

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.046

## DNA 标记技术在螨类系统学研究中的应用 \*

易忠权 夏 伟 赵盼雯 崔玉宝<sup>△</sup>

(东南大学医学院附属盐城医院中心实验室 江苏 盐城 224000)

**摘要:**长期以来,螨类主要依靠其形态特征进行系统学研究。DNA 标记是指能反映生物个体或物种间基因组中某种差异特征的 DNA 片段。近年来,DNA 标记技术在螨类系统学研究中得到越来越广泛的应用。本文综述了随机扩增多态性 RAPD、限制性内切酶片段长度多态性 RFLP、微卫星 SSR、核酸序列扩增、扩增片段长度多态性 AFLP 和直接扩增片段长度多态性 DALP 等 6 种 DNA 标记技术在螨类系统学研究中的应用现状及前景。

**关键词:**DNA 标记;螨类;RAPD;RFLP;SSR;核酸序列分析;AFLP;DALP

**中图分类号:** R384.4;R-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)31-6196-05

## DNA Markers in the Systematic Study of Mites\*

YI Zhong-quan, XIA Wei, ZHAO Pan-wen, CUI Yu-bao<sup>△</sup>

(Department of Central Laboratory, Affiliated Yancheng Hospital, School of Medicine, Southeast University, Yancheng, Jiangsu, 224000, China)

**ABSTRACT:** For a long time, mites mainly rely on the morphological characteristics in the systematic study. DNA markers are DNA fragments which can reflect the characteristics of the genome between individual species or species. Recently, the application of DNA markers has become more and more important in the systematic study of mites. The present situation and prospect of DNA markers, RAPD (Random Amplified Polymorphic), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), DNA Sequence Analysis, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism), used in the systematic study of mites are described here, which will be helpful for research on acarology.

**Key words:** DNA markers; mites; RAPD; RFLP; SSR; DNA Sequence Analysis; AFLP; DALP

**Chinese Library Classification(CLC):** R384.4; R-331 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)31-6196-05

### 前言

螨类是一类微小的节肢动物,隶属于蛛形纲(Arachnida)蜱螨亚纲(Acari)。由于螨类具有较小的个体、复杂的生活周期的特点,并且多态性和生物型具有分化现象,因而仅仅依靠螨类的形态特征很难区分近缘种类和生物型<sup>[1]</sup>。20 世纪分子生物学的革命性变化,尤其在 80 年代中期聚合酶链反应技术和自动 DNA 测序方法的产生,促进了分子生物学在螨类系统学研究中的应用<sup>[2]</sup>。

随着分子生物学的迅速发展,新方法和新技术被不断地引入到螨类系统学研究中。DNA 标记作为新的分子生物技术标记,它是一种特异性 DNA,能够反映生物个体或者种群之间基因组的差异性。在螨类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)、核酸序列分析技术、扩增片段长度多态性技术(AFLP)和直接扩增片段长度多态性技术(DALP)。本文重点分析了这 6 种 DNA 标记技术在螨类系统学研究中的应用现状及前景。

### 1 随机扩增多态性 DNA(RAPD)

RAPD 技术于由 William 等创立<sup>[3]</sup>,设计具有随机性的寡核苷酸单链(通常由 8-10 个碱基组成)为引物,以单引物对研究基因组进行 PCR 扩增,退火温度一般比普通 PCR 低,扩增结果由电泳检测。随机引物在基因组 DNA 上不同的结合结果通过 RAPD 图谱显示。由于物种的差异,图谱上条带具有差异性。因此,RAPD 图谱上 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 的多态性<sup>[4,5]</sup>。

RAPD 技术自创立以来,在螨类系统学研究中已有较多的应用。Yli-Mattila 等(2000)运用 RAPD 技术分析了芬兰真绥螨(*Euseius finlandicus*),结果表明在形态类似的芬兰真绥螨中存在 2 个不同品系<sup>[6]</sup>。Rodrigues 等(2004)同时对来自佛罗里达州(美国)和圣保罗(巴西)的细须螨科(*Tenuipalpidae*)紫红短须螨(*Brevipalpus phoenicis*)运用 RAPD 技术和 CO I 序列进行多态性分析;研究结果证实了佛罗里达州(美国)和圣保罗(巴西)的紫红短须螨为一个单系群,并且这 2 种方法所得出的结论基本一致<sup>[7]</sup>。赵亚娥等(2009)运用 RAPD 技术分析毛囊蠕形螨(*Demodex folliculorum*)和皮脂蠕形螨(*D. brevis*)基因组 DNA 的多态性,对相关条带进行测序分析;结果显示,毛囊蠕形螨共扩增出 15 条带,皮脂蠕形螨共扩增出 12 条带,两种蠕形螨既

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(NSFC31572319)

作者简介:易忠权(1990-),硕士研究生,主要研究方向:尘螨与过敏性疾病

△ 通讯作者:崔玉宝,副教授/副研究员,E-mail:ybcui1975@hotmail.com

(收稿日期:2016-12-28 接受日期:2017-01-23)

有共有条带,又分别有特异性条带;341 bp 碱基序列为毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨所共有,同源性高达 99.4%,序列片段为 855 bp 的特异性条带为毛囊蠕形螨所特有。研究显示:RAPD 技术可实际应用在这两种人体蠕形螨基因组 DNA 的多态性研究中<sup>[8]</sup>。Guerra 等(2010)用 RAPD 技术分析了巴西及其它美洲地区的狄斯瓦螨(*Varroa destructor*)的种群分布情况;结果显示在巴西及南美周边地区,俄罗斯基因型占优,而日本基因型只存在于巴西的迪诺罗尼亚岛<sup>[9]</sup>。赵岩(2011)用 RAPD 技术对寄生于人体的毛囊蠕形螨(*D. folliculorum*)、皮脂蠕形螨(*D. brevis*)和寄生于山羊的山羊蠕形螨(*D. caprae*)进行分类地位上的分析;筛选了 12 条引物,以有代表性的 5 条引物进行扩增分析,结果显示毛囊蠕形螨和皮脂蠕形螨均寄生于人体,虽然寄生宿主一样,但亲缘关系却较远;皮脂蠕形螨与山羊蠕形螨虽寄生宿主不一样,但亲缘关系反而较近<sup>[10]</sup>。

RAPD 技术有如下特点:运用 RAPD 技术所扩增的基因片段具有随机性,可用于研究未知基因组;在技术上具有快速、简便、多态性检出率高、可自动分析等优点。

## 2 限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)

RFLP 技术首先是用特定种类的限制性内切酶处理基因组 DNA,依据产生的 DNA 片段的差异性,构建多态性酶切图谱,最终进行系统进化和亲缘关系分析的技术。由于不同种群的个体基因的差异性,在进行酶切处理后,会产生具有种群特异性的酶切图谱。酶切图谱的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 的多态性。PCR-RFLP 技术是基于传统 RFLP 技术的一种改进,首先通过设计特异引物对某一特定基因片段进行扩增,再进行 RFLP 分析。

PCR-RFLP 技术可以检测基因组内的变异,由于不受螨类自身发育阶段和所处环境条件的影响,被广泛用于各种螨类系统学的研究。Liu 等(2004)用 PCR-RFLP 技术分析研究了来自恙虫病东方体山东分离株和恙虫病病人全血,以及小盾纤恙螨匀浆中提取的 DNA *Sta56* 基因,同时将其与 Nested PCR 的结果进行比较发现:山东地区恙虫病东方体流行株主要基因型与日本地方株 Kawasaki 型类似,但与日本地方株存在遗传差异,其结果与 Nested PCR 基因分型的结果相一致<sup>[11]</sup>。Carew 等(2004)通过分子标记方法分析了 3 种危害葡萄的害螨芽瘿螨(*Bud mite*)、疱螨(*Pagenstecher*)和锈螨(*Nalepa*)的分类地位及群体遗传结构;基于 ITS 1 基因的 PCR-RFLP 方法结果证明:锈螨在种分类上的具有独立地位并且发现芽瘿螨和疱螨形态学上类似,但属于不同的物种。对芽瘿螨和疱螨种群 SSR 分析显示,芽瘿螨和疱螨种群处于低运动层次;这表明:在防治芽瘿螨和疱螨种群时,本地化的控制策略是必要的,可以有效地控制它们的传播<sup>[12]</sup>。Wong SF 等(2011)建立的依据 ITS 2 基因的 PCR-RFLP 方法用来分析、鉴定屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*)、粉尘螨(*D. farinae*)、热带无爪螨(*Blomia tropicalis*)、腐食酪螨(*Tyrophagus putrescentiae*)和椭圆食粉螨(*Aleuroglyphus ovatus*);结果显示不同的螨类可以通过依据 ITS 2 基因的 PCR-RFLP 方法区分,表明这种方法可以有效地应用到其它螨类的系统学研究中<sup>[13]</sup>。Bouneb 等(2014)建立依靠 CO I 基因的 PCR-RFLP 方法,简单、快速、准确检测树芽中瘿螨总科(*Eriophyoidea*)羽瘿螨科(*Juniperinus*)的分布情况,对

树芽的防治具有重要作用<sup>[14]</sup>。崔玉楠(2014)基于形态学和 ITS 基因的 PCR-RFLP 相结合的方法,对叶螨科(*Tetranychidae*)内 6 个物种:卢氏叶螨(*T. ludeni*)、截形叶螨(*T. truncatus*)、二斑叶螨(*T. urticae*)、豆叶螨(*T. phaselus*)、神泽氏叶螨(*T. kanzawai*)和皮氏叶螨(*T. piercei*)进行鉴定。通过检测和分析种间 ITS 序列的差异、DNA 多态性及酶切片段特异性,筛选到 3 个限制性内切酶(*RsaI*、*DdeI*、*MfeI*)可用于建立 RFLP 图谱;研究表明基于形态学和 ITS 基因的 PCR-RFLP 相结合的方法能够准确鉴定这 6 个物种<sup>[15]</sup>。岳秀丽(2014)建立以 PCR 产物直接测序和 PCR-RFLP 技术相结合的应用手段,检测了室内二斑叶螨抗甲氰菊酯种群靶标的突变位点;研究表明:具有特异性的 2 对引物 B1 和 B2、C1 和 C2 可检测室内二斑叶螨抗甲氰菊酯种群的两种突变;研究表明:以 PCR 产物直接测序和 PCR-RFLP 技术相结合的方法具有一定的田间应用可行性<sup>[16]</sup>。

PCR-RFLP 技术能反映 DNA 分子水平上的差异,结果稳定可靠,重复性好;分析种群多态性的信息量大,在构建系统演化、群体遗传连锁图谱和指纹图谱中有重要应用价值。

## 3 微卫星(SSR)

微卫星(*Microsatellite*)又称简单串联重复序列(*SSR*),在真核生物基因组重复序列中,其占主要部分,SSR 是由核心序列和侧翼序列组成。其中核心序列是由重复单元重复串联组成,每个重复单元碱基数在 2-6 之间,重复单元之间无间隔,整个核心序列长度从几十到几百 bp 不等。侧翼序列具有特异性,为单拷贝序列,一般位于核心序列的两端。SSR 原理是根据较保守的侧翼序列设计特异性引物进行 PCR 扩增,根据扩增产物的差异性来反应微卫星的多态性<sup>[17]</sup>。

虽然微卫星 DNA 通常被认为普遍存在于真核生物中<sup>[17]</sup>,但是有研究表明,节肢动物基因组内 SSR 含量较为稀少,开发难度大<sup>[18]</sup>。Evans 等(2007)对大蜂螨(*Varroa jacobsoni*)通过分析比较,得到 9 个微卫星位点<sup>[19]</sup>,随后 Evans 等(2008)证明微卫星标记技术适用于该螨的种群遗传结构研究<sup>[20]</sup>。李婷(2008)利用微卫星标记的方法,分析了中国二斑叶螨和朱砂叶螨(*T. cinnabarinus*)的种群遗传结构,通过比较两者种群遗传结构的差异,进一步研究了两者的亲缘关系。这为防治害螨的入侵,减少其造成的危害奠定了理论基础<sup>[21]</sup>。Sun 等(2014)研究了来自柑桔全爪螨(*Panonychus citri*)表达序列标签(EST)的 15 个新的多态性微卫星,发现其中 12 个微卫星位点显著偏离哈迪-温伯格平衡,造成这种现象的原因很可能是地理隔离引起的近亲交配和等位基因遗传漂变<sup>[22]</sup>。魏丹丹等(2016)通过磁珠法构建了柑橘全爪螨的微卫星富集文库,发掘柑橘全爪螨基因组微卫星(gSSR)序列。同时,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,设计柑橘全爪螨微卫星(SSR)引物并验证其适用性。结果显示柑橘全爪螨 gSSR 核心重复次数要远多于从转录组数据库获得的 EST-SSR, gSSR 和 EST-SSR,并且其中具有三碱基 SSR 具有更好的优化率<sup>[23]</sup>。

微卫星技术有如下特点:结果稳定可靠、重复性好;在基因组中多态性高,并且等位基因数目多、呈共显性遗传。

## 4 核酸序列分析

核酸序列分析技术是一种通过同源核酸序列之间的比较

来进行分析的技术。基于不同种群之间基因的差异性,构建系统发育树,以此推断不同类群间的系统发育关系。在不同的分类阶元进行核酸序列分析时,依据分类阶元选取不同的基因至关重要:研究高阶元时一般选取进化速率慢的基因,反之选取进化速率快的基因。在螨类核酸序列分析中常用的基因主要来自:核糖体基因和线粒体基因。

#### 4.1 核糖体基因在螨类核酸序列分析中的应用

在螨类核酸序列分析中常用的核糖体基因有 18S rDNA、28S rDNA。Maraun 等(2004)以甲螨目(Oribatida)中有代表性的无性生殖种类和有性生殖种类为研究模版,测序分析了 28S rDNA 的第三结构域(D3),分析结果表明了核糖体第三结构域(D3)是一个较好的分子标记<sup>[24]</sup>。李国庆等(2010)通过研究核糖体 28S rRNA 的 D1、D2 部分来阐述叶螨科 6 个属 11 个物种的系统发生关系;研究结果证实了以前从形态学上定义的叶螨属(Tetranychus)、岩螨属(Petrobia)、全爪螨属(Panonychus)、裂爪螨属(Schizotetranychus)、缺爪螨属(Aponychus)和双叶螨属(Amphitetranychus)6 个属分别形成一个单系,但是没有很好地确定叶螨属内土耳其斯坦叶螨(T. turkestanii)、截形叶螨(T. truncatus)、朱砂叶螨(T. cinnabarinus)、神泽叶螨(T. kanzawai)和二斑叶螨(T. urticae),及全爪螨属内柑橘全爪螨(Pa. citri)和苹果全爪螨(Pa. ulmi)的系统发生地位;研究结果同时表明虽然 28S rRNA 序列无法将叶螨鉴定到种水平,但却为属水平上的鉴定提供了重要的参考依据<sup>[25]</sup>。张素卿(2011)基于 18SrDNA 和 28SrDNA 对肉食螨亚科 Cheyletinae 常见的 4 种肉食螨:马六甲肉食螨(C. malaccensis)、强壮肉食螨(C. fortis)、转开肉食螨(C. aversor)和磷翅触足螨(Ch. lepidopterorm)的系统关系进行了分析,结果发现马六甲肉食螨与强壮肉食螨为同物异名种。同时对 5 个地理种群的马六甲肉食螨的 18SrDNA 和 28SrDNA 基因进行测序分析,结果表明此两段核糖体基因相对比较保守,不适于做肉食螨种内差异分析<sup>[26]</sup>。Dabert 等(2014)依据 28S rDNA 的第二结构域(D2)和 CO I 基因,分析了异羽螨科(Alloptidae)2 属的分类地位及进化关系<sup>[27]</sup>。

转录间隔区 ITS 在螨类核酸序列分析中也是常用的核糖体基因。Navajas(1992)首次将 ITS2 运用在螨类的分类学上,表明 ITS 2 适合分析属内的系统发育关系<sup>[28]</sup>。古小彬等(2009)依据 ITS 2 对动物寄生螨虫疥螨属(Sarcoptes)和足螨属(Choriotopes)的常见螨种的亲缘关系进行了研究<sup>[29]</sup>。邹志文等(2011)分析比较钝绥螨(Amblyseinae)的 ITS 1、ITS 2,探讨其作为分子手段应用于种类鉴定,同时应用此分子标记来分析钝绥螨的亲缘关系,数据结果支持尼氏真绥螨(E. nicholsi)和卵圆真绥螨(E. ovalis)现在的分类地位,而小新绥螨属(Neosciulus)与钝绥螨属(Amblyseius)似乎未达到属间差异,其分类地位有待进一步确定<sup>[30]</sup>。罗奇花(2011)依据 ITS 1、ITS2 和 CO I 调查了中国西方蜜蜂群内小蜂螨(Tropilaelaps)的自然种系构成。结果发现:寄生在中国西方蜜蜂群内的小蜂螨全部属于梅氏热厉螨(T. mercedesae),而并非早期定义的亮热厉螨(T. clareae)<sup>[31]</sup>。

#### 4.2 线粒体基因在螨类核酸序列分析中的应用

螨类核酸序列分析中使用较多的线粒体基因有 16S rDNA、12S rDNA 和 CO I 基因。De 等(2001)依据 16S rDNA 分析了 6 种鼻刺螨及两个亚种的系统发育关系;分析结果表明 6 种鼻刺螨可以被分为两大类群,这与传统形态分类结果是统一

的,并且通过测序差异结果可以明确鉴定出为两个亚种,研究结论证实了 16S rDNA 较适合分析相近种类的系统发育关系<sup>[32]</sup>。Skerratt 等(2002)依据 12S rDNA 研究了来自不同宿主的疥满的种群关系,结果显示,依据 12S rDNA 能将来自三个不同宿主的疥满很好区分开,12S rDNA 基因适合疥满的种群关系的研究<sup>[33]</sup>。Suarez-Martinez 等(2005)分析尘螨 4 科:屋尘螨、私食甜螨(Glycyphagus privatus)、椭圆食粉螨和热带无爪螨(Bloimia tropicalis)的 12S rDNA 序列,对不同科类属不同种属间的尘螨的鉴别提供了理论依据<sup>[34]</sup>。Sastre(2012)等用 16S rDNA 分析了三种犬螨形螨的系统发育关系<sup>[35]</sup>。

Emsting 等(2006)用 CO I 研究了台湾蚌螨(Unionicola formosa)系统发育关系<sup>[36]</sup>。程剑等(2008)利用线粒体 COI 基因序列探讨蚌螨的系统发育,从基因层次上对中国淡水水域中营寄生生活的蚌螨进行系统发育分析<sup>[37]</sup>。Yang 等(2011)用 ITS 2 和 CO I 基因分析了无气门亚目 6 种螨类:椭圆食粉螨、热带无爪螨、粉尘螨、屋尘螨、腐食酪螨和梅氏嗜霉螨(Euroglyphus maynei)的系统发育关系,并证实 ITS 2 和 CO I 适合作为可靠的分子标记分析属内的系统发育关系<sup>[38]</sup>。古小彬等(2013)以兔痒螨为研究对象,通过 PCR 方法扩增兔痒螨的部分线粒体基因组序列,同时与 GenBank 中登陆的其他螨类的同源基因进行比较分析。报道了兔痒螨部分线粒体基因 CO I、CO II、12S rDNA 和 16S rDNA 等序列,为进一步痒螨分子分类学研究奠定了基础<sup>[39]</sup>。

### 5 扩增片段长度多态性(AFLP)

AFLP 技术是由荷兰科学家 Vos 发明的集 RFLP 的可靠性和 RAPD 的高效性于一体的一项专利技术<sup>[40]</sup>。AFLP 标记的原理:首先对基因组 DNA 进行特定酶切,之后经 PCR 反应进行特异性选择扩增。由于不同来源 DNA 片段之间的差异性,产生的酶切片段存在差异,进而 PCR 选择性扩增产生的产物具有多态性,扩增产物的多态性反映了基因组的多态性<sup>[41]</sup>。Weeks 等在螨类系统学的研究中成功应用 AFLP 技术,运用 AFLP 技术对来自两种不同寄主植物上的二斑叶螨种群进行了研究;研究表明:由于寄主植物的不同,这两种群产生差异,在分类系统中聚类成两个分支。同时他们研究了适用于螨的 AFLP 程序,并分析了此技术用于螨类不同种群间系统学的研究的优缺点<sup>[42]</sup>。

### 6 直接扩增片段长度多态性(DALP)

DALP 技术由法国科学家 Desmarais 基于随意扩增技术的基础上发展而来,通过扩增产物直接测序来检测基因多态性的一种技术<sup>[43]</sup>。

DALP 技术在技术原理上看仍属于随机引物扩增技术的领域,其特点是采用了以特异性序列 M13 为核心设计扩增的引物,极大地简化了扩增后进一步的测序和序列分析步骤。其中特异性基因序列 M13 广泛存在于原核、真核细胞基因组当中,且具有多个重复区域,这使 DALP 的广泛应用成为可能。同时,DALP 是共显性标记,适用于检测种群间的遗传变异等。

### 7 小结与展望

分子生物技术的不断发展为螨类系统学的研究提供了新的研究手段,上述的几种 DNA 标记技术的应用,使螨类的系统

发育建立在稳定可靠的分子数据基础之上,在很大程度上提高了螨类在系统学分类鉴定上的可重复性和依赖性<sup>[4]</sup>。

诸多 DNA 标记中, 核酸序列分析技术成为螨类系统学研究中热门的 DNA 标记手段。在核酸序列分析技术中, 选择适合不同分类阶元的进化速率基因尤为重要。在螨类系统学研究中已经有一些比较成熟方法的应用, 并且一些特定螨类种群的基因序列已经被测定, 这证明了 DNA 标记技术的稳定可靠<sup>[9]</sup>。然而在实际应用中, 如果仅仅依据 DNA 标记技术, 经常会出现与形态系统学分类结果不一致的情况, 因此采用基于形态学与 DNA 标记技术相结合对螨类系统学进行综合性研究, 不失为一个可靠的方法<sup>[44]</sup>。随着 DNA 标记技术不断的改进, DNA 标记技术将在螨类系统学研究中得到更广泛的应用。

#### 参考文献(References)

- [1] Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review [J]. *Exp Appl Acarol*, 2000, 24(10-11): e270-e271
- [2] Cruickshank RH. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks[J]. *Syst Appl Acarol*, 2010, (3): 3-14
- [3] 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
- [4] 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  
Zhang Xu, Jin Dao-chao, Guo Jian-jun, et al. The molecular markers in the systematic study of mites [J]. *Chin Bull Entomol*, 2008, 45(2): 198-203
- [5] 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  
Zhao Yan. The application analysis of several molecular markers in the research on *Demodex* [J]. *J Med Pest Control*, 2011, (7): 622-623
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 赵亚娥, 成慧. 毛囊蠕形螨与皮脂蠕形螨基因组 DNA 的 RAPD 分析和序列比对[J]. *昆虫学报*, 2009, 52(11): 1273-1279  
Zhao Ya-e, Cheng Hui. RAPD analysis and sequence alignment of genomic DNA of hair follicle mites *Demodex folliculorum* and *D. brevis* (Acari: Demodicidae)[J]. *Acta Entomol Sin*, 2009, 52(11): 1273-1279
- [9] Guerra JCR, Issa MR, Carneiro FE, et al. RAPD identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas [J]. *Genet Mol Res Gmr*, 2010, 9(1): 303-308
- [10] 赵岩. 三种蠕形螨的形态学和 RAPD 研究 [D]. 山东大学, 2007: 47-52  
Zhao Yan. Study of morphology and RAPD of three species of *Demodex*[D]. Shandong University, 2007: 47-52
- [11] Liu YX, Zhao ZT, Gao Y, et al. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* strains isolated in Shandong Province, China by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2004, 35(2): 353-357
- [12] Carew ME, Goodisman MAD, Hoffmann AA. Species status and population genetic structure of grapevine eriophyoid mites [J]. *Entomol Exp Appl*, 2004, 111(2): 87-96
- [13] 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
- [14] Bouneb 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
- [15] 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  
Cui Yu-nan. Quick identification of *Tetranychus* spider mites using morphological characters and RFLP technology [D]. Nanjing Agricultural University, 2014: 35-39
- [16] 岳秀利. 二斑叶螨对甲氧菊酯抗性的分子检测及田间抗性监测技术研究[D]. 甘肃农业大学, 2014: 26-31  
Yue Xiu-li. Study on the resistance molecular detection and field monitoring techniques of *Tetranychus urticae* to fenprothrin [D]. Gansu Agricultural University, 2014: 26-31
- [17] 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
- [18] 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
- [19] 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
- [20] 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
- [21] 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  
Li Ting. Population genetic structures of *Tetranychus urticae* Koch and *T. cinnabarinus* (boisduval) (Acari: Tetranychidae) based on Microsatellite markers[D]. Nanjing Agricultural University, 2008: 21-26
- [22] Sun JT, Kong LW, Wang MM, et al. Development and characterization of novel EST-Microsatellites for the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)[J]. *Syst Appl Acarol*, 2014, 19(4): S1-S2
- [23] 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  
Wei Dan-dan, Liu Yan, Du Yang, et al. Analysis of microsatellite loci from *Panonychus citri* based on enriched microsatellite library and transcriptome dataset [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, (2): 282-293
- [24] Maraun M, Heethoff M, Schneider K, et al. Molecular phylogeny of oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages[J]. *Exp Appl Acarol*, 2004, 33(3): 183-201
- [25] 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  
Li Guo-qing, Yu Ming-zhi, Hong Xiao-yue. Identification and phylo-

- genetic analysis of spider mites based on 28S rRNA sequences [J]. J Nanjing Agric Univ, 2010, 33(5): 49-54
- [26] 张素卿. 基于核糖体 18SrRNA 和 28SrRNA 基因的常见肉食螨系统关系分析[D]. 南昌大学, 2011: 18-26  
Zhang Su-qing. Systems analysis of Cheyletids (Acari: Cheyletidae) based on the ribosomal 18S rRNA gene and 28S rRNA gene [D]. Nanchang University, 2011: 18-26
- [27] Dabert M, Coulson SJ, Gwiazdowicz DJ, et al. Differences in speciation progress in feather mites (Analgoida) 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
- [28] 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
- [29] 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  
Gu Xiao-bin, Zhang Xiao-qian, Yang Guang-you, et al. Sequence analysis and phylogenetic relationships of 11 mite isolates based on ITS-2 gene [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2009, 40(2): 235-242
- [30] 邹志文, 陈芬, 夏斌, 等. 几种钝缘螨 ITS 基因片段的序列分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(23): 4945-4951  
Zou Zhi-wen, Chen Fen, Xia Bin, et al. Sequence Analysis of ITS Gene in Several Amblyseiinae (Acari: Phytoseiidae) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(23): 4945-4951
- [31] 罗其花. 中国小蜂螨自然种系构成、流行病学调查及寄生物学研究[D]. 中国农业科学院, 2011: 18-26  
Luo Qi-hua. Study on natural strains, epidemiology and parasitology of Tropilaelaps mites (Acari: Laelapidae) in China[D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2011
- [32] 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
- [33] 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
- [34] 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
- [35] Sastre N, Ravera I, Villanueva S, et al. Phylogenetic relationships in
- (上接第 6162 页)
- [25] 赵淑灿, 郑定容. PPTG、Survivin 和 bFGF mRNA 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(3): 542-545  
Zhao Shu-can, Zheng Ding-rong. Expression and significance of PPTG, Survivin and bFGF mRNA in non-small cell lung cancer[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2017, 22(3): 542-545
- [26] Zhang K, Li Y, Liu W, et al. Silencing survivin expression inhibits the tumor growth of non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 639-644
- [27] Li Z, Huang J, Yuan H, et al. SIRT2 inhibits non-small cell lung cancer cell growth through impairing Skp2-mediated p27 degradation[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 18927-18939
- [28] 仇铁峰, 丁明, 李献文, 等. Skp2 mRNA 在肺癌中的表达及意义[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(3): 327-330
- three species of canine Demodex mite based on partial sequences of mitochondrial 16S rDNA[J]. Vet Dermatol, 2012, 23(6): 509-e101
- [36] Ernsting BR, Edwards DD, Vidrine MF, et al. Phylogenetic relationships among species of the subgenus Parasitax (Acari: Unionicolidae: Unionicola) based on DNA sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase i gene[J]. Int J Acarol, 2006, 32(2): 195-202
- [37] 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集摘要汇编, 2008  
Cheng Jian, Hu Bao-qing, Wen Chun-gen. Phylogenetic analysis of mussel mites using mitochondrial COI gene sequences [C]. Proceedings of the fifth Zoological Symposium of the four provinces of Hubei, Guangdong, Hunan and Jiangxi, 2008
- [38] Yang B, Cai J, Cheng X. Identification of astigmatid mites using ITS2 and COI regions[J]. Parasitol Res, 2011, 108(2): 497-503
- [39] 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]. 中国畜牧兽医学家协会家畜寄生虫学分会第七次代表大会暨第十二学术研讨会论文集, 2013  
Gu Xiao-bin, Chen Zu-qin, Zhu Jun-yang, et al. Analysis of mitochondrial genome sequences of itch mite in rabbit[C]. Proceedings of the Seventh Congress and the twelfth Symposium of Animal Parasitology branch of Chinese Academy of animal husbandry and veterinary medicine, 2013
- [40] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414
- [41] Meudt HM, Clarke AC. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(3): 106-117
- [42] Weeks AR, Van OT, Breeuwer JA. AFLP fingerprinting for assessing intraspecific variation and genome mapping in mites [J]. Exp Appl Acarol, 2000, 24(10-11): 775-793
- [43] Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (6): 1458-1465
- [44] 李浩森. 基于形态和分子标记的瘰螨分类与系统进化研究 (瘰螨亚纲: 瘰螨总科)[D]. 南京农业大学, 2014: 28-30  
Li Hao-sen. The taxonomy, phylogenetics and evolution of Eriophyoidea mites based on morphology and molecular markers (Acari: Eriophyoidea)[D]. Nanjing Agricultural University, 2014: 28-30
- Qiu Tie-feng, Ding Ming, Li Xian-wen, et al. Expression and role of Skp2 mRNA in lung cancer[J]. Journal of Hainan Medical University, 2014, 20(3): 327-330
- [29] Zhang H, Li Z, Wang K, et al. Combined treatment of XIAP-targeting shRNA and celecoxib synergistically inhibits the tumor growth of non small cell lung cancer cells in vitro and in vivo [J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1079-1088
- [30] 叶闻远, 欧阳学农, 余宗阳, 等. 非小细胞肺癌 XIAP 和 Smac 的表达与临床病理特征及预后的关系 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(7): 444-448  
Ye Wen-yuan, Ou-Yang Xue-nong, Yu Zong-yang, et al. Expression of XIAP and Smac in human non-small-cell lung carcinoma(NSCLC) and the relationship with clinical significance and prognosis [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2014, 41(7): 444-448