

文章编号: 1000-7423(2012)-04-0268-06

【论著】

## 应用微卫星 DNA 标记探讨我国长江中下游地区湖北钉螺群体遗传结构

李石柱<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 吕山<sup>1</sup>, 王强<sup>1</sup>, 钱颖骏<sup>1</sup>, 杨坤<sup>2</sup>, 周晓农<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 应用微卫星 DNA 分子标志分析中国长江中下游地区湖北钉螺群体的遗传结构。方法 利用 6 对微卫星 DNA 引物, 对采集自湖沼型血吸虫病流行区的湖南汉寿县、湖北阳新县、江西星子县、安徽当涂县和江苏扬州邗江区的湖北钉螺的 P84、T5-13、T5-11、T4-22、T6-27 和 P82 等 6 个位点进行荧光标记通用引物 PCR 扩增。每个采集点采集 20~50 个钉螺标本, 共 165 个。统计分析各群体的等位基因数 ( $N_a$ )、近交系数 ( $F_{IS}$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、观察杂合度 ( $H_o$ )、多态信息含量 ( $PIC$ )、群体间的遗传分化系数 ( $F_{ST}$ ) 和遗传距离, 根据遗传距离进行聚类分析, 并进行分子变异方差分析 (AMOVA)。结果 5 个湖北钉螺群体在 6 个微卫星位点等位基因数范围为 3~33, 平均为 15.833。群体的平均  $H_e$  和  $H_o$  范围分别为 0.600~0.883 和 0.308~0.759, 两者在湖北群体最高, 在江苏群体最低。群体的  $F_{IS}$  范围为 0.143~0.539。成对群体间的  $F_{ST}$  范围为 0.0006~0.0531, 由于  $F_{ST}$  值较小, 提示群体间未出现明显遗传分化。各群体的平均  $PIC$  为 0.511~0.850, 除江苏群体外, 均为高度多态。分级 AMOVA 结算结果显示, 变异主要存在于个体间, 占总变异的 95.2%。聚类分析结果显示, 安徽群体与江苏群体首先聚为一支, 然后依次同湖南、江西、湖北群体聚在一起。结论 湖北钉螺多样性较为丰富; 聚类分析结果符合湖北钉螺的地理分布格局; 5 个群体之间遗传差异较小, 微卫星 DNA 的变异主要存在于个体间。

**【关键词】** 湖北钉螺; 微卫星 DNA; 群体遗传差异

中图分类号: R383.241 文献标识码: A

## Study on the Genetic Differences among *Oncomelania hupensis* Population in Middle and Lower Reaches of Yangtze River using Microsatellite DNA Markers

LI Shi-zhu<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, LV Shan<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1</sup>,  
QIAN Ying-jun<sup>1</sup>, YANG Kun<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>\*</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Center of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

**【Abstract】 Objective** To identify the genetic structure of *Oncomelania hupensis* in the middle and lower reaches of Yangtze River by using microsatellite DNA molecular markers. **Methods** *O. hupensis* snails were collected from the provinces of Anhui, Hunan, Hubei, Jiangxi, and Jiangsu, of which 6 polymorphic microsatellite DNA loci (P84, T5-13, T5-11, T4-22, T6-27 and P82) were amplified with fluorescence labeled universal primer. 20~50 snail samples were collected at each spot, adding up to 165 samples. The number of alleles ( $N_a$ ), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ), heterozygosity ( $H$ ), fixation index ( $F_{ST}$ ) of each group snails, genetic distance between groups, and the polymorphic information content ( $PIC$ ) were calculated. Cluster analysis was then carried out based on genetic distance, and hierarchical AMOVA calculation was done. **Results** The number of alleles in each population ranged from 3 to 33, and the inbreeding coefficient ranged from 0.143 to 0.539. The average expected heterozygosity and observed heterozygosity ranged from 0.600 to 0.883 and 0.308 to 0.759, respectively, being the highest in Hubei population and the lowest in Jiangsu population. The range of  $F_{ST}$  value between paired populations was from 0.0006 to 0.0531. The small  $F_{ST}$  value

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81101280, No. 81101275); 国家传染病重大专项 (No. 2008ZX100042011); 江苏省自然科学基金项目 (No. BK2010153); 上海市公共卫生海外留学基金 (No. GWHW201216)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064

\* 通讯作者, E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

suggested that genetic differentiation did not occur among the populations. The average polymorphic information content in the populations ranged from 0.511 to 0.850, showing a high polymorphism except the Jiangsu population. Hierarchical AMOVA calculations showed that inter-individual variation of the snails occupied 95.2% of the total variations. Cluster analysis revealed that Anhui group clustered first to Jiangsu, followed with Hunan, Jiangxi and Hubei. **Conclusion** There is a rich diversity in *O. hupensis*. Cluster analysis shows a consistency with the geographical distribution pattern. The genetic differences among the 5 snail populations are trivial with microsatellite DNA variation mostly present in individuals.

**[Key words]** *Oncomelania hupensis*; Microsatellite DNA; Population genetic difference

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101280, No. 81101275), Key Project of the National Infectious Disease (No. 2008ZX100042011), the Natural Science Fund of Jiangsu Province (No. BK2010153), and Public Health Overseas Fund of Shanghai (No. GWHW201216)

\* Corresponding author, E-mail: xiaonongzhou1962@gmail.com

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫唯一中间宿主, 在血吸虫病传播过程中起着关键作用<sup>[1,2]</sup>。湖北钉螺主要分布在中国长江流域及其以南地区, 是中国大陆仅存的一种钉螺<sup>[3]</sup>。由于其分布广泛、孳生环境复杂, 以及地理隔离的影响, 湖北钉螺不同地理群体发生了显著的遗传分化和变异, 并依据血吸虫病流行区的特征和不同孳生景观环境, 主要呈现出 4 个生态景观群体或地理亚种<sup>[4,5]</sup>, 即长江中下游的湖沼型景观的指名亚种 (*O. h. hupensis*)、高山景观的滇川亚种 (*O. h. robertsoni*)、喀斯特地貌景观的广西亚种 (*O. h. guangxiensis*) 和滨海山丘型景观的福建亚种 (*O. h. tangi*)。湖北钉螺湖沼型景观群体主要分布在长江中下游的湖南、湖北、江西、安徽和江苏等省的湖沼、水网和丘陵等地区<sup>[4]</sup>。由于其孳生环境和地理景观范围广, 长期以来, 不同地理群体发生了显著的遗传分化。如同为湖沼型景观群体的湖北庙河流域上游和下游地区钉螺的螺壳分别表现为光壳和肋壳, 呈现出明显的形态差异<sup>[6]</sup>。

微卫星 DNA 是一类简单的短核苷酸串联重复序列, 广泛分布于真核生物的基因组中, 由于微卫星 DNA 具有在群体中易检测、杂合度高和分布广等特点, 故已成为群体遗传差异研究重要的分子标志<sup>[7]</sup>。软体动物中已分离微卫星 DNA 的动物已达 128 种, 共获得了 3 284 条微卫星 DNA 序列<sup>[8]</sup>。但微卫星标记在湖北钉螺遗传多样性研究的应用起步较晚, 仅有少量应用微卫星锚定 PCR (SSR-PCR) 进行群体变异研究的报道<sup>[9-11]</sup>。为进一步探索湖沼型血吸虫病流行区湖北钉螺群体的遗传分化趋势, 本研究通过分离、筛选湖北钉螺的微卫星 DNA 位点<sup>[8]</sup>, 利用其多态性, 分析沿长江流域分布的湖北钉螺湖沼型景观群体不同地理种群的遗传多样性。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 钉螺来源 钉螺分别采自湖沼型血吸虫病流行

区的湖南汉寿县、湖北阳新县、江西星子县、安徽当涂县和江苏扬州邗江区 (图 1, 表 1)。每个采集点随机选择 20~50 个钉螺。各个群体的钉螺经饲养约 1 周后, 用逸蚴法鉴定钉螺是否感染血吸虫, 取阴性钉螺作为实验材料。75%乙醇浸泡, 4℃保存待用。

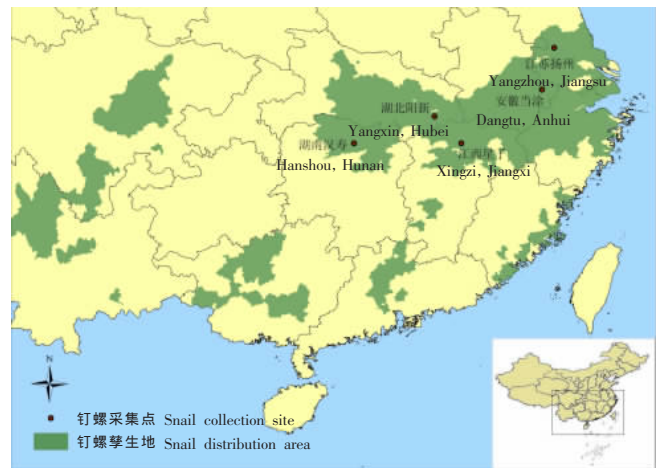


图 1 湖北钉螺采集点地理分布

Fig. 1 Geographical distribution of *O. hupensis* collection sites

表 1 湖北钉螺采集地信息

Table 1 Location of *O. hupensis* collection

采集地/编码 Collection site/Code	标本数 No. samples	采集日期 Collection Date	经纬度 Longitude and latitude
安徽当涂/AHDT Dangtu, Anhui/AHDT	23	5/12/2007	31.46425°N 118.77576°E
湖南汉寿/HNHS Hanshou, Hunan/HNHS	30	4/14/2007	28.92238°N 112.15158°E
湖北阳新/HBYX Yangxin, Hubei/HBYX	50	3/29/2007	29.82804°N 115.23305°E
江西星子/JXXZ Xingzi, Jiangxi/JXXZ	30	4/14/2007	29.29765°N 116.0066°E
江苏扬州/JSYZ Yangzhou, Jiangsu/JSYZ	32	4/14/2007	32.55622°N 119.45517°E

## 2 方法

2.1 DNA 抽提 取单只湖北钉螺的腹足肌肉组织 30 mg, 采用软体动物 DNA 小量提取试剂盒 (购自美国 OMEGA 生物技术公司) 提取基因组 DNA, -20℃保存待用, 操作方法参考文献 [12]。

2.2 基因扫描

2.2.1 荧光标记引物 多态性微卫星 DNA 位点的筛选参照文献 [8,13]。获得的多态性微卫星 DNA 位点的正向引物进行 6-FAM、HEX 和 NED 荧光标记(均购自上海鼎安生物技术有限公司)(表 2)。

2.2.2 PCR 扩增 扩增反应体系为 25  $\mu$ l, 包括 20 ng 模板 DNA、0.5  $\mu$ mol/L 引物、1 U *Taq* 酶、0.15 mmol/L 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs)、1.5 mmol/L  $MgCl_2$  和 1 $\times$  PCR 缓冲液。PCR 扩增条件为: 95  $^{\circ}C$  5 min; 95  $^{\circ}C$  1 min, 50~55  $^{\circ}C$  45 s, 72  $^{\circ}C$  1.5 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}C$  5 min。

2.2.3 扩增产物检测 取 1  $\mu$ l PCR 产物, 0.6  $\mu$ l ROX 标准物和 8.4  $\mu$ l 超纯甲酰胺混匀, 95  $^{\circ}C$  变性 5 min, 随后用全自动遗传分析仪 (3730XL, 美国 ABI 公司) 检测 PCR 产物。

2.3 数据分析 基因扫描结果经 Genescan 和 Genotype 分析软件获得扩增片段的精确长度, 结果以 Excel 表格形式输出, 使用 MS-Tools 的 Excel Microsatellite

Toolkit 软件转化原始数据为 FSTAT2.9.3.2 可识别文件, 计算群体内的遗传分化指标等位基因数 (number of alleles,  $N_a$ )、近交系数(inbreeding coefficient,  $F_{IS}$ )、期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ ) 和观察杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ )。应用 GENEPOP4.1.10 软件分别检验哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 和成对位点的连锁不平衡水平 (lingage disequilibrium, LD)。在 MICRO-CHEKER 中计算每个群体等位基因频率。应用 ARLEQUIN3.11<sup>[14]</sup> 软件计算成对群体间的遗传分化指数 ( $F_{ST}$ )、基因流 ( $N_m$ ) 和遗传距离 [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ]。AWOVA 模块分析群体遗传变异的组成, 再以非加权组平均法 (unweighted pair group method with arith-metic means, UPGMA) 进行聚类分析<sup>[15]</sup>。在 GENEPOP 中对遗传距离与地理距离的相关性进行回归的 Mantel 检验。根据文献<sup>[15]</sup>的公式计算多态信息含量 (polymorphism information content,  $PIC$ )。

表 2 湖北钉螺 6 个微卫星位点的扩增引物  
Table 2 Primers of the 6 microsatellite loci in *O. hupensis*

位点 Locus	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复序列 Repeat motif	退火温度/ $^{\circ}C$ Annealing temperture/ $^{\circ}C$	长度/bp Size/bp	Genbank 登录号 GenBank Accession No.
P82	Pf: AAGAACTGCTCATACTGGAAAG Pr: GTGGTGGCCCTACGACCT	(GGA) <sub>4</sub> (GAA) <sub>12</sub>	51	179	GU204045
P84	Pf: GTTGCAGATTCGAAAGA Pr: GATCAGGGGTTGTCCAGT	(TACAT) <sub>3</sub>	50	140	JN681194
T4-22	Pf: TATCCAAGAAGCCGAAAC Pr: GAGGAAAGCGAGGTAAGA	(CA) <sub>10</sub>	50	244	GU204083
T5-11	Pf: ACGCCAGTCTTTGCTGTC Pr: TACTTGGGCAGAAAGGGTT	(GT) <sub>14</sub>	55	173	GU204092
T5-13	Pf: TAGTGGGACTTATTTGCTG Pr: AAGGCTGAGTGCTAGTTA	(GT) <sub>14</sub> ...(GT) <sub>6</sub>	50	245	GU204194
T6-27	Pf: AATGACACCCGAAACAAA Pr: CACTTCTCAACTCCAACCT	(G) <sub>13</sub> (GT) <sub>6</sub> ...(GT) <sub>2</sub>	55	204	GU204213

结 果

1 基因扫描

湖北钉螺是二倍体生物, 故其单个标本的基因型有 2 种: 杂合子为 2 个或 2 个以上不同的等位基因; 纯合子仅有 1 个等位基因。利用 6 个多态微卫星 DNA 位点 (P84、T5-13、T5-11、T4-22、T6-27 和 P82) 对 5 个湖北钉螺群体的 165 个标本进行了基因扫描。毛细管电泳图经 Genescan 和 Genotype 分析软件获得扩增片段的精确长度。结果以 Excel 表格形式输出, 共获得 1 920 个微卫星 DNA 位点数据。

2 湖北钉螺群体内遗传差异

对湖北钉螺 5 个群体分析结果显示,  $N_a$  范围为 3

(P84)~33 (T5-13), 平均为 15.833。平均  $N_a$  最少的群体为江苏群体 (6.333), 最多为湖南群体 (22.000) (表 3)。各群体内的平均  $H_e$  和  $H_o$  的范围分别为 0.600~0.883 和 0.308~0.759, 平均值分别为 0.806 和 0.600, 两者在湖北群体中均为最高, 在江苏群体中为最低。本研究湖北钉螺 5 个群体的  $F_{IS}$  范围为 0.143 (湖北群体)~0.539 (江苏群体), 平均为 0.248。各群体的平均  $PIC$  为 0.764, 其中江苏群体  $PIC$  最低 (0.511), 湖北群体  $PIC$  最高 (0.850)。综合所有指标信息, 结果显示, 湖北钉螺湖北群体遗传变异程度最高, 江苏群体最低。

对所有群体的所有位点进行 30 次 HWE 检验, 结果显示, 有 12 个位点偏离 HWE ( $P<0.01$ ), 每个群体都有 2 或 3 个位点偏离 HWE, 其中 4 个群体的 T6-27 位点均偏离 HWE (表 3)。LD 检验结果显示, 在各个



表 3 不同群体各个微卫星 DNA 位点的遗传多样性测度参数  
Table 3 Parameters of genetic diversity of *O. hupensis* at different loci

群体 Population	指数 Index	微卫星位点 Microsatellite locus						合计 Total
		P84	T5-13	T5-11	T4-22	T6-27	P82	
安徽当涂 AHDT	$N_a$	3	16	14	21	19	19	15.333
	$H_o$	0.476	0.643	0.842	0.667	0.571	0.714	0.652
	$H_e$	0.382	0.913	0.889	0.960*	0.958*	0.950	0.842
	$F_{IS}$	-0.254	0.304	0.054	0.312	0.410	0.253	0.231
	$PIC$	0.319	0.873	0.855	0.930	0.932	0.923	0.805
湖北阳新 HBYX	$N_a$	3	29	21	20	18	23	19.000
	$H_o$	0.800	0.893	0.889	0.724	0.567	0.679	0.759
	$H_e$	0.566	0.968	0.941	0.934*	0.934*	0.957*	0.883
	$F_{IS}$	-0.425	0.078	0.056	0.228	0.398	0.295	0.143
	$PIC$	0.469	0.948	0.918	0.912	0.913	0.937	0.850
湖南汉寿 HNHS	$N_a$	6	33	21	27	22	23	22.000
	$H_o$	0.280	0.689	0.813	0.756	0.444	0.711	0.616
	$H_e$	0.335	0.921	0.938	0.950*	0.936*	0.951*	0.838
	$F_{IS}$	0.164	0.254	0.135	0.206	0.528	0.255	0.268
	$PIC$	0.314	0.907	0.924	0.935	0.921	0.938	0.823
江苏扬州 JSYZ	$N_a$	3	-	4	2	13	16	6.333
	$H_o$	0.182	-	0.400	0.000	0.667	0.600	0.308
	$H_e$	0.312	-	0.800	0.667*	0.924*	0.900*	0.600
	$F_{IS}$	0.423	-	0.529	1.000	0.286	0.339	0.539
	$PIC$	0.270	-	0.672	0.375	0.884	0.867	0.511
江西星子 JXXZ	$N_a$	4	24	22	16	17	16	16.500
	$H_o$	0.656	0.857	0.880	0.414	0.516	0.667	0.665
	$H_e$	0.522	0.962	0.955	0.901	0.932*	0.901	0.867
	$F_{IS}$	-0.192	0.111	0.080	0.545	0.450	0.263	0.236
	$PIC$	0.469	0.935	0.932	0.876	0.911	0.876	0.833
合计 Total	$N_a$	3.800	20.400	16.400	17.200	17.800	19.400	15.833
	$H_o$	0.479	0.616	0.765	0.512	0.553	0.674	0.600
	$H_e$	0.429	0.753	0.905	0.882	0.937	0.932	0.806
	$F_{IS}$	-0.053	0.204	0.117	0.326	0.446	0.286	0.248
	$PIC$	0.368	0.733	0.860	0.806	0.912	0.908	0.764

注: - 代表该数据缺失; \* 表示偏离哈代-温伯格平衡的位点 ( $P<0.01$ )。  
Note: - Relevant data unavailable; \* Locus departure Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.01$ ).

群体中的成对微卫星位点不存在连锁关联。

应用 Micro-Checker 对本研究的所有微卫星位点的等位基因频率进行检测, 结果显示, 每个群体在每个位点均存在一定比例的哑等位基因, 哑等位基因频率最高的是 T4-22 位点在江苏群体中(0.333), 湖南群体和江苏群体在 6 个微卫星 DNA 位点均有哑等位基因 (表 4)。

表 4 微卫星 DNA 位点在湖北钉螺群体内哑等位基因的频率  
Table 4 The frequency of null allele of *O. hupensis*

位点 Locus	群体 Population				
	安徽当涂 AHDT	湖北阳新 HBYX	湖南汉寿 HNHS	江苏扬州 JSYZ	江西星子 JXXZ
P84	0.000	0.000	0.065	0.119	0.000
T5-13	0.113	0.028	0.102	-	0.041
T5-11	0.019	0.049	0.063	0.189	0.037
T4-22	0.170	0.102	0.094	0.333	0.251
T6-27	0.190	0.180	0.250	0.119	0.231
P82	0.160	0.152	0.136	0.160	0.117

注: - 表示该数据缺失。  
Note: - Relevant data unavailable.

### 3 湖北钉螺群体间遗传差异

$F_{ST}$  是检测群体间遗传分化程度的重要参数, 成对群体间的  $F_{ST}$  范围为 0.0006 (安徽群体与江苏群体)~0.0531

(江西群体与江苏群体)(表 5), 群体间分化表明安徽群体与江苏群体遗传分化程度最低, 江苏群体与江西群体遗传分化程度最高。对群体间差异与地理距离的相关性进行回归的 Mantel 检验, 结果显示, 两者间呈现正相关关系 ( $R^2=0.0648$ ,  $P<0.05$ ) (图 2), 群体遗传分布符合距离隔离模型 (Isolation-by-distance Model), 相关性为 25.46%。

表 5 湖北钉螺成对群体间的  $F_{ST}$  和地理距离  
Table 5  $F_{ST}$  and geographic distance among paired *O. hupensis* populations

群体 Population	安徽当涂 AHDT	湖北阳新 HBYX	湖南汉寿 HNHS	江苏扬州 JSYZ	江西星子 JXXZ
AHDT	-	385.072	697.153	137.418	358.972
HBYX	0.0216	-	315.406	503.762	95.372
HNHS	0.0016	0.0240	-	807.091	377.187
JSYZ	0.0006	0.0474	0.0212	-	489.833
JXXZ	0.0271	0.0049	0.0305	0.0531	-

注: 下三角为  $F_{ST}$  值, 上三角为地理距离/km。  
Note: Lower triangle and upper triangle represent  $F_{ST}$  and geographic distance/km, respectively.

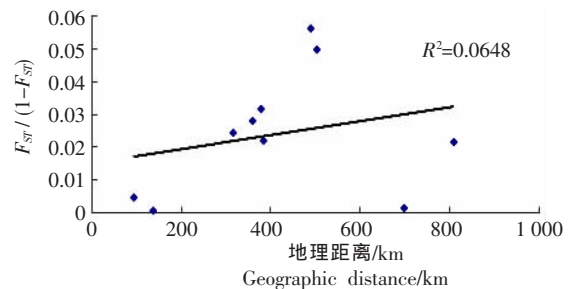


图 2 遗传距离与地理距离间的相关性分析  
Fig. 2 Analysis on the relationship between genetic distance and geographic distance

分子变异等级分析的计算结果显示, 湖北钉螺的变异主要存在于个体间, 占总变异的 95.2% (个体间变异%-群体内个体间变异%=107.6%-12.4%=95.2%), 群体间的变异仅占总变异的 4.8% (表 6)。群体的  $F_{ST}$  值为 0.048,  $N_m$  水平为 4.958, 说明群体间遗传差异小, 分化不显著。依据遗传距离构建各群体的聚类关系, 结果显示, 安徽群体与江苏群体聚为一支, 然后

表 6 湖北钉螺群体遗传变异的分级 AMOVA 计算结果  
Table 6 Hierarchical AMOVA calculation of genetic variation among *O. hupensis* populations

遗传变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	遗传变异因素 Variance components	占总变异百分比/% Percentage of variation/%
群体间 Among populations	4	0.01026	4.8
群体内个体间 Among individuals within populations	155	-0.02637	-12.4
个体间 Among individuals	160	0.22812	107.6
合计 Total	319	0.21202	100.0

依次同湖南、江西和湖北群体聚在一起 (图 3)。

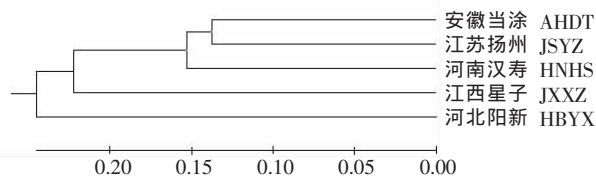


图 3 5 个湖北钉螺群体的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA cluster analysis of five *O. hupensis* populations

## 讨 论

湖北钉螺湖沼型景观群体主要分布在长江中下游的湖南、湖北、江西、安徽和江苏等省的湖沼、水网和丘陵的广大地区,是分布范围广泛、孳生环境多样、遗传分化复杂的一个群体。不同生态景观群体表现出丰富的遗传多样性,钉螺体型不仅存在大小差异,而且螺壳形态分化为肋壳和光壳<sup>[4,16,17]</sup>。因此,本研究在构建湖北钉螺微卫星 DNA 文库的基础上,应用筛选出的 6 个多态位点<sup>[8]</sup>,对分布于长江中下游地区湖北钉螺湖沼型景观群体的 5 个代表性地理种群进行了遗传多样性分析,对于深入研究血吸虫病防治和监测具有重要意义。

应用微卫星 DNA 位点探讨湖北钉螺群体的遗传多样性,如等位基因数 ( $N_a$ )、近交系数 ( $F_{IS}$ )、期望杂合度 ( $H_o$ )、观察杂合度 ( $H_e$ ) 和多态信息含量 (PIC) 等。获得的上述数据提示本研究应用的微卫星 DNA 位点多态性适当,是检测湖北钉螺群体遗传差异较为理想的分子标志。 $F_{IS}$  指群体内个体间的近交系数,取值范围为 -1~1。当  $F_{IS}$  的值越趋近于 1,则表示群体内近交程度越高,若越趋近于 -1,则表示群体内远交程度越高<sup>[18]</sup>。本研究的 5 个湖北钉螺群体的  $F_{IS}$  平均值为 0.248,结果提示,湖北钉螺群体内的杂合子不足,发生近交的机会较多,这与钉螺本身的活动范围小,较难发生远交有关。哈代-温伯格平衡检验显示,共有 12 个位点偏离哈代-温伯格平衡,每个群体都有 2 或 3 个位点偏离哈代-温伯格平衡,其中 T6-T27 位点在 4 个群体中均偏离哈代-温伯格平衡现象,表明在本研究的群体中,杂合子缺失较为严重,可能由于这些群体沿长江沿线分布,存在明显的沿江迁移、药物压力、突变与近交等情况,但哪种情况起主导作用,目前还不清楚<sup>[19]</sup>。分析计算的近交系数与哈代-温伯格平衡检验结果,提示两者存在密切的对应关系。由于本研究的湖北钉螺各群体近交系数较大,难以随机交配,故偏离哈代-温伯格平衡的群体多,可能是杂合子不足,或是哑等位基因多导致。

多态信息含量 (PIC) 是衡量基因变异程度高低的

重要指标之一,当某位点的多态信息含量 > 0.5 时,表明该位点为高度多态位点;当其值为 0.25~0.5 时,该位点为中度多态位点;当其值 < 0.25 时为低度多态性<sup>[18]</sup>。同时,多态信息含量关系到该座位可用性和使用效率,多态信息含量越大,在一个群体中,该座位杂合子比例则越大,提供的遗传信息就越高<sup>[20, 21]</sup>。本研究 6 个多态位点在不同群体间的多态信息含量分析显示,6 个位点的多态信息含量为 0.368~0.912,平均为 0.764,表明本研究所选的多态微卫星 DNA 位点除 P84 (PIC=0.368) 外,均为高度多态位点。在本研究中,湖南群体和江苏群体在 6 个微卫星位点均有哑等位基因,产生哑等位基因的可能原因是:① 扩增引物不匹配,扩增引物是依据特定参考序列设计合成,特定参考序列来自基因组文库,不同来源标本的参考序列可能存在较大差异,导致匹配度差;② PCR 的竞争本性导致长度短的比长度长的等位基因扩增容易,故扩增大小的等位基因时产生哑等位基因;③ 标本基因组 DNA 模板质量的前后不一致或质量低,通常情况下,只有 1~2 个基因座或等位基因扩增失败,而其他的等位基因在相同条件下扩增成功<sup>[22]</sup>。

在 5 个湖北钉螺种群中,等位基因数、期望杂合度、观察杂合度和多态信息含量分析结果显示,江苏群体均为最少,表明其遗传分化程度最低;而等位基因数在湖南群体中最高,期望杂合度、观察杂合度和多态信息含量则在湖北群体中最高,表明湖南群体和湖北群体的遗传分化程度较高,相比之下,后者遗传分化程度更高,与线粒体 DNA 序列分析和空间遗传分析结果类似<sup>[4,22,23]</sup>;同时,5 个群体的多态信息含量为 0.511~0.850,表明湖北钉螺变异程度多样性较为丰富。各群体的观察杂合度的范围为 0.308~0.759,除江苏群体外,其他群体的观察杂合度均大于 0.5,说明湖北钉螺具有较高的变异度,具有丰富的遗传多样性,与 SSR-PCR 研究结果类似,均表现为较高的多态性<sup>[11]</sup>。

群体间遗传分化指数 ( $F_{ST}$ ) 和 Mantel 检验结果显示,群体间遗传差异与地理距离表现出一定的正相关性,但不十分明显,地理距离较近的群体间遗传分化水平较低,如安徽群体与江苏群体;而地理距离较远的群体间遗传分化水平并不高,不同地理群体的种群遗传结构仍然表现出一定的独立性,如安徽群体与湖南群体地理距离较远,但 2 个群体的分化程度较低。这一结果可能与湖北钉螺湖沼型群体的遗传变异主要来自群体内的个体间而非地理种群间有关,也可能是由于江苏、湖南和江西等地区的抽样群体处于长江干流,而安徽和湖北等地区的抽样群体则属于湖区腹地。因此,尽管湖沼型群体分布范围广,但沿长江中

下游地区分布的钉螺群体仍可以看作一个大的群体<sup>[4]</sup>。本研究初步探讨了大尺度生态景观环境下, 长江中下游地区湖北钉螺群体的遗传结构, 将在此基础上进一步研究小尺度生态环境下, 湖北钉螺群体的遗传分化和迁徙。

利用 UPGMA 法构建的系统发育树仍显示地理位置相近的群体聚在一起, 这与 Mantel 检验结果相一致。安徽群体与江苏群体最先聚为一支, 然后依次同湖南、江西和湖北群体聚在一起, 在湖北钉螺沼型这一大的群体内, 存在一定的沿江扩散趋势<sup>[24]</sup>, 这一现象为深入开展钉螺扩散和监测研究具有一定的理论意义。

### 参 考 文 献

- [1] Wang LD, Utzinger J, Zhou XN. Schistosomiasis control: experiences and lessons from China [J]. Lancet, 2008, 372(9652): 1793-1795.
- [2] Utzinger J, Zhou XN, Chen MG, et al. Conquering schistosomiasis in China: the long march [J]. Acta Trop, 2005, 96(2-3): 69-96.
- [3] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) throughout China [J]. Stud Mar Sin, 1997, 39(2): 89-95.
- [4] Li SZ, Wang YX, Yang K, et al. Landscape genetics: the correlation of spatial and genetic distances of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host snail of *Schistosoma japonicum* in mainland China [J]. Geospat Hlth, 2009, 3(2): 221-231.
- [5] Zhou YB, Yang MX, Zhao GM, et al. *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssooidea), intermediate host of *Schistosoma japonicum* in China: genetics, molecular phylogeny based on amplified fragment length polymorphisms [J]. Malacologia, 2007, 49(2): 367-382.
- [6] Shi CH, Wilke T, Davis GM, et al. Population genetics, microphylogeography, ecology, and infectivity of Chinese *Oncomelania hupensis hupensis* (Gastropoda: Risssooidea: Pomatiopsidae) in the Miao River system: is there a relationship to shell sculpture? [J]. Malacologia, 2002, 44(1): 333-347.
- [7] Guo W, Shen ZR. The application of microsatellite DNA markers in entomology [J]. Biotechnology, 2004, 14(2): 60-61. (in Chinese) (国伟, 沈佐锐. 微卫星 DNA 标记技术及其在昆虫学上的应用 [J]. 生物技术, 2004, 14(2): 60-61.)
- [8] Li SZ, Wang YX, Ma YJ, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Schisto Control, 2010, 22(2): 122-125. (in Chinese) (李石柱, 王艺秀, 马雅军, 等. 湖北钉螺多态微卫星 DNA 位点筛选和特征初步分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(2): 122-125.)
- [9] Niu AO, Xiong YW. Studies on the genetic variation of *Oncomelania hupensis* with SSR-PCR [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2002, 15(4): 230-233. (in Chinese) (牛安欧, 熊衍文. 微卫星锚定 PCR 研究湖北钉螺的遗传变异 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(4): 230-233.)
- [10] Li HJ, Wang W, Zhang W, et al. Genetic diversity of CO in *Oncomelania hupensis* snails (Gastropoda: Risssooidea) along the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. Mar Sci, 2011, 35(10): 86-90. (in Chinese) (李洪军, 汪伟, 张伟, 等. 长江中下游地区湖北钉螺线粒体 CO 基因遗传变异研究 [J]. 海洋科学, 2011, 35(10): 86-90.)
- [11] Zhou YB, Zhao GM, Wei JG, et al. Genetic diversity in 19 Chinese populations of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssooidea) detected by simple sequence repeat-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Chin J Epidemiol, 2007, 28(9): 859-862. (in Chinese) (周艺彪, 赵根明, 韦建国, 等. 微卫星锚定 PCR 分析 19 个湖北钉螺种群之间的遗传变异关系 [J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(9): 859-862.)
- [12] Ma L, Li SZ, Yang P, et al. Comparison of five different methods of extracting genomic DNA from *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Pathogen Biol, 2011, 6(2): 129-132. (in Chinese) (马琳, 李石柱, 杨频, 等. 湖北钉螺基因组 5 种抽提方法的比较 [J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(2): 129-132.)
- [13] Zhang L, Li SZ, Wang Q, et al. Isolation and characterization of 15 new microsatellite markers in *Oncomelania hupensis*, the snail intermediate host of *Schistosoma japonicum* in mainland China [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(5): 5844-5850.
- [14] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform Online, 2007, 1: 47-50.
- [15] Khan HA, Arif IA, Bahkali AH, et al. Bayesian, maximum parsimony and UPGMA models for inferring the phylogenies of antelopes using mitochondrial markers [J]. Evol Bioinform Online, 2008, 4: 263-270.
- [16] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [17] Shi ZH, Qiu CP, Xia MY, et al. Preliminary study on cytochrome C oxidase 1 gene of *Oncomelania hupensis* from Miao River area in Hubei Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19(1): 41-44. (in Chinese) (石朝辉, 邱持平, 夏明仪, 等. 湖北省庙河地区钉螺细胞色素 C 氧化酶 1 基因差异的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1): 41-44.)
- [18] Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistic for the analysis of population structure [J]. Evolution, 1984, 38(6): 1358-1370.
- [19] Zhou YB, Zhao GM, Wei JG, et al. Study on the genetic diversity among populations of schistosome intermediate hosts within *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) in mainland China [J]. Chin J Epidemiol, 2006, 27(10): 865-870. (in Chinese) (周艺彪, 赵根明, 韦建国, 等. 25 个湖北钉螺种群扩增片段长度多态性分子标记的遗传变异研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(10): 865-870.)
- [20] Liao XL, Yu XM, Tan DQ, et al. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity of grass carp in Yangtze River system [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2005, 29(2): 113-119. (in Chinese) (廖小林, 俞小牧, 谭德清, 等. 长江水系草鱼遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(2): 113-119.)
- [21] Yan LN, Zhang DX. Effects of sample size on various genetic diversity measures in population genetic study with microsatellite DNA markers [J]. Acta Zool Sin, 2004, 50(2): 279-290. (in Chinese) (闫路娜, 张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响 [J]. 动物学报, 2004, 50(2): 279-290.)
- [22] Dakin EE, Avise JC. Microsatellite null alleles in parentage analysis [J]. Heredity, 2004, 93(5): 504-509.
- [23] Zhou YB, Zhao GM, Peng WX, et al. Spatial genetic correlation analysis of *Schistosoma japonicum* intermediate hosts within *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Risssooidea) from mainland China based on amplified fragment length polymorphisms [J]. J Fudan Univ (Med Sci), 2007, 34(2): 207-212. (in Chinese) (周艺彪, 赵根明, 彭文祥, 等. 日本血吸虫中间宿主湖北钉螺遗传变异的空间相关分析 [J]. 复旦学报 (医学版), 2007, 34(2): 207-212.)
- [24] Zhao QP, Zhang SH, Deng ZR, et al. Conservation and variation in mitochondrial genomes of gastropods *Oncomelania hupensis* and *Tricula hortensis*, intermediate host snails of *Schistosoma* in China [J]. Mol Phylogenet Evol, 2010, 57(1): 215-226. (收稿日期: 2012-02-20 编辑: 瞿麟平)