

高原麝鼠寄生皮蝇的形态和分子鉴定

侯齐琪 谭宇尘 刘倩倩 包明芳 王志成 苏军虎*

甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/中美草地畜牧业可持续发展研究中心/

甘肃农业大学-新西兰梅西大学草地生物多样性研究中心 兰州 730070

摘要: 皮蝇蛆病是由双翅目 (Diptera) 狂蝇科 (Oestridae) 皮蝇亚科 (Hypodermatinae) 幼虫感染所导致的一种寄生虫病, 会严重影响农牧业发展与公共卫生安全。本研究采用形态学和分子系统学方法对甘南藏族自治州碌曲境内高原麝鼠 (*Eospalax baileyi*) 感染的皮蝇进行鉴定, 旨在确定皮蝇的种类, 为皮蝇蛆病预防、诊断和控制提供参考。结果发现, 高原麝鼠感染的皮蝇, 其三龄幼虫的形态与兔裸皮蝇 (*Oestromyia leporina*) 三龄幼虫较为相似; 皮蝇三龄幼虫 COI 基因序列与兔裸皮蝇的差异最小, 平均差异为 0.63%。系统进化树显示, 感染高原麝鼠的皮蝇三龄幼虫与兔裸皮蝇处于同一进化枝, 其亲缘关系最近。因此, 本研究确定甘南藏族自治州碌曲境内高原麝鼠所感染的皮蝇为兔裸皮蝇。

关键词: 高原麝鼠; 皮蝇三龄幼虫; 形态学; COI 基因

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 03-432-09

Morphological and Molecular Identification of Torsalo Infecting Plateau Zokor (*Eospalax baileyi*)

HOU Qi-Qi TAN Yu-Chen LIU Qian-Qian BAO Ming-Fang
WANG Zhi-Cheng SU Jun-Hu*

College of Grassland Science, Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Ministry of Education), Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U.S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Gansu Agricultural University; Gansu Agricultural University-Massey University Research Centre for Grassland Biodiversity,

Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Hypodermosis is a disease caused by the infection of Hypodermatinae (Diptera, Oestridae) larvae. It seriously impact the development of agriculture, stock-breeding and public health. In this study we used morphological and molecular methods to identify the torsalo species infecting Plateau Zokor (*Eospalax baileyi*) in Luqu county, Gannan Tibetan Autonomous Prefecture, Gansu and to provide correct taxonomy for prevention, diagnosis and control of Hypodermosis. The result showed that the morphological characters of the third instar larvae were similar to the third instar larvae of *Oestromyia leporina* (Table 1). The difference

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31460566, 31760706), 陇原青年创新创业人才项目 (No. LYRC2018-5);

* 通讯作者, E-mail: sujh@gsau.edu.cn;

第一作者介绍 侯齐琪, 女, 硕士研究生; 研究方向: 草地保护; E-mail: 704604024@qq.com。

收稿日期: 2020-06-12, 修回日期: 2020-12-22 DOI: 10.13859/j.cjz.202103013

of the partial *COI* gene sequences between the third instar larvae of studied torsalo and *O. leporina* was the smallest when compared with other three species of torsalo, with an average difference of 0.63% (Table 2). Based on phylogenetic analysis, the genetic distance between third instar larvae of studied torsalo and *O. leporina* was the shortest (Fig. 4). Therefore, it was determined that the torsalo infecting plateau zokor in Luqu county of Gannan Tibetan Autonomous Prefecture was *O. leporina*.

Key words: Plateau Zokor, *Eospalax baileyi*; Third instars of torsalo; Morphology; *COI* gene

皮蝇亚科 (Hypodermatinae) 隶属于双翅目 (Diptera) 短角亚目 (Brachycera) 环裂下目 (Cyclorhapha) 有瓣类 (Calyptratae) 狂蝇总科 (Oestroidea) 狂蝇科 (Oestridae) (Pape et al. 2011)。皮蝇成蝇为不食性蝇类, 幼虫专性寄生于啮齿目 (Rodentia)、复齿目 (Lagomorpha)、偶蹄目 (Artiodactyla) 等多种哺乳动物的皮下, 从而引起皮蝇蛆病, 亦有幼虫寄生人体皮下引起皮蝇蛆病的报道 (孙博 2011)。调查显示, 在许多北半球国家, 皮蝇蛆病是危害严重的动物寄生虫病之一, 也是一种重要的人畜共患寄生虫病 (蔡进忠等 2009)。在我国, 皮蝇蛆病主要分布于西北、东北和华北地区, 其中在青海、内蒙古、甘肃、新疆和西藏 5 个省 (自治区) 尤为严重 (罗建勋等 2003)。人或家畜感染皮蝇后, 其体内多个系统受损, 并引起并发症。家畜感染皮蝇后, 体重减轻、发育受阻, 感染严重时可致死 (Otranto 2001, 刘建枝等 2012, 陈秋菊 2019)。目前皮蝇蛆病暂无特效治疗方法, 只能等待幼虫自行排出或切开取出 (陈俊 2010)。蒋次鹏 (2003) 曾报道人感染皮蝇后, 可引起发热、荨麻疹或皮下肿块等症状, 幼虫在皮下移动会导致重要器官受损, 引发病症, 如胸膜炎、心包炎等。皮蝇蛆病多发生于卫生条件差、医疗设施落后的农牧区, 容易引起公共卫生安全事件 (达珍 2016)。

甘南藏族自治州地处我国青藏高原南部, 是我国牧畜业生产的重要基地。近年来, 甘南藏族自治州草原生态系统退化 (赵玉婷等 2017), 更伴随有高原鼯鼠 (*Eospalax baileyi*) 等小型哺乳动物种群数量增多现象, 加大了病

原体传播的可能性, 给人畜健康和生命安全带来了极大威胁 (唐忠民 2010)。而我国西部地区是多个皮蝇物种的分布区 (Zumpt 1965, 薛万琦等 1994), 很容易引起皮蝇蛆病发生和流行。我们在前期的野外调查中发现甘南藏族自治州草原的高原鼯鼠腹部皮下有皮蝇寄生, 但皮蝇幼虫在物种的形态鉴别中容易出现混淆。目前, 已有学者通过观察皮蝇三龄幼虫的伪头、第 10 节腹面前后缘刺以及气门板的形态特征, 并结合线粒体 *COI* 基因, 对牦牛 (*Bos mutus*)、藏羚羊 (*Pantholops hodgsonii*) 和驯鹿 (*Rangifer tarandus*) 等偶蹄目动物寄生的皮蝇进行了分类鉴定 (高兴春等 2008, 庞程 2008, 高慧 2010, 刘建枝等 2012), 也有关于高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 寄生皮蝇分类鉴定的报道 (朵红等 2011, 孙亚丽等 2015)。分析和确定不同的皮蝇种属对皮蝇蛆病的有效预防与控制具有重要意义。

本研究对高原鼯鼠感染的皮蝇三龄幼虫进行形态观察, 对比西北地区常见的牛皮蝇 (*Hypoderma bovis*)、纹皮蝇 (*H. lineatum*)、中华皮蝇 (*H. sinense*) 和兔裸皮蝇 (*Oestromyia leporina*) 三龄幼虫的形态特征 (Zumpt 1965, 薛万琦等 1994), 并对皮蝇三龄幼虫的 *COI* 基因序列进行扩增, 与上述皮蝇的 *COI* 基因序列进行对比, 以达到皮蝇蛆病原分子鉴定的目的。对高原鼯鼠感染的皮蝇幼虫进行形态学和分子系统学鉴定, 可确定高原鼯鼠的皮蝇蛆病原种类, 丰富皮蝇蛆病调查研究数据, 也可对未来皮蝇蛆病预防、诊断和控制提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 虫体收集

从甘肃省甘南藏族自治州碌曲县尕海、加仓和则岔 3 地活捕高原麝鼠 200 余只，并随机从感染皮蝇的高原麝鼠腹部皮下解剖出蝇蛆 6 只。皮蝇幼虫呈褐色和乳白色，共有 11 体节。解剖时发现鼠皮表面已有孔洞，幼虫的气门板可进行有氧代谢，依此暂定为三龄幼虫（孙亚丽等 2015）。将从高原麝鼠皮下解剖出的皮蝇幼虫用 70% 酒精固定，并编号。

1.2 形态鉴定

将皮蝇幼虫从 70% 酒精中取出后，用吸水纸吸干皮蝇幼虫表面酒精，以防拍摄过程中出现反光现象，将虫体放置体视显微镜（型号 Motic SM-171）下观察。通过观察三龄幼虫的伪头、第 2 体节背部和腹部刺、第 10 节腹部前后缘刺以及气门板等形态特征进行皮蝇的物种鉴定（付永 2016）。

1.3 虫体 COI 基因扩增

在无菌条件下解剖皮蝇幼虫虫体，取出其内容物并剪碎，使用蛋白酶 K-苯酚/氯仿抽提法提取虫株 DNA。根据资料（Otranto et al. 2003），设计一对扩增皮蝇 COI 基因序列通用引物，UEA7: 5'-TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC-3'; UEA10: 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3'。引物序列由西安擎科泽西生物科技有限公司合成。扩增片段长度约为 690 bp。以提取的总 DNA 为模板进行 COI 基因片段 PCR 扩增反应，反应体系 25 μ l，包含 240 mg/L 的模板 DNA 1 μ l，10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ l，10 μ l ddH₂O，12 μ l 2 \times Taq PCR MasterMix。扩增条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min；95 $^{\circ}$ C 变性 40 s，53 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，共进行 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 扩增结果送至西安擎科泽西生物科技有限公司测序。

1.4 数据分析

用 MEGA7.0 软件将测得的感染高原麝鼠

的皮蝇幼虫的序列及与 GenBank 中下载的牛皮蝇（登录号 AF497761.1）、中华皮蝇（登录号 EU276095.1）、纹皮蝇（登录号 KP965726.1）和兔裸皮蝇（登录号 KR231912.1、KR231915.1）的 COI 基因序列建立进化树，并用 Megalign 软件将测得的 6 个感染高原麝鼠的皮蝇幼虫序列和与其相似性较高的皮蝇序列进行比对，确定样本同其他皮蝇的种间同源性。

2 结果

2.1 高原麝鼠皮蝇三龄幼虫形态学鉴定

甘南藏族自治州高原麝鼠皮蝇三龄幼虫伪头（图 1）口裂背侧有两个较小肉质凸起，第 2 体节背部 1 簇刺，腹部 5 簇刺。牛皮蝇三龄幼虫伪头口裂背侧有两个较小的肉质的突起，第 2 体节背部、腹部均有 5 簇刺；中华皮蝇三龄幼虫伪头口裂背侧有两个较大肉质突起，第 2 体节背部有 3 簇刺，腹部有 6 簇刺（曹展硕 2014）；纹皮蝇三龄幼虫伪头口裂背侧有两个较大的肉质突起，第 2 体节背部有 3 簇刺，腹部有 5 簇刺；兔裸皮蝇三龄幼虫伪头口裂背侧有两个较小肉质凸起，第 2 体节背部 1 簇刺，

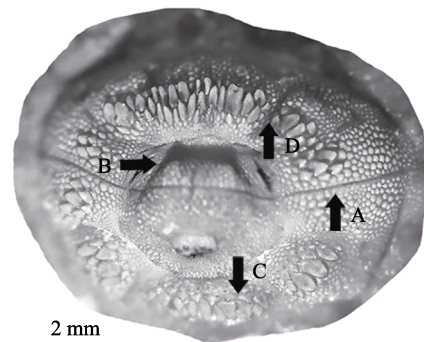


图 1 高原麝鼠皮蝇三龄幼虫的伪头（40 \times ）

Fig. 1 Pseudocephalon of the third instar larvae of studied torsalo infecting Plateau Zokor

A. 口裂；B. 口裂背侧的肉质凸起；C. 第二体节腹部刺；D. 第二体节背部刺。

A. Opercular scar; B. The fleshy protuberances on the dorsal side of the opercular scar; C. Spines of the ventral side of the 2nd segment; D. Spines of the dorsal side of the 2nd segment.

腹部 5 簇刺 (Fu et al. 2016)。经比较, 甘南藏族自治州高原鼯鼠皮蝇三龄幼虫伪头与兔裸皮蝇特点基本相同。

感染甘南藏族自治州高原鼯鼠的皮蝇三龄幼虫腹部第 10 体节 (图 2) 前缘有一排较大的刺, 后缘有分布稀疏的小刺。牛皮蝇三龄幼虫腹部第 10 体节前缘后缘均无刺; 中华皮蝇三龄幼虫腹部第 10 体节前缘后缘均有刺, 其中前排刺较大且呈不连续分布, 后排刺较小, 排列紧密, 呈多排连续线性分布 (朵红 2011); 纹皮蝇三龄幼虫腹部第 10 体节前缘无刺, 后缘刺小, 成直线分布 (杨玉林等 2011); 兔裸皮蝇三龄幼虫腹面第 10 体节前后缘都有刺, 前缘刺大, 后缘刺较小排列稀疏 (朵红等 2011)。经比较发现, 甘南藏族自治州高原鼯鼠的皮蝇三龄幼虫腹面第 10 体节特征与兔裸皮蝇基本相同。

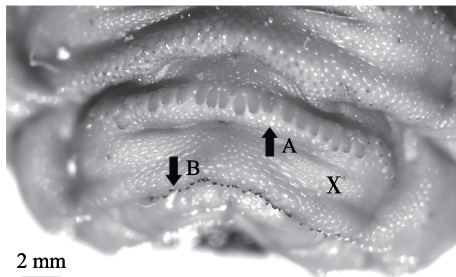


图 2 高原鼯鼠皮蝇三龄幼虫的第十体节腹面的刺 (40×)

Fig. 2 The spines on the ventral side of the 10th segment in the third instar larvae of studied torsiolo infecting Plateau Zokor

X. 第 10 体节; A. 第 10 体节前缘刺; B. 第 10 体节后缘刺。
X. The 10th segment; A. The spines on the anterior edge of the 10th segment; B. The spines on the posterior edge of the 10th segment.

感染甘南藏族自治州高原鼯鼠皮蝇三龄幼虫气门板 (图 3) 表面呈平面, 气门钮位于气门板中央, 并略高于气门板。牛皮蝇三龄幼虫气门板表面凹陷, 气门钮位于气门板中央, 并略低于气门板 (李伟 2007); 中华皮蝇三龄幼

虫气门板表面略凹陷, 气门钮位于气门板中央, 并略高于气门板; 纹皮蝇三龄幼虫气门板表面凹陷, 气门钮位于气门板 C 环开口处, 并略低于气门板 (庞程等 2008); 兔裸皮蝇三龄幼虫气门板表面呈平面, 气门钮位于气门板中央, 并略高于气门板。经比较后发现, 甘南藏族自治州高原鼯鼠皮蝇三龄幼虫气门板与兔裸皮蝇基本相同。

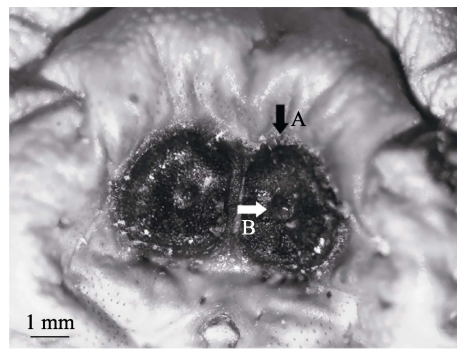


图 3 高原鼯鼠皮蝇三龄幼虫的气门板 (80×)

Fig. 3 The spiracular plates of the third instar larvae of studied torsiolo infecting Plateau Zokor

A. 气门板; B. 气门钮。
A. Spiracular plates; B. Ecdysal scar.

甘南藏族自治州高原鼯鼠所感染的皮蝇三龄幼虫与牛皮蝇、中华皮蝇、纹皮蝇和兔裸皮蝇的三龄幼虫形态学比较结果见表 1。初步鉴定甘南藏族自治州高原鼯鼠所感染的皮蝇幼虫与兔裸皮蝇相似。

2.2 进化树分析及同源性比较

用 DNAMAN 软件比对甘南藏族自治州高原鼯鼠所感染的 6 株皮蝇幼虫 (编号为 EF1、EF2、EF3、EF4、EF5、EF6) *COI* 基因序列, 发现所测序列之间存在不同程度的差异。本实验同时测定了一株感染同地区高原鼠兔的皮蝇幼虫 (编号为 OC1) *COI* 基因序列。测得的感染高原鼯鼠和高原鼠兔的皮蝇幼虫序列与 GenBank 中下载的牛皮蝇、中华皮蝇、纹皮蝇和兔裸皮蝇的 *COI* 基因序列用 MEGA7.0 软件建立进化树。结果显示, 感染高原鼯鼠和高原

鼠兔的皮蝇幼虫与兔裸皮蝇遗传距离较近，并处于同一分支，与牛皮蝇、中华皮蝇和纹皮蝇遗传距离较远（图 4）。

用 Megalign 软件对比分析感染高原鼢鼠和高原鼠兔的皮蝇幼虫与另外 4 种皮蝇幼虫 COI 基因序列，确定样本同其他皮蝇间的同源

性（表 2）。高原鼢鼠所感染的 6 株皮蝇幼虫，EF1、EF3、EF4 和 EF5 同源率为 100%，EF1 与 EF2、EF6 及感染高原鼠兔的皮蝇幼虫 OC1 同源性分别为 98.5%、99.2%和 99.2%。感染高原鼢鼠的皮蝇三龄幼虫与兔裸皮蝇序列的差异最小，平均差异为 0.63%，与中华皮蝇平均差

表 1 高原鼢鼠感染皮蝇三龄幼虫与其他皮蝇三龄幼虫的比较
Table 1 Comparison between the third instar larvae of studied torsalo infecting Plateau Zokor and other species in Hypoderminae

物种 Species	伪头 Pseudocephalon	第 2 体节刺 Spines of the 2nd segment	第十体节腹面刺 Ventral spines of the 10th segment	气门板表面 Spiracular plates surface	气门钮 Ecdysal scar
牛皮蝇 <i>Hypoderma bovis</i>	2 个较小肉质突起 2 smaller fleshy protuberances	背腹部均为 5 簇 5 clusters in the back and abdomen	前后缘均无刺 No spines on the anterior and posterior edge	凹陷 Sunken	凹陷于气门板中央 Sunken in the center of the spiracular plates
中华皮蝇 <i>H. sinense</i>	2 个较大肉质突起 2 larger fleshy protuberances	背部 3 簇，腹部 6 簇 3 clusters in the back and 6 clusters in the abdomen	前缘断裂分布，后缘若干排 The anterior edge is fractured, and the posterior edge has several rows	略凹陷 Slightly sunken	突出位于气门板中央 Protruding in the center of the spiracular plates
纹皮蝇 <i>H. lineatum</i>	2 个较大肉质突起 2 larger fleshy protuberances	背部 3 簇，腹部 5 簇 3 clusters in the back and 5 clusters in the abdomen	前缘无刺，后缘呈直线排列 No spines on the anterior edge, and the posterior edge is arranged in a straight line	凹陷 Sunken	凹陷于气门板 C 环开口处 Sunken in the c-ring opening of the spiracular plates
兔裸皮蝇 <i>Oestromyia leporina</i>	2 个较小肉质突起 2 smaller fleshy protuberances	背部 1 簇，腹部 5 簇 1 cluster in the back and 5 clusters in the abdomen	前缘一排，后缘散在 The anterior edge is only one row, and the posterior edge spreads out	平面 Flat	稍突出位于气门板中央 Slightly protruding in the center of the spiracular plates
受检皮蝇 Studied torsalo	2 个较小肉质突起 2 small fleshy protuberances	背部 1 簇，腹部 5 簇 1 cluster in the back and 5 clusters in the abdomen	前缘一排，后缘散在 The anterior edge was only one row, and the posterior edge spread out	平面 Flat	稍突出位于气门板中央 Slightly protruding in the center of the spiracular plates

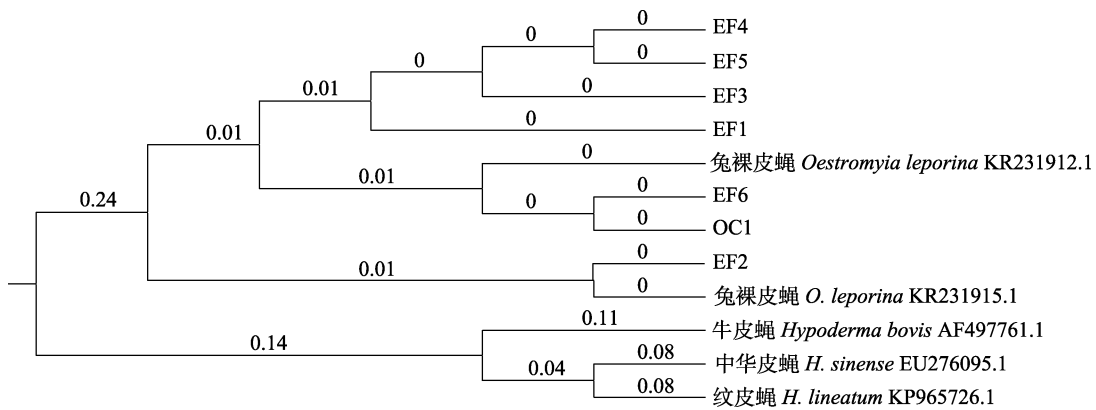


图 4 高原鼢鼠皮蝇与其他皮蝇 COI 基因序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree for COI sequence of studied torsalo infecting Plateau Zokor and the species in Hypoderma and Oestromyia

EF1 ~ EF6. 高原鼢鼠感染的 6 个皮蝇个体；OC1. 高原鼠兔感染的皮蝇；各支上的数据代表支长。

EF1-EF6. 6 individuals of torsalo infecting Plateau Zokor; OC1. The torsalo infecting Plateau Pika; the data on each branch represents the branch length.

表 2 高原鼯鼠皮蝇与其它皮蝇 COI 基因的相似度 (上三角) 和变异度 (下三角)

Table 2 Percentidentity (upper triangle) and divergence (lower triangle) of COI gene fragment sequences in studied torsalo infecting Plateau Zokor and different species of torsalo (%)

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 EF1		98.5	100.0	100.0	100.0	99.2	99.2	85.4	84.6	85.7	98.5	99.4
2 EF2	1.5		98.5	98.5	98.5	98.4	98.4	85.2	83.9	85.6	100.0	98.5
3 EF3	0.0	1.5		100.0	100.0	99.2	99.2	85.4	84.6	85.7	98.5	99.4
4 EF4	0.0	1.5	0.0		100.0	99.2	99.2	85.4	84.6	85.7	98.5	99.4
5 EF5	0.0	1.5	0.0	0.0		99.2	99.2	85.4	84.6	85.7	98.5	99.4
6 EF6	0.8	1.7	0.8	0.8	0.8		100.0	85.2	84.4	85.7	98.4	99.8
7 OC1	0.8	1.7	0.8	0.8	0.8	0.0		85.2	84.4	85.7	98.4	99.8
8 中华皮蝇 <i>H. sinense</i>	16.3	16.5	16.3	16.3	16.3	16.5	16.5		90.4	92.9	85.2	85.4
9 牛皮蝇 <i>H. bovis</i>	17.3	18.1	17.3	17.3	17.3	17.5	17.5	10.3		90.7	83.9	84.4
10 纹皮蝇 <i>H. lineatum</i>	15.9	16.1	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	7.6	9.9		85.6	86.9
11 兔裸皮蝇 <i>O. leporina</i> KR231915.1	1.5	0.0	1.5	1.5	1.5	1.7	1.7	16.5	18.1	16.1		98.5
12 兔裸皮蝇 <i>O. leporina</i> KR231912.1	0.7	1.50	0.7	0.7	0.7	0.2	0.2	16.3	17.5	15.7	1.5	

EF1 ~ EF6 分别代表高原鼯鼠感染的 6 个皮蝇个体; OC1 代表高原鼠兔感染的皮蝇。

EF1-EF6 respectively represents 6 individuals of torsalo infecting Plateau Zokor; OC1 represents the torsalo infecting Plateau Pika.

异 16.37%, 与牛皮蝇平均差异 17.47%, 与纹皮蝇平均差异为 15.93%。EF2 虽与 EF1、EF3、EF4、EF5、EF6 及 OC1 同源性略小, 经 Blast 搜索其与兔裸皮蝇序列同源性为 100%。据上述分析确定感染高原鼯鼠和高原鼠兔的皮蝇为兔裸皮蝇。

3 讨论

3.1 高原鼯鼠寄生皮蝇的形态鉴定

皮蝇亚科幼虫最常见的宿主有牛、羊、羚羊等偶蹄目动物 (庞程 2008)。国内外对感染高原鼯鼠和高原鼠兔皮蝇的研究报道较少。本研究在体视显微镜下对高原鼯鼠所感染的皮蝇三龄幼虫进行观察, 并与我国西北地区常见的牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇和兔裸皮蝇对比, 初步证实高原鼯鼠感染的皮蝇为兔裸皮蝇。曹展硕 (2014)、付永 (2016) 对牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇、兔裸皮蝇进行了形态学观察,

描述了这 4 种皮蝇在伪头、第 2 体节背部和腹部刺、第 10 节腹部前后缘刺以及气门板部位的异同。本研究在体视显微镜下观察高原鼯鼠所感染的皮蝇伪头、第 2 体节刺、第 10 节腹部刺以及气门板部位的形态特征, 均与兔裸皮蝇三龄幼虫的形态特征相似。传统的形态学分类鉴定对样本要求高, 而当标本未成熟和畸形时, 伪头、体节刺、气门板等形态指标不易观察导致鉴定结果不准确, 需要做进一步的分子鉴定。

3.2 高原鼯鼠寄生皮蝇的分子鉴定

对高原鼯鼠所感染皮蝇三龄幼虫的 COI 基因部分序列进行扩增, 并与牛皮蝇、纹皮蝇、中华皮蝇和兔裸皮蝇的 COI 基因序列进行对比, 证实高原鼯鼠感染的皮蝇为兔裸皮蝇。分子生物学的发展为物种的分子鉴定提供了有效的手段, 由于线粒体基因呈母系遗传、易于分离、拷贝数高, 并内含保守序列, 可用通用引物进行扩增。其中线粒体 COI 基因序列变异一

般表现为种间差异大, 种内差异小, 因此广泛应用于哺乳动物和节肢动物的分类学、种群进化研究 (Otranto et al. 2002, Footit et al. 2009, Wang 2014)。位于 *COI* 基因的特殊编码区域 UEA7 到 UEA10 在昆虫之间变化程度最高, 适合于低水平的系统发育研究, 如亲缘关系密切的物种之间的关系分析和群体遗传研究 (Zhang et al. 1997, Dong et al. 2018)。目前, *COI* 基因已被成功地用作评价双翅目昆虫及直翅目 (Orthoptera) 昆虫幼虫的进化关系标记物 (Rakhshandehroo et al. 2019)。Meiklejohn 等 (2011) 对麻蝇科 (Sarcophagidae) 16 种 85 个样本进行了 *COI* 基因分析, 结果显示, 种内差异率为 0.000% ~ 1.499%, 种间差异率为 0.7% ~ 27.0%, 并指出 *COI* 基因可用于麻蝇科分子鉴定。本研究中, 高原鼯鼠所感染的皮蝇三龄幼虫 6 个样本间平均差异为 0.38%, 与牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇的序列差异性较大, 平均差异为 15.93% ~ 17.47%, 但与兔裸皮蝇的差异小, 仅为 0.63%。Otranto 等 (2002) 指出种内变异的最高值低于种间变异的最低水平。因此本研究分子鉴定结果可靠, 可以确定高原鼯鼠所感染的皮蝇为兔裸皮蝇。

在真核生物中, 18S rRNA 基因用于编码核糖体小亚基 RNA, 长约 2 000 bp, 该基因序列高度保守 (程汉良等 2008)。核糖体 18S rRNA 基因可作为分子标记进行真核生物的遗传分析和物种鉴定 (Shakoori et al. 2015, 张卫兴等 2019)。关贵全 (2004) 对甘肃、青海感染牛皮蝇三龄幼虫进行了 *COI* 基因和 18S rRNA 基因测定与分析, 其结果表明, 牛皮蝇、纹皮蝇和中华皮蝇 18S rRNA 基因的种间差异率为 1.30% ~ 1.71%, *COI* 基因种间差异率为 4.01% ~ 11.5%。Caterino 等 (2000) 指出, *COI* 基因、18S rRNA 基因、16S rRNA 基因和 *EF-1 α* 基因可作为昆虫分子系统学研究的标准分子标记。不同基因进化速率不同, mtDNA 进化速率较快, 适合于种内或近缘物种的分类研究; 而核糖体 DNA 进化速率较慢, 适合于远缘种

或高级分类阶元的分类研究 (黄华平等 2006, 张伟南 2015)。因此, 选择分子标记进行皮蝇分子系统学研究时, *COI* 基因优于 18S rRNA 基因。

3.3 皮蝇防控的影响因素

经长期进化, 不同种类的皮蝇幼虫专性寄生于不同种类的宿主, 兔裸皮蝇幼虫主要寄生于高原鼠兔体内, 也有兔裸皮蝇寄生于中华鼯鼠 (*E. fontanierii*) 的报道 (刘德山 1984)。本研究表明, 兔裸皮蝇幼虫也可寄生于高原鼯鼠体内, 为皮蝇蛆病流行规律与防治研究拓宽了视野。高原鼯鼠营地下生活, 兔裸皮蝇为适应地下黑暗环境, 其形态结构发生了变化。兔裸皮蝇同其他种类的皮蝇不同, 其成虫将卵产在宿主的皮毛上, 一龄幼虫孵出后钻入宿主皮下, 在幼虫发育成三龄幼虫的过程中, 幼虫在宿主体内不移动 (刘德山 1984)。蔡进忠等 (2009) 指出, 同一皮蝇物种在不同地区的成虫活动规律、产卵时间、三龄幼虫脱落时间、羽化时间等存在差异。今后也可对兔裸皮蝇生态学如成蝇活动时间、产卵时间、羽化时间等进行研究, 这些基础信息对皮蝇的监控防治有重要意义。

本研究限于采样数量较少, 未对兔裸皮蝇进行种群结构和历史动态分析, 今后应加大采样力度, 进一步研究寄生于啮齿动物的兔裸皮蝇的种群结构。例如, 在同种生境条件下, 兔裸皮蝇对不同种类、不同性别以及不同年龄段的啮齿动物宿主的选择倾向性; 也可对同一地区不同海拔兔裸皮蝇的感染率进行调查。兔裸皮蝇幼虫在高原鼯鼠皮下寄生过程中对高原鼯鼠机体造成损伤, 进一步的研究工作可深入了解兔裸皮蝇与啮齿动物的种群演变关系, 为兔裸皮蝇防治提供基础资料。

参 考 文 献

- Caterino M S, Cho S, Sperling F A H. 2000. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*, 45(1): 1-54.

- Dong J B, Bao H Q, Mang L. 2018. Ultramorphological and molecular characteristics of the larval stages of the horse nasal-myiasis fly, *Rhinoestrus* sp. (Diptera: Oestridae) from Mongolian horse in China. *Microscopy Research and Technique*, 81(2): 198–206.
- Footitt R G, Adler P H. 2009. *DNA Barcodes and Insect Biodiversity*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 419–421.
- Fu Y, Li W, Duo H, et al. 2016. Morphological and molecular characterization of *Oestromyia leporina* (Pallas, 1778) (Diptera: Hypodermatinae) from wild plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) in Qinghai province, China. *Experimental parasitology*, 161(2): 27–34.
- Meiklejohn K A, Wallman J F, Dowton M. 2011. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine*, 125(1): 27–32.
- Otranto D. 2001. The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. *Trends in parasitology*, 17(4): 176–82.
- Otranto D, Stevens J R. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 32(11): 1345–1360.
- Otranto D, Traversa D, Guida B, et al. 2003. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3): 307–315.
- Pape T, Blagoderov V, Mostovski M B. 2011. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148 (1): 212–221.
- Rakhshandehroo E, Razavi S M, Farzaneh R, et al. 2019. Phylogenetic analysis of goat warble fly (*Przhevalskiana silenus*) based on mitochondrial *COI* gene. *Journal of Parasitic Diseases*, 43(2): 304–307.
- Shakoori F R, Tasneem F, Al-Ghanim K, et al. 2015. Variability in secondary structure of 18S ribosomal RNA as topological marker for identification of Paramecium species. *Journal of Cellular Biochemistry*, 15(12): 2077–2088.
- Wang W, Zhang D, Hu D, et al. 2014. Population genetic structure of *asterophilus pecorum* in the Kalamaili Nature Reserve, Xinjiang, based on mitochondrial cytochrome oxidase (*COI*) gene sequence, *Medical and Veterinary Entomology*, 28(Suppl 1): 75–82.
- Zhang D X, Hewitt G M. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial *COI* primers in insect. *Insect Molecular Biology*, 6(2): 143–150.
- Zumpt F. 1965. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. London: Butterworths, 194–229.
- 蔡进忠, 李春花, 衣翠玲. 2009. 牦牛皮蝇蛆病病原分类学与生态学研究进展. *青海畜牧兽医杂志*, 39(6): 36–39.
- 曹展硕. 2014. 新疆野生盘羊皮蝇三期幼虫形态学观察和 *COI* 基因、18S rRNA 基因系统分析. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 14–45.
- 陈俊. 2010. 青海东部农业区皮肤蝇蛆病 12 例临床报告. *青海医药杂志*, 40(4): 24–25.
- 陈秋菊. 2019. 肉牛皮蝇蛆病的流行特点、临床表现及防治措施. *现代畜牧科技*, (11): 74–75.
- 程汉良, 彭永兴, 王芳, 等. 2008. 6 种帘蛤科贝类 18S rRNA 基因全序列比较分析. *中国水产科学*, 15(4): 559–567.
- 达珍. 2016. 西藏地区小儿皮肤蝇蛆病 21 例临床分析. *西藏科技*, (6): 41–42.
- 朵红. 2011. 牦牛中华皮蝇蛆和藏羊的皮蝇蛆扫描电镜形态学比较观察. *青海畜牧兽医杂志*, 41(5): 16–17.
- 朵红, 李伟, 付永. 2011. 青海称多县高原鼠兔感染皮蝇蛆调查及形态学观察. *中国兽医杂志*, 47(12): 52–53.
- 付永. 2016. 青海 4 种皮蝇蛆病病原分类及差异蛋白组学研究. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 13–39.
- 高慧. 2010. 驯鹿皮蝇蛆病病原形态及分类学研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 12–54.
- 高兴春, 蔡进忠, 徐梅倩, 等. 2008. 藏羚羊中华皮蝇蛆的分子生物学鉴定. *中国兽医学报*, 28(9): 1037–1039.
- 关贵全. 2004. 牛皮蝇蛆病血清流行病学及病原分子分类学研究. 兰州: 中国农业科学院硕士学位论文, 23–32.
- 黄华平, 杨腊英, 王国芬, 等. 2006. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用. *华南热带农业大学学报*, 12(4): 45–49.
- 蒋次鹏. 2003. 1995~2002 年我国 107 例人体蝇蛆病综合分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 21(1): 57–58.
- 李伟. 2007. 应用扫描电子显微镜对牦牛皮蝇三期幼虫的形态学

- 观察. 青海畜牧兽医杂志, 37(1): 19-20.
- 刘德山. 1984. 兔胡颜皮蝇(*Oestromyia leporina* Pallas, 1778)的形态学特征与其物种演变的关系. 兰州医学院学报, (1): 12-17.
- 刘建枝, 色珠, 关贵全, 等. 2012. 西藏当雄牦牛皮蝇蛆病原的分子分类鉴定. 中国兽医科学, 42(3): 238-242.
- 罗建勋, 殷宏, 惠禹, 等. 2003. 伊维菌素微量给药法对牛皮蝇蛆病的防治效果观察. 中国兽医科技, 33(7): 67-68.
- 庞程. 2008. 藏羚羊皮蝇二期幼虫三期幼虫比较形态学和 *COI*、*16S rRNA* 基因系统发育分析. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 3-52.
- 庞程, 蔡进忠, 高兴春, 等. 2008. 在藏羚羊上发现的中国第四种皮蝇. 昆虫学报, 51(10): 1099-1102.
- 孙博. 2011. 驯鹿鹿皮蝇蛆病流行病学及对机体抗氧化能力影响的研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 3-6.
- 孙亚丽, 张洪波, 陈刚, 等. 2015. 牦牛中华皮蝇三期幼虫和高原鼠兔皮蝇三期幼虫扫描电镜形态学比较. 畜牧与兽医, 47(10): 114-117.
- 唐忠民. 2010. 甘南草原鼠害区划及主要害鼠防治技术与防控战略研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 7-8.
- 薛万琦, 赵建铭. 1994. 中国蝇类. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 2230-2255.
- 杨玉林, 李春花, 谢仲强, 等. 2011. 达日地区牦牛皮蝇蛆病流行病学调查. 畜牧与兽医, 43(9): 69-71.
- 张伟南. 2015. 蚊蛉亚科部分种类 *18S rRNA*、*16S rRNA* 和 *COI* 基因序列及分子系统学研究. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 5-6.
- 张卫兴, 王龙, 田守龙, 等. 2019. 山羊腔阔盘吸虫的形态学观察和分子鉴定. 动物医学进展, 40(2): 34-38.
- 赵玉婷, 李文龙, 陈迪, 等. 2017. 高寒牧区草地生态系统健康动态评价——以甘南地区为例. 草业科学, 34(1): 16-29.