

中国大陆钉螺种群遗传学研究*

I. 种群遗传变异

周晓农¹ 孙乐平¹ 洪青标¹ 徐 秋¹ 陆安生² 吴中兴¹ Thomas K. Kristensen³

1 江苏省寄生虫病防治研究所(无锡 214064)

2 无锡市血吸虫病防治站

3 Danish Bilharziasis Laboratory

提要 用采自 34 个现场螺点的钉螺进行水平淀粉凝胶电泳,并进行 13 种酶系统染色。结果 17 个等位基因中,7 个为多态基因位点。种群间遗传距离的变化范围 0.03—0.27。UPGMA、Fitch-Margolish 最小方差法、最大相似性聚类分析图显示,聚类的组别与形态学或/和地理分布相一致。各分析指标提示,肋壳钉螺种群显著地不同于光滑钉螺种群,两组间的遗传距离为 0.15。

关键词 钉螺 种群遗传学 遗传变异 多态基因位点

等位基因酶电泳技术较早应用于种群内/间变异类型的研究^[1]。Woodruff 等和 Viyanant 等报道了菲律宾 4 个岛的钉螺种群间差异较小,但与中国贵池钉螺的差异很大^[2,3]。在中国大陆,以前认为钉螺有 5 个亚种,我们的初步实验则发现四川钉螺与湖北、江苏钉螺的遗传变异较大^[4],有待深入研究。

Davis 对圆口螺的解剖学、形态学和生物地理学研究后提出了钉螺起源假设^[5]。但该假设缺少中国大陆长江流域钉螺遗传学证据。近代钉螺两性繁殖模型提示,等位基因酶技术可用于检验上述假设。因此,本研究对中国大陆长江地区钉螺种群进行了遗传变异研究,以验证钉螺起源假设。

方 法

钉螺采自沿长江的 9 省 34 个有螺现场(表 1)。水平淀粉凝胶电泳按本实验室方法^[4]进行。共测定 13 种酶系统^[6],它们为:醛脱氢酶(ALDH)、醛氧化酶(AO)、酯酶(EST)、磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)、谷氨酸脱氢酶(GPDH)、羟丁酸脱氢酶(HBDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、山梨醇脱氢酶(SDH)、碱性磷酸酶

(AP),谷草转氨酶(GOT)、苹果酸脱氢酶(MDH)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、黄嘌呤脱氢酶(XDH)。根据各个螺体的酶谱资料,计算各个体平均杂合性(H)、各群体的等位基因频率、遗传相似性(I, Nei's 1978)和遗传距离(D, Nei's 1978)^[7]。比较各值杂合子实际频率和预测值,以确定符合 Hardy-Weinberg 方程的随机交配群体^[7],并进行 F 检验^[8],绘制聚类图谱^[7]。并对多态基因位点的资料作主成份分析^[9]。计算机软件采用 G-test, Philip(V. 3)和 SPSS/PC+(V. 2)。

结 果

1 等位基因酶谱 测定的 13 个酶系中,共获能进行遗传学判读的 17 个等位基因位点,其中 10 个为单态等位点,7 个为多态位点,它们为 Ap, Got, Mdh-2, Idh-2, Est-4, Est-5 和 Xdh。各酶系的酶谱将另文报道。

2 种群内的遗传变异 各种群的多态位点百分比(p)为 5.9%—29.4%,其中以四川省大邑钉螺的 p 值最高,依次为丹棱、彭

* 本课题得到联合国开发署/世界银行/世界卫生组织热带病研究和培训特别规划署的资助

山、福清、广德和青阳山区,有 4—5 个变异等位点(表 1)。各种群平均杂合度(H)为 0.021—0.121。每等位点的等位基因数为 1.059—

1.294(±0.243—0.470 SE)。表明中国大陆钉螺的遗传变异水平为中等程度。

表 1 34 个钉螺种群 17 个等位基因的遗传变异(括号内为标准误)

Table 1 Genetic variability of 17 loci in 34 populations (standard error in parentheses)

地 名 Population	各等位点 平均样本数 Mean sample size per locus	各等位点的平 均等位基因数 Mean No. of alleles per locus	多态等位 点的百分率 Percentage of loci polymorphic	平均杂合性 Mean hetero zygosity		P	环境 类型 Envir- onment*
				实际计数 Direct count	预测值 Hdy-wbg expected		
安徽铜陵(山区)AHD LH	16.8(3.509)	1.176(0.393)	17.6	0.052(0.133)	0.043(0.106)	>0.5	M
安徽老洲 AHD LL	16.7(3.549)	1.118(0.332)	11.8	0.032(0.089)	0.042(0.126)	>0.5	L
安徽铜陵(湖区)AHD LM	18.5(7.859)	1.118(0.332)	11.8	0.040(0.130)	0.037(0.120)	>0.5	L
安徽广德 AHGD	17.4(8.124)	1.235(0.437)	23.5	0.093(0.193)	0.097(0.192)	>0.5	M
安徽贵池 AHGZ	18.5(7.859)	1.176(0.393)	17.6	0.047(0.123)	0.046(0.124)	>0.5	L
安徽青阳(山区)AHJYH	17.2(9.223)	1.235(0.437)	23.5	0.121(0.232)	0.101(0.195)	>0.5	M
安徽青阳(湖区)AHJYM	12.6(5.849)	1.059(0.243)	5.9	0.024(0.097)	0.019(0.079)	>0.5	L
福建福清 FJFQ	8.5(2.939)	1.235(0.437)	23.5	0.082(0.170)	0.068(0.138)	>0.5	M
湖北洪湖 HBHW	12.6(5.894)	1.059(0.243)	5.9	0.026(0.109)	0.021(0.086)	>0.5	L
湖北汉川 HBHZ	12.6(5.849)	1.059(0.243)	5.9	0.024(0.097)	0.030(0.124)	>0.5	L
湖北潜江 HBJJ	8.4(2.917)	1.235(0.437)	17.6	0.051(0.128)	0.071(0.172)	>0.5	P
湖北荆州 HBJZ	18.5(7.859)	1.118(0.332)	11.8	0.040(0.130)	0.039(0.126)	>0.5	P
湖北石首 HBSS	15.4(4.061)	1.059(0.243)	5.9	0.021(0.088)	0.018(0.075)	>0.5	P
湖北武昌 HBWZ	15.7(4.150)	1.118(0.332)	11.8	0.029(0.083)	0.039(0.116)	>0.5	L
湖北咸宁 HBXN	15.8(4.101)	1.118(0.332)	11.8	0.046(0.141)	0.037(0.109)	>0.5	P
湖南华容 HNHR	17.0(7.898)	1.176(0.393)	17.6	0.058(0.146)	0.056(0.140)	>0.5	L
湖南西湖 HNXH	18.5(7.859)	1.176(0.393)	11.8	0.032(0.085)	0.042(0.127)	>0.5	L
江苏栖霞八卦洲 JSBGZ	12.6(5.894)	1.059(0.243)	5.9	0.029(0.121)	0.030(0.124)	>0.5	L
江苏高邮 JZGY	12.6(5.894)	1.059(0.243)	5.9	0.026(0.109)	0.024(0.099)	>0.5	L
江苏吴县 JSHX	17.1(7.917)	1.176(0.393)	17.6	0.077(0.176)	0.086(0.192)	>0.5	P
江苏栖霞花园 JSHY	20.2(10.578)	1.118(0.332)	11.8	0.069(0.200)	0.057(0.162)	>0.5	P
江苏金坛 JSJD	17.3(8.068)	1.118(0.332)	11.8	0.036(0.107)	0.030(0.089)	>0.5	P
江苏江浦 JSLH	15.4(4.583)	1.059(0.243)	5.9	0.025(0.104)	0.029(0.121)	>0.5	L
江苏六合 JSLHX	18.5(7.859)	1.118(0.332)	11.8	0.038(0.121)	0.038(0.122)	>0.5	L
江苏盐城 JSYZ	8.5(2.939)	1.176(0.393)	17.6	0.082(0.198)	0.076(0.171)	>0.5	P
江苏东台 JSYZXH	18.1(9.807)	1.118(0.332)	11.8	0.036(0.126)	0.055(0.157)	>0.5	P
江西彭泽 JXBZ	17.0(7.898)	1.118(0.332)	11.8	0.062(0.174)	0.057(0.161)	>0.5	L
上海金山 SHSM	8.5(2.939)	1.176(0.393)	11.8	0.063(0.165)	0.055(0.144)	>0.5	P
四川丹棱 SZDL	19.3(10.135)	1.235(0.437)	23.5	0.101(0.218)	0.096(0.189)	>0.5	M
四川大邑 SZDY	17.8(7.418)	1.294(0.470)	29.4	0.082(0.149)	0.090(0.161)	>0.5	M
四川普格 SZPG	12.6(5.894)	1.176(0.393)	17.6	0.097(0.258)	0.076(0.174)	>0.5	M
四川彭山 SZPS	8.5(2.939)	1.235(0.437)	23.5	0.098(0.251)	0.084(0.175)	>0.5	M
云南大理 YNDL	18.0(10.488)	1.125(0.342)	12.5	0.064(0.184)	0.047(0.131)	>0.5	M
云南巍山 YNWS	8.5(2.939)	1.118(0.332)	11.8	0.071(0.211)	0.055(0.156)	>0.5	M

注: L 为江湖洲滩地区, P 为水网地区, M 为山区

Note: L: Lake region, P: Plain region, M: Mountainous region

卡方检验和 G 检验用于显著性随机交配 > 0.05)。F 检验得出, $F_{15} = -0.03$ (SD = 0.29), 表明所研究的样本钉螺在现场为随机

交配繁殖。 $F_{IT}=0.467$, $F_{ST}=0.483$, 均显著性地大于 0, 表明等位基因频率存在着较大的地理变异。

3 种群间的遗传分化 各样本种群间的非偏差遗传相似(I)为 0.77—0.97, 遗传距离(D)为 0.03—0.27, 表明各种群存在的差异显著。为了清楚地表明这些差异的关系, 分别以 4 种方法进行分析。

3.1 非加权平均配组(UPGMA)聚类分析 结果如图 1, 该聚类图将 34 个样本种群划分为 3 大组别, 3 组别间的遗传距离(D)为 0.152—0.158, 组别 I 更接近于组别 III。这些组别的分组与钉螺样本沿长江的分布情况相一致。



NEI'S GENETIC DISTANCE (1978) 遗传距离

图 1 UPGMA 聚类图

Fig. 1 Dendrogram based on UPGMA cluster analysis

3.2 Fitch-Margoliash 最小方差聚类分析 结果将 34 个样本种群划分为 3 大组别(图 2), 与 UPGMA 法比较, 组别 I 相当于 UPGMA 法的组别 I 和 II, 该组均为光壳钉螺, 表明钉螺基因型与表现型的一致关系。

3.3 最大似然聚类分析 将 34 个样本种群划分为 2 大组别(图 3), 组别 I 相当于整个光壳钉螺, 组别 II 为分布于长江中下游的肋壳钉螺, 与钉螺的地理分布和螺壳形态表现型基本一致。

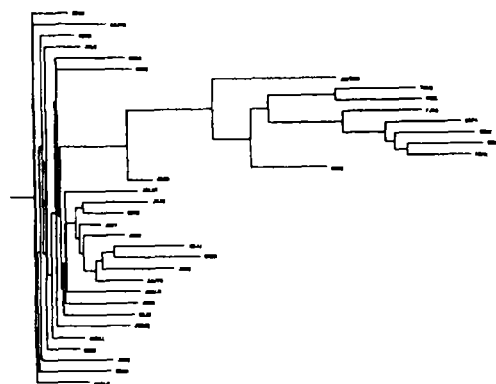


图 2 Fitch-Margoliash 最小方差聚类图

Fig. 2 Dendrogram based on Fitch-Margoliash and least-squares cluster analysis

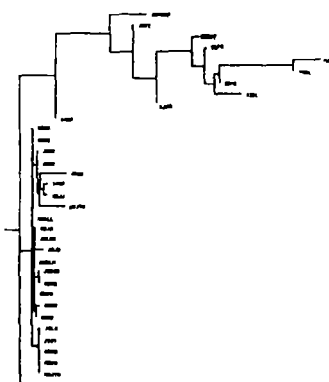
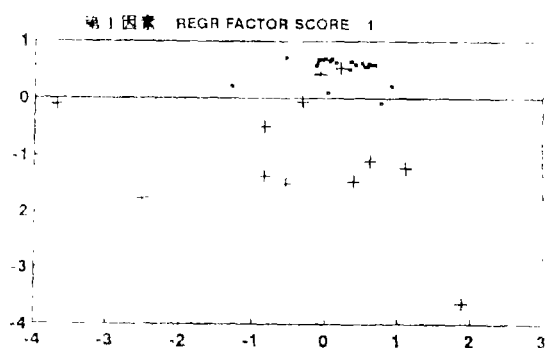


图 3 最大似然法聚类图

Fig. 3 Dendrogram based on maximum likelihood cluster analysis

3.4 多态位点等位基因频率的主成份分析 对 7 个多态基因位点的等位基因频率进行主成份分析(PCA), 结果显示 3 个最重要因素, 第 1 因素由 Est-4、Got 和 Mdh-2 组成, 第 2、3 因素分别为 Idh-2 和 Ap, 各占总变异的 38.3%、19.6%和 14.6%。第 1 与第 2 因素构成的关系图(图 4)显示了两大组别, 即光壳螺组和肋壳螺组。肋壳螺组分布集中, 光壳螺组分布分散。



第 2 因素 REGR FACTOR SCORE 2

图 4 主成份分析因素 1 和因素 2 构成图 (· 为肋壳螺, + 为光壳螺)

Fig. 4 Plot of Factor 1 by Factor 2 of PCA based on allele frequencies of seven variable loci. Shaded squares = ribbed shells; crosses = smooth shells

讨 论

研究结果表明,来自 9 省 34 地区的中国钉螺的遗传变异在种群内变异较小,种群间变异为中等程度,17 个观察的等位基因中,7 个为多态基因位点,与 Tsukamoto 等^[10]对日本、台湾、菲律宾钉螺的观察结果基本一致。样本大小、研究的等位点多少、酶测定的种类是研究基因变异、分化的关键指标^[11]。大于 8 个等位点的样本资料一般对遗传距离(D)的估计差异小于 10%。本研究检测了 17 个等位点,(其中 7 个为多态基因位点),各种群的钉螺样本数为 5—25 个,所以在计算遗传距离时采用了 Nei's (1978) 的小样本计算公式,因此所有的资料及统计结果较为可靠。由于 94% 例与 Hardy-Weinberg 方程相拟合, F_{IS} 又无显著性地大于 0,表明样本钉螺为随机交配种群。

遗传进化研究中采用何种聚类图分析方法尚无统一^[12]。我们共采用 3 种方法尝试。最常用的为 UPGMA 聚类分析法,所构成的聚类图与钉螺地理分布基本一致。Fitch-Margoliash 最小方差法所构成的聚类图与钉螺形

态相吻合。而最大似然聚类分析法基于原始等位基因频率,所构成的聚类图显示,既与钉螺的地理分布吻合,又与钉螺形态变异一致。提示 UPGMA 和 Fitch-Margoliash 最小方差法各有所长,结论可能应同时考虑该两种方法的分析结果。

Wright 氏 F 检验^[8]可直接检验遗传杂合度,并解释各组内/间的遗传变异,而成为估计种群基因流的常用方法。本研究的 3 项指标(F_{IS} 、 F_{IT} 、 F_{ST})测定结果提示,各现场钉螺种群的交配为随机交配,整个大陆钉螺种群间的遗传变异较高,而基因流较小。

主成份分析已应用于遗传变异研究^[13]。本结果提示 Est-4、Got、Mdh-2、Idh-2 和 Ap 为影响遗传变异较重要的等位基因。第 1、2 因素构成图提示两组钉螺不但在形态上不同,在遗传学上亦有差别,且光壳钉螺较肋壳钉螺分布更散在,光壳钉螺的遗传变异和分化远大于肋壳钉螺。UPGMA 聚类图显示,两组的遗传距离(D)为 0.15。因此在研究钉螺起源时,拟应用可能多的遗传变异较大的光壳钉螺种群作研究样本。根据最大似然法聚类图谱,我们认为钉螺较早地从喜马拉雅山脉进入云南省后,迁入与长江相通的四川平原,尔后扩散迁移至中国大陆的东海岸;而处于长江中下游的光壳钉螺(如广德)为相间种群;由此扩散至长江湖区的钉螺,因环境明显不同,发生了剧烈的基因漂流,控制纵肋发生的新突变基因,在自然选择作用下保留下来,而形成肋壳钉螺种群。根据光壳与肋壳间的 D 值 0.15 估算^[8],肋壳钉螺从光壳钉螺分化出来的时间约在 75 万年前。

本研究得到湖北、湖南、江西、四川、云南、上海、福建、江苏等省(市)有关单位和同志的支持、帮助,特此致谢!

参 考 文 献

- Gould, SJ & Woodruff DS. Bulletin of the American Museum of Natural History 1979, 182: 389

- 2 Woodruff DS, Carpenter MP, Upatham ES, Viyanant V. Isoenzyme Bulletin 1986, 19 : 32
 - 3 Viyanant V, Upatham ES, Blas BL & Yuan HC. Malacological Review 1987, 20 : 91
 - 4 周晓农, 等. 中国血吸虫病防治杂志 1994, 6 (5) : 262
 - 5 Davis GM. Malacological Review 1980, Supplement 1 : 195
 - 6 Harris H & Hopkinson DA. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland. Amsterdam, 1978
 - 7 Ferguson A. Biochemical Systematics and Evolution. 1st ed. John Wiley and Sons, New York, 1980
 - 8 Wright S. Annals Eugen 1951, 15 : 323
 - 9 Norusis MJ. SPSS/PC + advanced statistics TM V 2.0 SPSS Inc. Chicago, 1988
 - 10 Tsukamoto M, Nalajima. Y & Chuang CK. Journal University of Occupational and Environmental Health 1988, 10 : 381
 - 11 Gorman GC & Renzi J. Copeia, 1979, 242
 - 12 Richardson RJ, Baverstock PR & Adams M. Allozyme Electrophoresis. Academic Press, Inc. San Diego, California 1986
 - 13 Gasnier N, Cabaret J & Moulia C. International Journal for Parasitology 1992, 22 : 581
- 1994 年 9 月 28 日收稿 1995 年 6 月 15 日修回
(编辑: 秦时君)

POPULATION GENETICS OF *ONCOMELANIA SPP.* IN MAINLAND CHINA

1. GENETIC VARIATIONS AMONG POPULATIONS OF *ONCOMELANIA SPP.*

Zhon Xiaonong¹, Sun Leping¹, Hong Qingbiao¹, Xu Qiu¹,

Lu Ansheng², Wu Zhongxing¹, Thomas K. Kristensen³

1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases (Wuxi 214064)

2 Station of Schistosomiasis Control, Wuxi city

3 Danish Bilharziasis Laboratory

ABSTRACTS

In order to understand the genetic variation of *Oncomelania snails* in the mainland of China, the field snails from 34 localities were collected and were investigated by the way of allele enzyme electrophoresis. Results demonstrated that out of 17 loci examined, 7 polymorphic loci were presented, among which, the major loci of Est-4, Got, Mdh-2, Idh-2 and Ap accounted for the main variations within and among 34 populations. Genetic distance (Nei's 1978) among the populations varied from 0.03 to 0.27. The dendrogram based on UPGMA, Fitch-Margoliash and least-squares, and maximum likelihood cluster analysis, showed that the cluster groups corresponded to both morphology and geographic distribution of the snails. The principal component analysis of allele frequencies plotted by factor 1 with factor 2 in the analysis of genetic variation among populations, demonstrated that the populations of snails with smooth shells differed significantly from the populations of snails with ribbed shells and the genetic distance between the two groups was 0.15 (Nei's 1978).

Key words: *Oncomelania* snails, Population genetics, genetic variation, polymorphic loci