因素等进行了研究,获得了较为有益的结果。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验室薄口螨成螨收集自培养果蝇的指管培养基表面。几种不同培养基配制所需的营养物:玉米粉、蔗糖、琼脂、酵母粉、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、蒸馏水。药品和耗材:丙酸、氯化钠、氢氧化钠、70%乙醇、脱脂棉、pH试纸等。

1.2 实验方法 采用玉米粉培养基、BY软琼脂培养基、BY培养液对实验室薄口螨进行了培养和观察;对孳生于培养有果蝇的玻璃指管内的实验室薄口螨休眠体吸附果蝇身体表面的情况进行了观察和拍照;在较高温度(30~

35℃)、较低温度(10~15℃)、BY培养液进行培养的条件下对该螨休眠体的形成进行了诱导试验。

1.2.1 实验室薄口螨的培养观察 玉米粉培养基配方参考李雅轩等^[3]的方法稍加改动。如果配制300 ml的培养基,取红糖或白糖33 g,琼脂2.5 g,放入一个500 ml的烧杯中,加145 ml水,煮沸溶解,不时用玻璃棒搅拌,再将25 g玉米粉和145 ml水放入另一个300 ml的烧杯中,将玉米粉调成糊状,倒入前一个500 ml的烧杯中混匀,继续加热,同时不停地搅拌,待培养基熬制好后分装到洗净已灭菌的直径为6 cm的小培养皿中,过夜冷却,然后在超净工作台或无菌条件下进行实验室薄口螨的接种。每个培养皿接种成螨5对(5♀,5♂)在25℃条件下进行培养。

BY培养液的配方如下:1%蛋白胨、0.5%牛肉膏、0.5%酵母膏、0.5%葡萄糖、0.5%NaCl、pH调至7.5。

BY软琼脂培养基是在BY培养液配方的基础上再加0.3%的琼脂。

按其配方分别配制100 ml分装到150 ml的三角瓶中,高压灭菌后倒平板于灭菌的小培养皿中,每皿10 ml左右。冷却后接种实验室薄口螨成螨10~15只,培养期间每天观察一次。

1.2.2 实验室薄口螨休眠体的形成和诱导 在培养果蝇时,注意到了实验室薄口螨的休眠体产生于培养果蝇的玻璃指管中,为了了解实验室薄口螨休眠体与果蝇的关系以及传播途径,首先对孳生于培养有果蝇的玻璃指管中的实验室薄口螨产生的休眠体进行了观察。由于玻璃指管较长、口径较小,内壁上有大量的果蝇排泄物,休眠体与果蝇生长在一起,收集休眠体既不方便也不卫生,同时也不便于观察。为避免以上缺陷,我们利用口径6 cm的小培养皿对实验薄口螨进行了单独培养,然后分别改为以下3种培养条件对休眠体的形成进行了诱导试验:①将生化培养箱的培养温度调至较高(30~35℃),玉米粉培养基逐步失去水分变得较为干燥;②在较低温度(10~15℃左右)条件下

进行培养;③利用不加琼脂的 BY 培养液进行培养。

1.2.3 拍照 将漂浮在 BY 培养液表面的卵、吸附有休眠体的果蝇从培养指管转移到小培养皿再经乙醚轻度麻醉, BY 培养液表面形成的休眠体分别在实体摄影显微镜下进行拍照(放大 30 倍)。

2 结果

2.1 培养结果和观察 玉米粉培养基是实验室薄口螨的最适培养基,将实验室薄口螨 5 对(5 ♀, 5 ♂)接种于玉米粉培养基上,对其生长和数量增长情况进行观察计数,每天观察一次,连续 20 d,结果如图 1 所示。

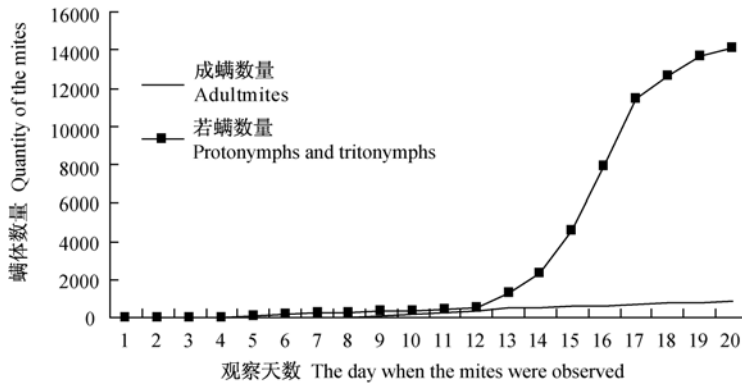


图 1 实验室薄口螨在玉米粉培养基培养 20 d 的数量增长情况

Fig.1 The growth of *Histiotoma laboratorium* in powder corn medium

新接种的成螨在 3 d 后产下较多的卵,根据黄国城等^[2]的观察,实验室薄口螨的平均历时为 3.0 ~ 4.5 d,我们观察到的结果也基本一致。从第一代卵出现 3 d 后,培养基表面可看到数量较多的第一若螨和第三若螨,4 ~ 5 d 后有少量新生第一代成螨出现。2 周后可看到螨体数量急剧增加,包括幼螨、第一若螨、第三若螨和成螨(图 1),大量若螨的出现主要是由第二代成螨产生的卵所形成的,由于第二代成螨数量比第一代成螨数量多得多,使这一阶段的卵、幼螨、第一若螨和第三若螨数量急剧增加。到第 19 天和 20 天的时候,随着螨体数量的增加,代谢废物增加,环境容量有限,若螨数量达到最高值。这时统计若螨和成螨的数量,可以粗略估计实验室薄口螨的繁殖率。由于在统计过程中,螨体数量过大难于计数,可以将一个直径 1 cm 的圆形小皮圈放入培养皿中,先统计出小皮圈面积内的螨体数量,再乘以培养皿面积是小皮圈面积的倍数来估算螨体总数。例如,我们在实体显微镜下观察一个生长有螨体的培

养皿,统计其螨体数量,其若螨数量为 14 090 只,成螨数量为 836 只,其中半数成螨为雌性(418 只),据此计算,实验室薄口螨的繁殖率大约为 $14\ 090/418 = 33.4$ 只若螨/每对成螨,由于在对若螨进行点数时有遗漏现象,所以实验室薄口螨的繁殖率要高于此数值。培养 19 ~ 20 d 时成螨是最活跃的时期,数量也相对较多,可用接种针或接种铲将成螨逐个挑出,收集于 1.5 ml 的离心管中进行 DNA 提取等后续研究。当螨体数量达到最高值以后,生存环境逐渐恶化,部分满体开始死亡,需要及时转接培养。

该螨在 BY 软琼脂培养基上也能够生长繁殖,但与玉米粉培养基相比较,生长速度下降,生活周期延长,约 15 d 左右完成一个周期,比在玉米粉培养基中的生长周期(4.5 d)延长了近 10 d 的时间。生长缓慢的主要原因是 BY 软琼脂培养基比较稀软,螨体不能浮于表面,呼吸困难所造成。利用 BY 软琼脂培养基进行实验室薄口螨的培养,能够很方便地收集到大量较

为干净的螨体,收集过程大体如下:经过将近 2 周的培养后,BY 软琼脂培养基中含有数量较多的螨体,这时,可以利用无菌生理盐水把含有螨体的 BY 软琼脂培养基在培养皿中进行稀释,将培养皿在实体显微镜的小底盘上顺着方向做缓慢的水平旋转运动,螨体就会全部集中到培养皿的中央,用吸管将螨体吸到另一个培养皿中,继续用无菌生理盐水进行洗涤,反复多次,就可以收集到大量的干净螨体,进行后续研究。用该方法收集到的螨体比利用玉米粉培养基收集到的螨体要干净,因为在洗涤过程中 BY 培养基的沉淀较少。利用 BY 培养基的另一个作用是,可以使实验室薄口螨的培养同步化,接种单个成体螨于 BY 软琼脂培养基中,在 25℃ 条件下培养,成螨的产卵、幼螨和若螨的形成可以同步化,有利于分析每一阶段的个体发育和基因表达状况。而在用玉米粉培养基培养时,实验室薄口螨的生长速度较快,世代重叠较多,不同阶段的螨体混杂到一起,所以不能实现同步化。

利用不加琼脂的液体状 BY 培养液对实验室薄口螨进行培养,实验室薄口螨不能够进行继代生长,但是可以产生大量的卵(图 2),可以把卵收集起来进行单独研究。在玉米粉培养基上,由于不同生活阶段的螨体混杂到一起,难以单独分离到卵。

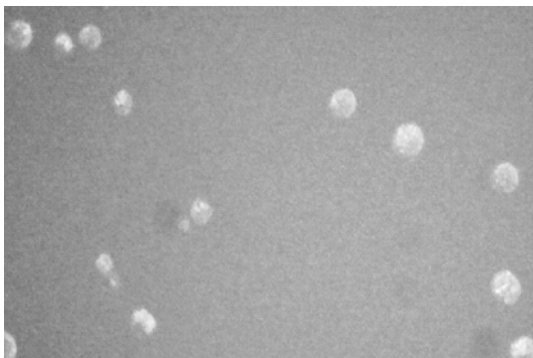


图 2 漂浮在 BY 培养液表面的卵(30 ×)

Fig.2 The ova in BY culture liquid

2.2 休眠体的形成和诱导

2.2.1 果蝇培养指管中休眠体的形成 孳生

于培养果蝇的玻璃指管中的第一若螨在诸如培养基较为干燥、螨的密度增大、培养基被霉菌轻度污染、温度较低(10 ~ 15℃)等不利条件下,就会转化为休眠体且数量逐步增加。实体显微镜下可以观察到所形成的休眠体在玻璃指管内壁上不停地爬动,用毛笔将运动于玻璃指管内壁上的休眠体粉刷到小培养皿中,用乙醚轻度麻醉,镜下清点休眠体的数目,多者可以达到 362 只。休眠体在内管壁上爬动的过程中寻找吸附对象,当遇到果蝇时,就会利用其身体腹部末端的吸盘吸附到果蝇身体表面各处,尤其以吸附于果蝇腹部和胸部的数量最多。将吸附有休眠体的果蝇转移到直径 6 cm 的小培养皿中,轻度麻醉后统计每只果蝇携带休眠体的数目,吸附较多者其休眠体数量有 76 只(图 3),一部

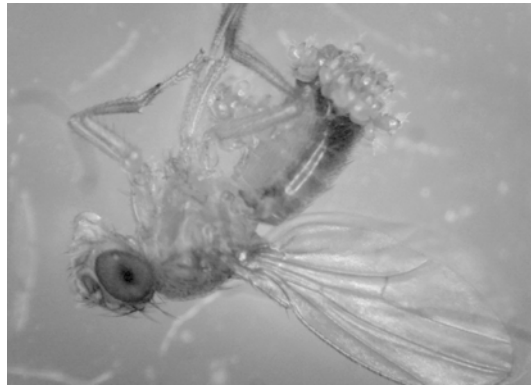


图 3 几十个休眠体吸附于果蝇身体表面(30 ×)

Fig.3 Dozens of hypopi adsorbing onto *Drosophila melanogaster*

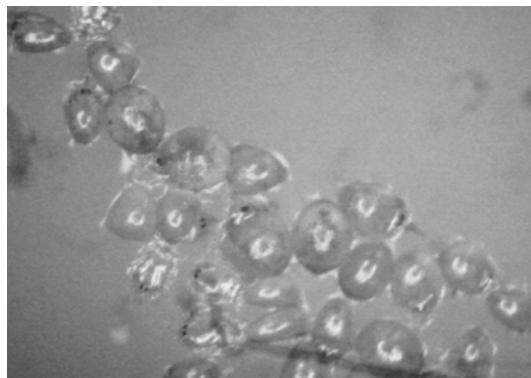


图 4 在 BY 培养液表面形成的休眠体(30 ×)

Fig.4 The hypopi in BY culture liquid

分休眠体以该种方式借助于果蝇在不同的培养管间进行传播,另一部分未吸附于果蝇的休眠体可以通过培养管的棉塞或在实验人员对果蝇转接时进行传播。

2.2.2 较高温度下培养基逐步失去水分诱导休眠体形成 调节培养箱的室内温度于 30 ~ 35℃,把培养基中具有大批处在第一若螨阶段的培养皿放置于培养箱中,经过 3 ~ 5 d 的诱导,在培养基的表面可以看到近 300 ~ 400 个灰黄色的星点状休眠体,这些休眠体逐渐从培养基中运动到培养皿盖的内表面,用毛笔刷扫培养皿盖的内表面,把休眠体收集到离心管或其他密闭的小容器中,可进行相关的研究。

2.2.3 较低温度诱导休眠体的形成 较低的温度条件也可以诱导休眠体的形成,当把生长有大批实验室薄口螨的培养皿或培养指管放置在较低温度(10 ~ 15℃)的生化培养箱中,8 ~ 10 d 后,第一若螨逐步转化为休眠体。收集并清点一个培养皿中的休眠体,其数量为 126 个。低温诱导与较高温度诱导的最大不同是,低温条件下该螨的生长速度下降,休眠体的转化形成也相对较慢,时间较长,不易在短期内收集到大量的休眠体。

2.2.4 利用 BY 培养液诱导休眠体的形成

在 BY 培养液中,由于实验室薄口螨不能很好地呼吸,以及与玉米粉培养基相比较营养差异较大,所以实验室薄口螨成螨尽管在 BY 培养液中能够产卵,卵能发育为第一若螨,而第一若螨几乎全部转化成休眠体(图 4)。在 BY 培养液中,上百个休眠体形成后,漂浮到培养液的表

面,用吸管把下面的培养液吸去,就能方便地收集到休眠体。

3 讨 论

3 种不同的培养基可以培养实验室薄口螨,其中,最适培养基是玉米粉培养基,当若螨数量达到最高值时,利用若螨数量与成螨数量的一半作比值可以粗略估计实验室薄口螨的繁殖率,其繁殖率大约等于 33.4 只若螨/每对成螨;利用 BY 软琼脂培养基可以收集到大量干净的螨体;通过 BY 培养液可以较多地收集到实验室薄口螨的卵;较高温度(30 ~ 35℃)培养基逐步干燥、较低温度(10 ~ 15℃)、BY 液体培养可以诱导该螨休眠体的形成。

实验室薄口螨生长速度快,短期培养可以产生大量子代,个体收集容易,对其进行深入研究,可以为其他螨类的研究提供重要的参考价值,也有可能成为螨类研究的代表性生物。休眠体诱导的大量形成,为研究生活史中具有休眠体阶段的螨类、休眠体形成的分子机制和发育的遗传调控创造了条件,有关该方面的工作还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 王敦清,黄国城,郑强. 果蝇饲养中的一种害螨——实验室食菌螨:(蜱螨亚纲: 食菌螨科). 福建农业大学学报: 自然科学版, 1994, 23(3): 324 - 326.
- [2] 黄国城,郑强,王敦清. 实验室食菌螨的生活史及对果蝇繁殖的危害. 昆虫知识, 1995, 32(5): 287 - 289.
- [3] 李雅轩,赵昕. 遗传学综合实验. 北京: 科学出版社, 2006: 236.