

# 湖北钉螺分类和鉴定技术的研究进展

## PROGRESS IN THE RESEARCH ON TAXONOMY AND DISCRIMINATION TECHNIQUES OF *ONCOMELANIA HUPENSIS*

许静, 郑江, 周晓农

[中图分类号] R532.21 [文献标识码] B

钉螺属软体动物门(Phylum Mollusca)、腹足纲(Class Gastropoda)、前鳃亚纲(Subclass Prosobranchia)、鹿眼螺超科(Superfamily Rissocea)、圆口螺科(Family Pomatiopsidae)、圆口螺亚科(Subclass Pomatiopsinae)。根据形态学上的特征,钉螺属又分为两个种:湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)和微小钉螺(*Oncomelania minima*)<sup>[1]</sup>。分布于日本的微小钉螺不传播血吸虫病,在医学上没有研究意义。湖北钉螺(Gredler, 1881)<sup>[2]</sup>是日本血吸虫唯一的中间宿主,分布于缅甸、中国、日本、菲律宾、印度尼西亚等国家地区,我国 12 个省、市、自治区均有钉螺的分布<sup>[3]</sup>。几十年的研究证明:相同或不同地域株的日本血吸虫对不同地域钉螺感染率有着显著差异<sup>[4-8]</sup>。因此,对湖北钉螺种株差异及分类进行研究在流行病学、控制血吸虫病、疫苗和灭螺药物研制开发等方面具有重要的意义。国内外学者应用生物学新技术对钉螺进行了深入研究,在各个研究层次上都取得了进展。至今可用于鉴定钉螺种、亚种的方法很多,本文对这些研究方法及其进展加以阐述。

### 1 传统方法

1.1 形态学和解剖学 形态学和解剖学是物种鉴定和分类的基础,钉螺的外部形态和内部器官特征是其进行分类的依据,指标主要有:肋的有无、壳形、壳高、齿舌公式等等。

国内外研究人员在早期研究中根据壳形、齿舌公式等形态特点对我国的钉螺进行分类研究。而我国学者陈方之、李赋京、吴光(1938, 1941)、毛守白(1948, 1954)等分别对我国不同地区钉螺标本的螺纹、长宽度、最后 3 个螺旋的纵肋数及齿舌的齿数等进行了统计分析和比较,发现这些特征在相同和不同地区的钉螺个体间都存在差异,不足为分类的依据<sup>[9]</sup>。但以上这些特征可作为分类的参考。Davis(1968)发现邱氏亚种、台湾亚种、带病亚种及夸氏亚种的生殖系统结构相似,因而认为它们同属一种<sup>[9]</sup>。Davis(1950)<sup>[10]</sup>根据形态学和解剖学特征,提出的钉螺分类为:Subclass: Prosobranchia; Superfamily: Rissoacea; Family: Pomatiopsidae Stimpson 1865; Subfamily: Pomatiopsinae Stimpson 1865; Genus: *Oncomelania* Gredler 1881; *O. minima* (Bartsch 1936); *O. hupensis* Gredler 1881; *O. h. chiui* (Habe & Miyazaki 1962); *O. h. formosana* (Pilsbry & Hirase 1905); *O. h. hupensis* Gredler 1881; *O. h. lindoensis* Davis & Carney 1973; *O. h. nosophora* (Robson 1915); *O. h. quadrasi* (Mollendorff 1895)。其中 *Oncomelania minima* 不传播日本

血吸虫。

刘月英、楼子康等以生殖隔离为基础的生物学种概念,结合壳高、壳型指数、肋强度等形态学指数以及钉螺的地理分布、生态等,把我国的湖北钉螺划分为指名亚种、丘陵亚种、福建亚种、广西亚种、滇川亚种、台湾亚种、滨海亚种等 7 个亚种<sup>[11]</sup>,加上国外被确认的带病亚种、菲律宾亚种和印尼亚种,总计湖北钉螺有 10 个亚种。倪传华(1992)等用显微镜结合扫描电镜技术对中国 5 个省的光滑钉螺、6 个省的肋壳钉螺的齿舌进行了观察,发现光滑钉螺的齿舌带的长、宽度均略小于肋壳钉螺,而齿片的横列数却多于肋壳钉螺。各地的钉螺或同一地的钉螺的齿舌公式虽有差异,但有一定的规律性,中央齿公式肋壳钉螺的以(1-1-1)/(3-3)为主,占 66.7%,光滑钉螺中(1-1-1)/(3-3)和(2-1-2)/(3-3)分别占 40%。这些观察结果可作为钉螺分类的参考<sup>[12]</sup>。

以上研究着重于钉螺的形态学特征以及地理分布,忽视了环境因素对钉螺的影响,如钉螺的纵肋在后来的研究中证明是有复等位基因的单一基因控制的,并主要受环境的影响,如果将长江三峡以下流域的肋壳钉螺移至上游地区,将长成为光滑钉螺,因此纵肋的有无不能作为亚种分型的依据<sup>[13]</sup>。单一依靠表型分类,可靠性不强,容易产生同物异名,须结合其他生物技术弥补缺陷。

1.2 遗传学 小宫等(1958)以湖北钉螺和带病钉螺进行杂交,获得的 F1 代长成后近似于带病钉螺,其外壳没有纵肋,但外壳的颜色接近于湖北钉螺。Wager 等(1959)用湖北钉螺湖北亚种、菲律宾亚种、台湾亚种、带病亚种 4 种钉螺进行杂交实验,发现它们之间没有生殖隔离现象。Davis 等(1968)用采自台湾省的邱氏亚种、台湾亚种和夸氏亚种杂交,发现邱氏亚种和台湾亚种有密切的亲缘关系<sup>[9]</sup>。Davis 和 Ruff(1973)通过杂交实验比较后代和亲代形态学的特征,证明肋是有复等位基因的某单一基因控制的,而髻冠是有另一个基因控制的<sup>[13]</sup>。郭源华(1980)等对中国 6 省和自治区的钉螺进行交叉杂交并将四川和湖北的雌雄螺分别和菲律宾的钉螺进行杂交,结果各组均能产生后代,说明中国大陆内以及和菲律宾间的钉螺不存在生殖隔离,应为同一个种<sup>[9]</sup>。郭源华(1980)等以安徽贵池的血吸虫毛蚴感染中国江西、福建等地钉螺杂交的 F1 代,发现杂交后代与亲代相比改变了对血吸虫的易感性,如安徽贵池血吸虫对福建钉螺的感染率只有 8.1%,而对福建和江苏杂交的后代的感染率提高到 57.1%。说明大陆各地的钉螺存在一定的遗传差异,钉螺对血吸虫的易感性可能是受其遗传物质控制的<sup>[9]</sup>。

### 2 基于蛋白质检测的方法

2.1 蛋白质电泳 Davis(1967)用盘状电泳分离湖北钉螺湖北亚种、带病亚种、台湾亚种和邱氏亚种的足肌蛋白,结果

表明不同亚种间的蛋白质电泳图谱差异明显,同一亚种样本间的则基本一致,而且邱氏亚种与台湾亚种的光密度扫描图谱的相似性更大<sup>[41]</sup>。据此 Davis (1968) 指出邱氏亚种来源于台湾东北部的台湾亚种。许学积等 (1980) 用盘状电泳及等电聚焦法对我国 5 县 6 个地区的钉螺足肌水溶性蛋白进行了分离比较,发现各地钉螺的盘状电泳图谱区带数较接近,但也存在一些差异。表明我国钉螺可能存在亚种水平上的分化<sup>[45]</sup>。朱昌亮 (1989) 等用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对川(光壳)鄂(肋壳)两地钉螺的足肌蛋白进行了研究,发现虽然两地钉螺形态、生态上有所差异,但两地的多肽点图谱的基本图形相似,尤其是蛋白质量较大的多肽点为两者所共有,说明两地钉螺存在较密切的遗传关系。同时发现这两地的钉螺也存在多肽间质和量的差别,从而进一步印证了钉螺种内分化的可能性<sup>[46]</sup>。

2.2 血清学 Yuzuru Iwanaga (1997) 对湖北钉螺的湖北亚种、带病亚种、台湾亚种、邱氏亚种、夸氏亚种的抗原分别进行免疫电泳分析,发现一个亚种的抗原和其同源的抗血清间可产生较多数量的条带,大约为 23—24 条,而非同源性的抗原和抗体间产生的条带数则减少。经过吸附实验后电泳仍存在的一些带,被认为是各亚种独特的抗原。该研究还证明带病亚种和湖北亚种关系密切,而台湾亚种、邱氏亚种则组成另外一组关系密切的亚种群<sup>[47]</sup>。这与 Davis (1967) 的盘状电泳蛋白质实验结果一致<sup>[44]</sup>。

2.3 同工酶酶谱分析 Woodruff (1987, 1988) 以同工酶电泳为依据,发现菲律宾钉螺与中国安徽钉螺存在较大的差异,认为它们是截然不同的种<sup>[48-49]</sup>。郭源华等 (1980) 用等电聚焦法分离我国 5 省 8 个地区钉螺的同工酶时,发现各地钉螺的乳酸脱氢酶同工酶的图谱复变性较大(多型性的),可供钉螺分类时参考<sup>[20]</sup>。许学积 (1980) 对我国各地钉螺的  $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶和酯酶进行了等电聚焦电泳,发现不同地区的酯酶同工酶谱有着可以重复的差异,而同一地区的基本特点相同,说明酯酶对钉螺分类亦有参考意义<sup>[9]</sup>。

周晓农 (1992) 等用平面淀粉凝胶技术对湖北、江苏、四川的钉螺以及菲律宾夸氏钉螺进行同工酶的研究,发现 4 地钉螺间的关系为一种连续的梯度变异规律,湖北、江苏两地的钉螺最相近 ( $s=0.922\ 6$ ),四川与前两地钉螺有所差异 ( $s=0.862\ 8$ ),菲律宾钉螺与前三者差异更大 ( $s=0.777\ 2$ ),表明钉螺遗传基因的变异形式与其生态、地理环境的变异相一致<sup>[21]</sup>。何立 (1994) 等采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳对湖北省阳新、江陵两地的肋壳钉螺和云南省大理、楚雄、丽江三地的光壳钉螺进行了 EST (酯酶) 同工酶的比较研究,发现两省钉螺的酶谱间存在较大的差异,认为湖北的肋壳钉螺与云南的光壳钉螺在控制酯酶的基因或基因表达上已出现了一定的分化<sup>[22]</sup>,而同省钉螺的酶谱之间未出现明显的差异,这与王少海、钱宝珍等分别对云南、湖北省的钉螺的研究结果相一致<sup>[23-24]</sup>。张仪、冯婷 (1994) 等对我国 9 省(市)的 9 地代表性钉螺的 24 种酶进行了检测,发现多态位点酶有 14 个,占所测酶的 58.35%,表明中国大陆钉螺确实存在遗传多态现象,同时发现 PGM (葡萄糖磷酸变位酶), MDH (苹果酸脱氢酶) 是中国大陆钉螺及日本血吸虫共有的多态位点酶,为虫、螺两者相互关系的研究提供了新的线索<sup>[25]</sup>。周晓农 (1994, 1995) <sup>[26-27]</sup> 等对大陆钉螺进行了同工酶研究,提出相似的结论:中国大陆钉螺存在遗传多态现象。中国大陆钉螺统称为指名亚种不妥,至少有多亚种的分化。Davis 等 (1995) 用平

面淀粉凝胶电泳技术研究中国不同地区的 14 个螺群的同工酶,发现中国钉螺存在大量的遗传分化,结合螺壳特征、解剖学数据,把中国大陆的湖北钉螺分为湖北亚种、滇川亚种、福建亚种<sup>[28]</sup>。周晓农 (1995) 对采自 34 个现场的钉螺的水平淀粉凝胶电泳的研究表明钉螺种群内差异较小,种群间变异为中等程度,且光滑钉螺较肋壳钉螺的分布更散在,遗传变异和分化也远大于肋壳钉螺<sup>[27]</sup>。另外,王少海、何立 (1998) 等还对湖北 2 个地区的肋壳钉螺和 3 个地区的光滑钉螺的同工酶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,发现两地的光壳钉螺和肋壳钉螺的酶谱特征基本一致,提示湖北地区各地钉螺在种系进化上具有比较密切的亲缘关系<sup>[29]</sup>。

蛋白质电泳、血清学方法以及同工酶酶谱分析是从基因产物认识基因的存在或表达,有生化表现型反映基因型,它们的性质无疑的反映了物种间的基因分化程度。

### 3 基于 DNA 的方法

3.1 细胞遗传学 不同的物种,染色体的大小、数目会有所不同。着丝粒或动粒的位置决定了边臂的长度和染色体在细胞分裂后期的形状,生物学中常用染色体组型进行物种鉴别。

Burch (1960—1967) <sup>[30-32]</sup> 与郭源华、陈傅林 (1979) 等<sup>[9]</sup>曾报道过钉螺染色体数目为  $2n=34$ ,但缺乏统计资料分析。王国荣于 1989、1991 年分别对湖北、云南省几个地区的钉螺染色体核型进行了研究,观察到  $n=17$ ,即  $2n=34$ ,证实了以往的结果。在核型公式上,这 2 个省的钉螺存在差异,湖北省的为  $12\ m+6\ sm+12\ st+2\ t+$  性染色体,云南省的为  $18\ m+4\ sm+8\ s+2\ t+$  性染色体,这些差异可能是与其细胞遗传基础即核型的独特性有关<sup>[33-34]</sup>。

3.2 限制性酶切片段长度的多态性 (RFLP) 分析 该技术是通过细菌限制性内切酶识别并切断特定的 DNA 序列 (4—6 bp),经电泳形成限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 图谱。该图谱可反映酶切位点间 DNA 长度的较大突变,常用于测定种系发生关系。

周晓农等 (1994) 对安徽、四川、云南等 9 地隔离螺群的 DNA 基因组进行 RFLP 分析,发现各地钉螺的主带基本上一致,次带差异显著,湖北省各地的图谱则基本一致。提示不同隔离螺群存在一定的同源和亲源关系,基因水平上的差异程度与隔离群之间距离和自然环境关系密切,在一定区域的钉螺相对稳定<sup>[35]</sup>。

### 3.3 基于 PCR 的方法

3.3.1 核甘酸序列测定 测定核酸 DNA 序列是种株基因分析的重要技术。测定基因组中某一区域的 DNA 序列,可以直接获得特性方面的参数并计算出遗传距离,从而作出系统发育分析图谱,适于种系发生的研究。目前钉螺 DNA 测序主要集中在核糖体和线粒体基因序列的研究。rRNA 编码基因包括高度保守和高度可变的不同进化速率的区域,利于分析比较。线粒体 DNA (mtDNA) 是高度遗传、快速演化的,适于遗传变异的研究。

Emberton 等 (1990)、Rosener 等 (1994) 等对螺类 rRNA 序列分析的研究表明:D6 区、类 23 s 的 rRNA 序列对于贝类分类群的属确实是有用的,但不能更好的解决其在种水平上的系统发育分析<sup>[36-37]</sup>。Davis (1998) 等对鹿眼螺超科的两个科 Hydrobiidae 和 Planorbisidae 以及圆田螺亚科、拟钉螺亚科,拟钉螺亚科的两个属以及钉螺属的两个亚种分别进行 COI 基因扩增并测序,发现 COI 基因可以在从科到亚

种水平上进行物种发育的鉴定<sup>[38]</sup>。Christina M· Spolsky 等对四川、云南、江西省 3 地螺群的线粒体细胞色素 b 基因扩增后克隆、测序,结果表明四川和云南的螺群的基因差异是 3.8%,而与江西省的序列有较大的差异为 10.2%,云南和四川的差异为 11.9%<sup>[39]</sup>,这与 Davis(1995) 根据同工酶数据和形态学将湖北钉螺分为 3 个亚种的观点相一致<sup>[28]</sup>。Thomas Wike(2000) 等通过对中国江苏、湖北、湖南、安徽和浙江 5 省 10 地的光壳钉螺和肋壳钉螺进行 COI 基因测序并进行分析,发现各螺群内的遗传差异很小,光壳钉螺螺群与肋壳钉螺螺群间无明显的界限,如浙江长兴、安徽广德的光壳钉螺与安徽宣州的肋壳钉螺的遗传差异很小,核苷酸差异分别为 0.011 3, 0.010 6。利用 COI 基因测序结果所建的遗传树状图、生态学和壳形数据,认为长江三峡以下的长江中下游的肋壳和光壳钉螺均属于湖北钉螺湖北亚种<sup>[40]</sup>。

3.3.2 PCR-RFLP Michelle Hope 等(1994) 对湖北钉螺湖北亚种、夸氏亚种、带病亚种等 3 个亚种的螺群进行了 PCR-RFLP 分析,发现菲律宾不同岛上的菲律宾亚种螺群的 RFLP 图谱有较大的差异,可能是由于地理隔离和基因飘移而形成的,同时发现湖北亚种和菲律宾亚种亦有明显的差异<sup>[41]</sup>。

上述两种方法中的引物设计需在已知基因序列信息的基础上进行的,给特定引物的设计增加了难度,而且还要避免 DNA 污染,有其局限性。

湖北钉螺的分类传统上以形态学和解剖学为基础。蛋白质电泳和同工酶技术从生物化学的角度为钉螺分类提供了间接依据,可以检测结构基因的变异,但对于调节因子变异所引起的形状、生理和行为的进化则不能检测,且易受到环境等外部因素影响。钉螺的分类研究还涉及到数据统计学方法的应用,相同的数据运用不同的分析软件和统计方法得出的结果存在一定的差异。因此应统一遗传分析方法,以便比较。

基于 DNA 的检测方法相对较少受到表型变化的影响,从而更直接有效的反映了湖北钉螺的遗传变异,可用作比较性研究。以 PCR 为基础的分子生物学技术仅需极少量的材料即可进行研究,对未来钉螺的研究具有重要价值,但这些分子生物学技术在钉螺分类学中应用较少,特别是近年来发展较快的 RAPD 和微卫星技术尚未用于钉螺分类学研究。

RAPD(随机扩增多态性 DNA) 技术是 William<sup>[42]</sup>、Welsh<sup>[43]</sup> 等在 PCR 的基础上发展起来的另一种基因分析方法,已较多的用于蝗虫、伊蚊、血吸虫、蝙蝠、亚洲玉米螟等动物的分类研究<sup>[44-48]</sup>。Juliette langand(1993) 运用 RAPD 技术对小泡螺属的 3 个种进行分析<sup>[49]</sup>, Abdel-hamid(1999) 用该技术对浅栖双脐螺进行研究<sup>[50]</sup>,发现该技术不仅可以进行种间鉴定,而且可以区分同种不同的地理株,作为鉴定指标的 RAPD 标记可以遗传。这些研究证明 RAPD 对于物种分类及性别研究是十分有用的。但目前还没有钉螺这方面的研究报道。其原理是用一段非特异性的随机寡聚核苷酸序列作为引物,与模板 DNA 进行反应。扩增出的长度不一的 DNA 片段电泳后的指纹图谱中具有不同种、株特异性的条带,有助于鉴定并可用于作探针。但为明确种间亲源关系需使用大量引物<sup>[51]</sup>,实验室的细微差异造成指纹图谱恢复<sup>[52]</sup>,这是其局限性。随着标准化引物使用及标准化操作,希望克服这些困难<sup>[53]</sup>。

微卫星是分布于真核生物的 1-6 bp 的高度重复的短

串联核苷酸序列,可以 2 bp、3 bp、4 bp、5-6 bp 等重复碱基存在,其中以 2 bp 最常见,重复形式为(AC)<sub>n</sub> 或(TG)<sub>n</sub>。微卫星片段又称简单高度重复序列 SSR,可参与编码基因、调控子等的功能调节。许多学者认为微卫星是比卫星片段更好的遗传多样性标记。Jones(1999)、Theron(2000) 等应用此技术对双脐螺进行了分析<sup>[54,55]</sup>,但有关钉螺的报道还没有。

RAPD 和微卫星 DNA 分析技术均可在 DNA 样本量较少、缺少基因组核苷酸信息的情况下,对未知各区域扩增形成多态性图谱。方法快速简便,结果稳定,更重要的是能从基因组 DNA 结构和组成水平上反应生物的真实差异,从而可以快速有效的进行种、不同地理株乃至性别的鉴定,在钉螺对血吸虫的易感基因和抗性基因的研究方面也有一定的价值。可见这些技术在钉螺研究方面具有广阔的应用前景,应给予充分的重视加以利用。

## 参考文献

- [1] Davis G M· Molecular genetics and taxonomic discrimination. // Harasewych M G & Tiller S, eds. Molecular techniques and molluscan phylogeny. Proceedings of a Symposium, 11th International Malacological Congress, Siena, Italy[J]. The Nautilus. 1994, 8, (Supplement 2): 3-23.
- [2] Gredler V· Zur conchilen-fauna von China [J]. Malakoz. Ges, 1881, 18: 110-132.
- [3] Davis G M· The origin and evolution of the gastropod family Pomatiopsidae, with emphasis on the Mekong River Triculinae [J]. Monograf of The Academy of Natural Science of Philadelphia, 1979; 20: 1-120.
- [4] Chi W L, Wagner E D, Wold N, et al. Susceptibility of Oncomelania hybrid snails to various geographic strains of Schistosoma japonicum [J]. Am J Trop Med Hyg 1971; 20: 89-94.
- [5] Yuan H C, Upatham ES, Kruatrachue M· et al. Susceptibility of snail vectors to oriental anthropophilic Schistosoma [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1984, 15(1): 86-94.
- [6] John H· Cross G Z, Lu S K· et al. Susceptibility of Oncomelania hupensis subspecies to infection with geographic strains of Schistosoma japonicum [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1984, 15(2): 155-160.
- [7] 何毅勋, 郭源华, 倪传华, 等. 中国大陆日本血吸虫品系的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8(2): 92-95.
- [8] He Y, Guo Y, Ni C, et al. Compatibility between Oncomelania hupensis and different isolates of Schistosoma japonicum in China [J]. Southeast Asian J, Trop, Med, Pub, Hlth, 1991, 22(2): 245-248.
- [9] 毛守白主编, 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 273-283.
- [10] Davis G M· Snail hosts of Asian Schistosoma infecting man, Evolution and coevolution [J]. Malac Rev, 1980, Suppl2, 195-238.
- [11] 刘月英, 楼子康, 王耀先, 等. 钉螺的亚种分化 [J]. 动物分类学报, 1981, 6(3): 253-266.
- [12] 倪传华, 夏丰, 刘和香. 钉螺舌齿的光学显微镜与扫描电镜的观察 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1992, 4(6): 338-340.
- [13] Davis G M, Ruff M D· Oncomelania hupensis (Gastropoda: Hydrobiidae) hybridization genetics and transmission of Schistosoma japonicum [J]. Malacologia Review, 1973, 6: 181-197.
- [14] Davis G M, Lindsay GK· Disc electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations [J]. Malacologia, 1967, 5: 88-111.
- [15] 许学积, 郭源华. 用盘状电泳和等电聚焦电泳分离钉螺足肌蛋白质的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1980, 2(2): 209-212.
- [16] 朱昌亮, 叶炳辉, 赵慰先, 等. 川、鄂两地钉螺足肌蛋白二维电泳图谱的比较研究 [J]. 动物学杂志, 1983, 24(1): 7-9.
- [17] Yuzuyu I· Comparative studies on the antigenic structure of five subspecies of Oncomelania snails by immunoelectrophoresis [J].

- South East Asian J Trop Med Pub Hlth 1997, 28( 1) : 223—229.
- [18] Woodruff D S, Merenlender A M, Upatham E S, et al. Genetic variation and differentiation of three *Schistosoma* species from the Philippines, Laos and Peninsular Malaysia [J]. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36( 2) : 345—354.
- [19] Woodruff D S, Staub K C, Upatham E S, et al. Genetic variation in *Oncomelania hupensis*: *Schistosoma japonicum* transmitting snails in China and the Philippines are distinct species [J]. Malacologia, 1988, 29: 347—361.
- [20] 郭源华, 许学积, 陈国忠. 钉螺的同工酶和核糖核酸的研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1980, 2( 3) : 206—208.
- [21] 周晓农. 日本血吸虫中间宿主钉螺的种群遗传基因变异研究 [A]. 国际血吸虫病学术讨论会论文及摘要汇编. 1992, 126.
- [22] 何立, 王少海, 康在彬, 等. 湖北与云南两省钉螺酯酶同工酶的比较研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10( 5) : 28—30.
- [23] 王少海, 何立, 康在彬, 等. 云南 6 县钉螺酯酶同工酶的比较研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1994, 6( 5) : 274—275.
- [24] 钱宝珍, 宋昌存, Thomas K K, 等. 湖北钉螺指名亚种三种群等位基因酶变异的研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7( 1) : 32—33.
- [25] 张仪, 冯婷, Davis G M, 等. 中国大陆钉螺等位基因位点研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12( 3) : 172—177.
- [26] 周晓农, Upatham E S, Kaewjam R. 日本血吸虫中间宿主钉螺的遗传变异研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1994, 6( 5) : 262—264.
- [27] 周晓农, 孙乐平, 洪青标, 等. 中国大陆钉螺种群遗传学研究 1 种群遗传差异 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1995, 7( 2) : 67—71.
- [28] Davis G M, Zhang Y, Guo Y H, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China [J]. Malacologia, 1995, 37( 1) : 133—156.
- [29] 王少海, 何立, 康在彬. 湖北地区肋壳钉螺与光壳钉螺种群间亲缘关系的探讨 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1998, 10( 5) : 267—269.
- [30] Burch J B. Chromosomes of *Pomatiopsis* and *Oncomelania* [J]. Amer Malacol Union Ann Rept, 1960, 26: 15—16.
- [31] Burch J B. Cytotaxonomy of the genus *Oncomelania*, intermediate hosts of schistosomiasis japonica [J]. Amer Malacol Union Ann Repts, 1964, 31: 28—29.
- [32] Burch J B. Chromosomes of intermediate hosts of human Bilharziasis [J]. Malacologia, 1967, 5( 2) : 127—135.
- [33] 王国棠. 湖北钉螺两种亚种核型的初步研究 [J]. 遗传, 1989, 11( 5) : 21—24.
- [34] 王国棠. 云南省钉螺染色体核型的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7( 3) : 29—30.
- [35] 周晓农, 孙乐平, 徐秋, 等. 中国大陆不同地域隔离群湖北钉螺基因组 DNA 的限制性长度差异 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1994, 6( 4) : 196—198.
- [36] Emberton K N, Kuncio G S, Davis G M, et al. Comparison of recent classifications of stylommatophoran land-snail families, and evaluation of large-ribosomal RNA sequencing for their phylogenetics [J]. Malacologia, 1990, 31: 327—352.
- [37] Rosenberg G, Davis G M, Kuncio G S, et al. Preliminary ribosomal RNA phylogeny of gastropod and unionoidan bivalve mollusks [J]. The Nautilus, 1994, 2( Supplement) : 111—121.
- [38] Davis G M, Wilke T, Spolsky C, et al. Cytochrome oxidase 1-based phylogenetic relationships among the Pomatiopsidae, Hydrobiidae, Rissoidae and Truncatellidae (Gastropoda: Canogastropoda: Rissoacea) [J]. Malacologia, 1998, 40( 1—2) : 251—266.
- [39] Chistina M S, Davis G M, Zhang Y. Sequencing methodology and phylogenetic analysis: cytochrome b gene sequence reveals significant diversity in Chinese populations of *Oncomelania* (Gastropoda: Pomatiopsidae) [J]. Malacologia, 1996, 38( 1—2) : 213—221.
- [40] Thomas W, Davis G M, Chen C E, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Rissoidae) in eastern China: molecular phylogeny, population structure, and ecology [J]. Acta Tropica, 2000, 77: 215—227.
- [41] Hope M, McManus D P, et al. Genetic variation in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RELP method [J]. Acta Tropica, 1994, 57: 75—82.
- [42] John G K, Williams Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18( 2) : 6531—6535.
- [43] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Mol Ecol, 1990, 18( 24) : 7213—7218.
- [44] Chapco W, Ashton N W, Martel R K, et al. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of Grasshoppers [J]. Genome, 1992, 35( 4) : 569—574.
- [45] Ballinger-Crabtree M E, Black IV W C, Miller B R, et al. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification for *Aedes aegypti* subspecies and populations [J]. Am J Trop Med Hyg, 1992, 47( 6) : 893—901.
- [46] Kaukas A, Dias N E, Simpson A J, et al. A phylogenetic analysis of *Schistosomiasis haematobium* group species based on random amplified polymorphic DNA [J]. Int J parasitol, 1994, 24( 2) : 285—290.
- [47] 李明, 张树义. 小腹管鼻蝓两个冬眠群不同个体的随机扩增多态性 DNA 分析 [J]. 动物学报, 1999, 45( 2) : 232—237.
- [48] 孙珊, 徐茂磊, 王戎疆, 等. RAPD 方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究 [J]. 昆虫学报, 2000, 43( 1) : 103—106.
- [49] Langand J, Barral V, Delay B, et al. Detection of genetic diversity within snail intermediated hosts of the genus *Bulinus* by using random amplified polymorphic DNA marker (RAPDs) [J]. Acta Trop, 1993, 55( 4) : 205—215.
- [50] Abdel-Hamid Z, Molretta J B de, Fernandez V, et al. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to schistosome infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs) [J]. Rev Inst Med Trio Sao Paulo, 1999, 41( 5) : 291—295.
- [51] Hadry H, Balick M, Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology [J]. Mol Ecol, 1992, 1( 3) : 388—390.
- [52] Penner G, Bush A, Wise R, et al. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratory [M]. PCR Methods Appl, 1993, 2( 4) : 341—345.
- [53] Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, et al. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89( 21) : 10065—10068.
- [54] Jones C S, Lockyer A E, Rollinson D, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gasteropode *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* [J]. Molecular ecology, 1999, 8( 12) : 2141—2152.
- [55] Charbonnel N, Angers B, Razata von J et al. Microsatellite variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* [J]. Molecular Ecology, 2000, 9( 7) : 1006—1007.

[收稿日期] 2002-01-16 [编辑] 秦时君