

# 中国大陆福寿螺种群遗传学研究

吕山<sup>1</sup>, 张仪<sup>1</sup>, 刘和香<sup>1</sup>, 胡铃<sup>1</sup>, 柳伟<sup>1</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 李石柱<sup>1</sup>, 胡薇<sup>1</sup>, Li H Utzinger<sup>3</sup>, 周晓农<sup>1\*</sup>

[摘要] 目的 通过遗传标记分析中国大陆福寿螺种群结构特点, 为研究其侵入途径和扩散模式提供基础。方法 利用 CO I 基因扩增引物对中国大陆 60 个采集点的 581 个福寿螺标本进行遗传学分析。利用 DnaSP 5.10.01 进行单倍型多样性和核酸多样性分析, 并通过 Network 4.2.0.1 进行单倍型网络分析。综合 GenBank 上可利用的福寿螺单倍型和本研究获得的单倍型进行进化关系分析, 了解中国大陆福寿螺的进化地位。结果 共获得 556 条有效序列, 分属 25 个单倍型, 其中 6 个单倍型频率较高, 占整个样本的 96.0%。进化分析表明我国存在 *Pomacea canaliculata* 和 *P. insularum* 2 个种。 *P. insularum* 单倍型与国外报告类型存在较大差异。结论 中国大陆福寿螺种群结构复杂, 可能有多种来源和扩散模式。

[关键词] 福寿螺; 种群遗传学; CO I 基因; 中国

[中图分类号] R384.9 [文献标识码] A

## Population genetics of *Pomacea* spp. in mainland of China

Ly Shan<sup>1</sup>, Zhang Yi<sup>1</sup>, Liu H. xiang<sup>1</sup>, Hu Ling<sup>1</sup>, Liu Wei<sup>1</sup>, Liu Q. in<sup>1</sup>, Li Shi. zhu<sup>1</sup>, Hu Wei<sup>1</sup>, Li H. Utzinger<sup>3</sup>, Zhou Xia. nong<sup>1\*</sup>

1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Swiss Tropical and Public Health Institute, Swiss; 3 Basel University, Swiss  
\* Corresponding author

[Abstract] Objective To reveal the population structure of *Pomacea* spp. using genetic markers so as to provide the evidence for studying the invasion and expansion of it in the mainland of China. Methods The genetics of 581 specimens of *Pomacea* spp. from 60 sites was analyzed by sequencing CO I gene. The diversity of nucleotide and haplotypes were calculated in DnaSP 5.10.01. The haplotype network analysis was performed in Network 4.2.0.1. A phylogenetic tree was produced based on the haplotypes from the present study and those available from GenBank in order to understand the taxonomic status of *Pomacea* spp. in China. Results A total of 556 sequences were acquired in the present study and produced 25 unique haplotypes. Six haplotypes frequently occurred in the specimens and accounted for 96.0%. The phylogenetic analysis identified two *Pomacea* species in China, i.e. *P. canaliculata* and *P. insularum*. The usage of haplotypes of *P. insularum* in China reversed from the existing pattern in other countries. Conclusion The complexity of population structure of *Pomacea* spp. in the mainland of China indicates multi-original introduction and complicated expansion patterns.

[Key words] *Pomacea* spp.; Population genetics; CO I gene; China

福寿螺是瓶螺科 (Ampullariidae) 中的一类淡水螺的俗称, 最初是指源于南美洲的外来入侵物种 *Pomacea* spp., 国内有多种异名<sup>[1]</sup>。作为一种食物资源, 福寿螺于 20 世纪 70 年代末首先被引入我国台湾, 随后在我国内陆及东南亚数国被广泛引种、养殖<sup>[2]</sup>。由于养殖管理疏漏, 部分螺逃逸, 并在自然环境中大量繁殖, 沿水系迅速扩散。至 20 世纪 90 年代初, 各地逐渐意识到其对生态环境及农业经济的危害。中国环保局于 2003 年将福寿螺列入首批 16 种外来入侵生物名单

中<sup>[3]</sup>。

福寿螺的入侵远非对生态与农业的影响, 也是造成我国广州管圆线虫病流行的主要原因。迄今, 我国大陆累积报告广州管圆线虫病 380 余例, 75% 的病例与食用福寿螺有直接关系, 9 次暴发 8 次是因食用福寿螺引起<sup>[4]</sup>。根据全国第一次广州管圆线虫病自然疫源地调查等资料显示, 我国南方 11 个省(自治区、直辖市)有福寿螺自然分布, 部分水产品市场和餐饮场所仍有大量福寿螺销售, 并检测到广州管圆线虫感染<sup>[5,6]</sup>。

尽管福寿螺自 20 世纪 70 年代末就被引入, 并在东亚及东南亚地区迅速扩散, 但对其侵入途径及扩散模式的研究直到最近才得以开展<sup>[7]</sup>。系统研究福寿螺的分类有助于了解其侵入途径和入侵模式, 同时也为深入研究其扩散对广州管圆线虫病流行的影响提供科学基础。本研究利用第一次全国广州管圆线虫病自然疫

[基金项目] 国际传染病学会项目 (small grant 2007); 国家重大科技专项 (2009ZX1004-302)

[作者单位] 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心 (上海 200025); 2 Swiss Tropical and Public Health Institute, Swiss; 3 Basel University, Swiss

[作者简介] 吕山, 男, 硕士, 助理研究员。研究方向: 寄生虫病防治

\* 通信作者 E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

源地调查收集的样本进行福寿螺的分类研究,从而探讨福寿螺可能的侵入途径及扩散模式。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 福寿螺 标本来自 2006—2007 年第一次全国广州管圆线虫病自然疫源地流行病学调查<sup>[5]</sup>。各个采样点名称和生态环境详细记录,经、纬度用手持全球定位系统(GPS)确定。无法用手持 GPS 定位的采样点,通过采集点信息从 Google Earth 获取。福寿螺软体标本保存于 100%乙醇中备用。

1.2 试剂和仪器 蛋白激酶 K 溶于无菌去离子水,终浓度为 50 mg/ml,分装保存于 -20℃), 2×Taq Master Mix 购自上海莱枫生物科技有限公司,SDS 和 EDTA 购自华美生物工程公司。仪器有台式高速冷冻离心机 (Sorvall/Heraeus Biofuge Stratos)、PCR 仪 (Q000™ Thermal Cycler)、电泳仪 (BD-RAD PowerPac Basic)、凝胶成像分析系统 (BIO-RAD Molecular Imager Gel Doc XR System)。

### 2 方法

2.1 DNA 抽提 从无水乙醇中取福寿螺足肌约 10 mg 浸泡于 PBS 缓冲液中,换洗数次。将足肌置于 1.5 ml 离心管中,剪碎,加入 500 μl 组织消化液 (Tris 20 mmol/L, EDTA 100 mmol/L, 1% SDS 蛋白激酶 K 0.5 mg/ml) 中,水浴 56℃ 6 h。酚氯仿法 (苯酚 氯仿 异戊醇为 25:24:1) 抽提福寿螺总 DNA, 去离子水溶解 DNA 保存于 -20℃ 备用。

2.2 PCR 扩增 根据文献<sup>[7]</sup>合成引物, LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HC02198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3', 扩增目的片段长度约为 680 bp。上述引物无法扩增的样品用以下引物扩增, 即 PC\_E 5'-AGTTTACTTATTCGTGCTG-3',

PC\_S 5'-GTATTAAAATTCGATCAGT-3', 扩增目的片段长度约为 550 bp。目的基因片段 PCR 扩增反应体系为 20 μl: 2×Taq Master Mix 10 μl, 正反引物各 1 μl, 模板 1 μl (根据抽提结果, 将总 DNA 稀释至浓度 5~50 ng/μl), 加灭菌去离子水至总体积为 20 μl。PCR 循环条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min; 48℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 1 min; 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性结果纯化后测序。

2.3 测序和数据分析 纯化后的 PCR 产物采用荧光标记双脱氧核苷酸终止法进行测序 (ABI3730XL), 对可疑碱基突变的测序进行双向测序确认。为了序列分析方便, 所有序列保留相同的长度。DnaSP 5.10.01 用于单倍型多样性、核酸多样性、序列差异分析。Network 4.2.0.1 用于单倍型网络分析 (haplotype network)。同时收集 GenBank 上的相关单倍型序列, 比对、剪切后采用 Mega3.1 的 Neighbor Joining 法进行进化关系分析。

## 结 果

### 1 核苷酸和单倍型多态性

共获得 60 个采样点 581 个标本, 有效序列 556 条。通过 ClustalK 比对后, 截去首、尾部分序列, 最后每条序列保留 503 个碱基用于后续分析。在所有序列分析中有 83 个核苷酸多态位点, 占总位点的 16.5%, 其中简约信息位点 62 个, 单突变子 21 个。核苷酸多态性为 0.043 38。556 条序列分属 25 个单倍型, 单倍型多态性为 0.705。其中, 单倍型 1、5、6、9、13、19、20、22 频率较高, 其余单倍型仅一条序列 (表 1)。单倍型 1、6、13 为最常见的 3 种单倍型, 占整个分析序列的 83.1%, 其次为单倍型 5、19、22 占 12.9%。根据初步分析, 单倍型 1~5 和 24 为 *Pomacea insularum*, 其余为 *P. canaliculata*。

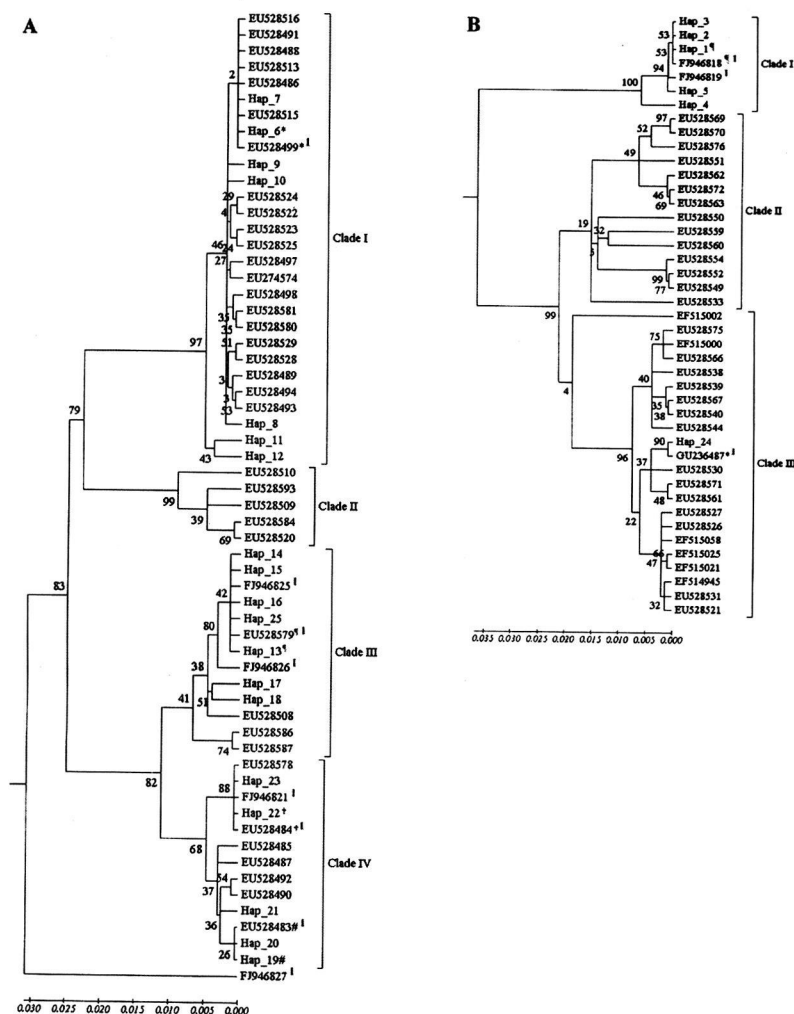
表 1 中国福寿螺 CO I 基因单倍型及频率统计  
Table 1 Haplotype and frequency of CO I gene of *Pomacea* spp. in China

单倍型 Haplotype	频率 Frequency	单倍型 Haplotype	频率 Frequency	单倍型 Haplotype	频率 Frequency
Hap_1	117	Hap_10	1	Hap_19	35
Hap_2	1	Hap_11	1	Hap_20	3
Hap_3	1	Hap_12	1	Hap_21	1
Hap_4	1	Hap_13	263	Hap_22	15
Hap_5	22	Hap_14	1	Hap_23	1
Hap_6	82	Hap_15	1	Hap_24	1
Hap_7	1	Hap_16	1	Hap_25	1
Hap_8	1	Hap_17	1	—	—
Hap_9	2	Hap_18	1	—	—

## 2 中国福寿螺分类地位

从 GenBank 调出 *P. canaliculata* 和 *P. insularum* 的 CO 基因分别为 94 条和 134 条, 通过 ClustaX 比对后剪切至 503 个碱基长度, 进行后续进化关系分析。利用 DnaSP 5.10.01 对本研究及 GenBank 上可获得的 CO 基因统计出单倍型共 98 个, 选取每个单倍型的一个代表性序列进行进化分析, 同时保留本研究获得的单倍型, 并用符号标识相同的单倍型 (图 1)。为较全面分析我国福寿螺的种群遗传, 将既往研究获得的我国 13 个福寿螺单倍型也纳入进化分析中<sup>[9]</sup>, 并用数字表示相同单倍型的数量 (图 1)。*P.*

*canaliculata* 单倍型 6、13、19、22 与 GenBank 上已公布序列具有相同类型, *P. insularum* 单倍型 1 与 GenBank 上已公布序列具有相同类型, 且同为大陆福寿螺标本。出现频率较高的单倍型 5 没有相同类型。*P. canaliculata* 和 *P. insularum* 单倍型可出现在除 Clade II 之外的其他分枝中。*P. insularum* 的分枝 Clade I 是目前我国特有的一类, 而在国外常见的 Clade II 中仅发现 2 个单倍型存在于我国大陆福寿螺, 一是本研究的单倍型 24 仅有一个标本, 另一个是宋红梅等<sup>[9]</sup>发现的单倍型。



A *P. canaliculata* B *P. insularum*

注: 相同符号标记的序列属同一单倍型, 右上角标注的数字表示其他研究获得的我国福寿螺 CO 的相同单倍型的数量

A *P. canaliculata* B *P. insularum*

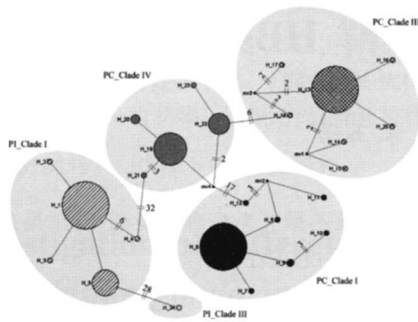
Note: The same symbol indicates the same haplotype. Upper right figures indicate the number of the same haplotype in China according to previous studies.

图 1 基于 CO I 基因的进化树

Fig 1 Phylogenetic tree based on CO I Gene

### 3 单倍型网络分析

单倍型网络分析结果与进化树分析结果类似,定量地展示本研究获得的25个单倍型之间的网络关系(图2)。在单倍型网络中 *P. canaliculata* 和 *P. insularum* 明显地分开,中间至少经过32步碱基突变。而在 *P. canaliculata* 种内不同分枝(Clade I-IV)也经过6步和17步碱基突变。在 *P. insularum* 分枝中 Clade I 和 II 之间经过28步碱基突变,远比 *P. canaliculata* 内部分枝大。



PC\_Clade表示 *P. canaliculata* 的分枝, PI\_Clade表示 *P. insularum* 的分枝,进化树分枝和单倍型编号同进化分析(图1)。无标注的单倍型间连线表示一个碱基突变,多个碱基突变则以交叉叉线和数字表示。

PC\_Clade indicates the subtree of *P. canaliculata*, PI\_Clade indicates the subtree of *P. insularum*. The serial number of clades and haplotypes matches with Fig. 1. Unmarked line between haplotypes indicates one substitution, while more than one substitution is marked by the numbers on cross hatches.

图2 中国福寿螺 CO I 基因单倍型网络分析

Fig. 2 Haplotype network analysis

of *Pomacea* spp. based on CO I gene

## 讨 论

我国南部地区是受福寿螺入侵影响较大的地区之一,对当地生态环境、农业及人群健康造成了严重影响。但是,福寿螺高度的环境适应性和形态学变异导致难以对其进行分类,各类同种异名和异名同种的记录很常见<sup>[1]</sup>。因此,东亚及东南亚地区福寿螺的确切来源及入侵途径仍不清楚。最近,Hayes等<sup>[7]</sup>通过种群遗传的方法试图揭示该地区福寿螺的来源及可能的引入途径。通过 CO 基因单倍型的比对,发现 *P. canaliculata* 很可能来自阿根廷的 Buenos Aires 省,而 *P. insularum* 可能来自阿根廷和巴西。但该研究在中国大陆仅收集了5个标本,均属于 *P. canaliculata*,而在宋红梅等<sup>[9]</sup>的研究中扩大了标本采集数量和范

围,获得13个单倍型,并通过 CO 基因测序和比对确定了 *P. insularum* 的存在。本研究通过第一次全国广州管圆线虫病自然疫源地调查收集的60个调查点近580多个福寿螺标本,进行群体遗传学研究,增加了福寿螺种群遗传学研究结论的可靠性,再次证明 *P. insularum* 存在于我国大陆。

福寿螺包括数个形态类似的种,因此称之为一个种团(Group)<sup>[10]</sup>。其中 *P. canaliculata* 和 *P. insularum* 在形态、生活习性、卵块色泽上均极为相似,很难区分<sup>[11]</sup>。本研究通过遗传标记物 CO 基因片段分析了我国大陆福寿螺种类及基因型,从而揭示了该入侵生物的分布特点,为进一步分析其扩散模式提供了支持。

本研究共获得25个 CO 基因单倍型,但96.0%的标本属于单倍型1、5、6、13、19、22,且各群间单倍型构成也表现出多样性。Hayes等<sup>[7]</sup>研究认为,在福寿螺的入侵地东南亚地区,除少数养殖场所外,同一采集点很少发现同时存在 *P. canaliculata* 和 *P. insularum*。本研究发现我国多数地方2个种同时存在。这一结果提示我国大陆福寿螺的引入和扩散可能是多途径的,但仍需进一步进行空间相关性分析。

在 *P. canaliculata* 进化分析中将所有单倍型分为4个分枝(Clade I-IV), *P. insularum* 中分为3个分枝(Clade I-III)。本研究发现,国外分布较广的 *P. insularum* 单倍型(Clade III)在国内分布非常局限(主要集中在四川盆地),而且种群数量相对较小;而国内具有的一类单倍型(Clade I)包括单倍型1~5)目前尚未发现在国外其他地区分布。主要原因可能是目前研究采集的样品量或采样点较少,但不排除南美洲之外的其他地区引入的可能性。

(志谢:感谢福建、广东、海南、广西、湖南、重庆、贵州等省(直辖市、自治区)疾病预防控制中心及云南、江西等省寄生虫病防治研究所在福寿螺标本采集中给予的大力支持!)

## 【参考文献】

- [1] 周晓农,张仪,吕山. “福寿螺”学名中译名的探讨[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 62-64.
- [2] Joshi RC, Sebastian LS. Global advances in ecology and management of golden apple snail [M]. Nueva Ecija: PhiRice, 2006: 588.
- [3] 中国环境保护总局,中国科学院. 中国第一批外来入侵物种名单[R]. 国务院公报, 2003, 23: 41-46.
- [4] Lv S, Zhang Y, Steimann P, et al. Helminth infections of the central nervous system occurring in Southeast Asia and the Far East [J]. Adv Parasitol, 2010, 72: 351-408.
- [5] Lv S, Zhang Y, Liu HX, et al. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on Angiostrongylus cantoniensis in China [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(2): 368.

- [ 6 ] 叶丽萍, 许国章, 张吉楠, 等. 宁波市广州管圆线虫病自然疫源地调查[ J ]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010 22( 5): 463, 467
- [ 7 ] Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, et al. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia[ J ]. Divers Distrib 2008, 14( 4): 701-712
- [ 8 ] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA Primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[ J ]. Mol Mar Biol Biotechnol 1994, 3( 5): 294-299.
- [ 9 ] 宋红梅, 胡隐昌, 王培欣, 等. 福寿螺线粒体 DNA COI 基因序列测定及分类地位[ J ]. 动物学杂志, 2010 45( 1): 1-7
- [ 10 ] Cazzaniga NJ. Old species and new concepts in the taxonomy of Planorbidae (Gastropoda: Ampullariidae)[ J ]. Biocell 2002, 26( 1): 71-81.
- [ 11 ] Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, et al. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States[ J ]. BMC Evol Biol 2007, 7( 1): 97.

[ 收稿日期 ] 2011-03-02 [ 编辑 ] 杭盘宇

[ 文章编号 ] 1005-6661( 2011) 02-0182-02

• 防治经验 •

## 2010年高邮市血吸虫病传播阻断地区人群 HBsAg携带率调查

黄亚民, 高金彬, 匡瑞祥, 贺泳, 朱玉芳

[ 摘要 ] 对血吸虫病传播阻断地区高邮市毛港村 500 名居民同时进行血吸虫病及乙型肝炎病毒感染调查, 结果表明血吸虫既往感染者 HBsAg 携带率与无病史者无明显差异, 但部分人群携带率较高, 应引起关注。

[ 关键词 ] 血吸虫病; 乙肝表面抗原; 传播阻断; 高邮市

[ 中图分类号 ] R532.21 [ 文献标识码 ] B

### Investigation on HBsAg carrier rate of population in schistosomiasis transmission interrupted area of Gaoyou City, 2010

Huang Ya-min, Gao Jin-bin, Kuang Rui-xiang, He Yong, Zhu Yu-fang

Gaoyou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Province, Gaoyou 225600, China

[ Abstract ] A total of 500 residents in a schistosomiasis transmission interrupted area, Mao Gang Village of Gaoyou City were detected simultaneously for the infection status of schistosomiasis and HBV, and the results showed that there was no significant difference between the HBsAg carrier rates of residents with and without the history of schistosomiasis, but the HBsAg carrier rates in some population were high, which needs more concern.

[ Key words ] Schistosomiasis; HBsAg; Transmission interruption; Gaoyou City

既往多数临床报告显示, 血吸虫病人尤其是晚期病人易合并乙型肝炎病毒 (HBV) 感染, 但对于血吸虫感染者是否对 HBV 易感的现场调查尚无定论<sup>[1-4]</sup>。为探讨高邮湖区人群血吸虫病与 HBV 感染的相互关系及流行规律, 2010 年 8 月在高邮市毛港村开展了血吸虫既往感染人群 HBV 表面抗原 (HBsAg) 携带率现状调查, 结果报告如下。

#### 1 内容与方法

1.1 调查点基本情况 毛港村位于江苏省高邮市高邮湖畔。全村总人口 2 189 人, 以农业和工业为主, 人均收入 7 840 元。该村为血吸虫病历史流行区, 历史累计有钉螺面积 0.67 hm<sup>2</sup>, 累计病人 120 人。防治初期 (1965 年) 人群感染率为 8.53%, 1976 年达到血吸虫病控制标准, 1995 年达到血吸虫病传播阻断标准。

1.2 调查对象和内容 抽样调查当地 8~88 岁常住居民 500 人, 其中有血吸虫病史 83 人, 无病史者 417 人; 男性 192 例, 女性 308 例; 年龄 < 35 岁、35~、45~、60~、≥ 75 岁者分别为 21、45

170、200、64 例; 农民、工人、学生和干部等分别为 361、109、30 例; 文化程度为文盲、小学、初中及以上者分别为 253、116、131 例。调查内容包括受检对象一般情况、既往疫水接触史、血吸虫病治疗史等。

1.3 检测方法 血吸虫抗体检测采用胶体染料试纸条法 (DDIA)<sup>[6-7]</sup>, 由江苏省血吸虫病防治研究所提供, 批号: 20100515。HBsAg 检测采用酶联免疫吸附试验 (ELISA), 检测试剂盒由上海荣盛生物药业有限公司提供, 批号: 20100101。操作均按说明书进行, 结果均由两人以上判断以控制质量。

1.4 统计分析 在 Excel 建立数据库, 用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 携带率比较采用  $\chi^2$  检验。

#### 2 结果

2.1 人群血吸虫抗体水平调查 DDIA 检测 500 人, 查出阳性 1 人, 阳性率 0.2%。阳性者系女性, 62 岁, 工人, 有血吸虫病和胆囊炎病史, 数十年内无疫水接触史, 目前无相关临床症状和体征, 经 HA 和粪检进一步检查, 结果均为阴性。有血吸虫病史人群血检阳性率 (1.2%) 与无病史人群血检阳性率 (0) 差异无统计学意义 ( $P=0.17$ )。

(下转第 186 页)

[ 作者单位 ] 江苏省高邮市疾病预防控制中心 (高邮 225600)