

2022年浙江省嘉兴市湖北钉螺的群体遗传学分析

顾伟玲¹, 彭晗琪², 张韩香², 向泽林¹, 陈中文¹, 富小飞¹, 元云鹏¹, 谢亮¹, 胡浩¹, 吕大兵²

1. 嘉兴市疾病预防控制中心, 浙江嘉兴 314050; 2. 苏州大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 江苏苏州 215127

摘要:

【目的】基于微卫星遗传标记法对浙江省嘉兴市不同有螺环境的湖北钉螺进行基因分型,开展群体遗传学分析,探讨钉螺存在或扩散的原因及其影响因素,为有效监测和控制钉螺提供依据。**【方法】**选取嘉兴市2022年重点有螺环境的平湖市姚浜(YB)村和三兴(SX)村,以及秀洲区的运河(YH)农场3个种群共90只钉螺样本,采用9个微卫星位点对钉螺进行基因分型和群体遗传学分析。**【结果】**共观察到84个等位基因,YB、SX和YH种群平均等位基因数分别为7.889、5.667、3.778;有效等位基因数分别为4.807、3.329和2.294;近交系数分别为0.400、0.377、0.493。在无限等位基因模型下,SX和YH近期可能出现瓶颈效应。NeEstimator和LDNe软件计算的有效种群均>31.9。分子方差分析显示3个种群钉螺的变异主要存在于个体间,占总变异的41.44%,群体间遗传分化指数为0.286,表示遗传分化程度很大。主坐标分析与系统发生树结果一致,3个种群分为2个谱系,YB和SX为1个谱系,YH分属另一个独立谱系。种群历史及动态分析显示3个种群基因流不充分。溯源分析表示可能为YH首先从SX分化,YB由SX和YH接触融合形成。**【结论】**嘉兴市钉螺种群遗传多样性总体较低,钉螺种群较不稳定,遗传分化程度很大,各种群之间基因流不充分。

关键词: 湖北钉螺; 微卫星标记; 群体遗传学; 种群历史动态; 嘉兴市

中图分类号: R113

文献标志码: A

DOI: 10.19428/j.cnki.sjpm.2024.23536

引用格式: 顾伟玲,彭晗琪,张韩香,等.2022年浙江省嘉兴市湖北钉螺的群体遗传学分析[J].上海预防医学,2024,36(6):559-562.

Population genetics analysis of *Oncomelania hupensis* in Jiaxing, Zhejiang Province, 2022

GU Weiling¹, PENG Hanqi², ZHANG Hanxiang², XIANG Zelin¹, CHEN Zhongwen¹, FU Xiaofei¹, QI Yunpeng¹,

XIE Liang¹, HU Jie¹, LYU Dabing²

1. Department of Gastroenterology, The First Hospital of Jiaxing City, Jiaxing, Zhejiang 314050, China;

2. Department of Epidemiology and Statistics, School of Public Health, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215127, China

Abstract: **【Objective】**To genotype *Oncomelania hupensis*, based on microsatellites, in different snail-bearing environments in Jiaxing City, Zhejiang Province, for population genetics analysis in order to explore the reasons and influencing factors for the existence or proliferation of snails and to provide scientific basis for effective monitoring and control of snails. **【Methods】**A total of 90 snail samples from three populations were collected in Yaobang Village (YB) and Sanxing Village (SX) in Pinghu City, and Yunhe Farm (YH) in Xiuzhou District, all were selected for snail checking in key snail habitats of Jiaxing City in 2022. DNA of the snails was genotyped and analyzed for population genetics using nine microsatellite loci. **【Results】**A total of 84 alleles were observed, and the mean number of alleles (N_a) was 7.889, 5.667, and 3.778 for YB, SX, and YH respectively; the number of effective alleles (N_eA) was 4.807, 3.329, and 2.294, respectively; and the coefficients of inbreeding (F_{is}) were 0.400, 0.377, and 0.493, respectively. Under the Infinite Allele Model (IAM), the SX and YH might have a recent bottleneck. The NEstimator and LDNe software calculated effective population sizes (N_e) were above 31.9. AMOVA analysis showed that the variation of snails in the three populations mainly existed among individuals, accounting for 41.4% of the total variation. The value of the index of genetic differentiation between populations (F_{st}) was 0.286, indicating a high degree of genetic differentiation. The results of the principal component analysis and phylogenetic tree were consistent, and the three populations were divided into two lineages, YB and SX were one lineage, and YH belonged to another independent lineage. Population history and dynamics analysis showed that the gene flow of the three populations was insufficient, population divergence history indicated that YH might have diverged from SX first, and YB was produced by the contact fusion of SX and YH. **【Conclusion】**The genetic diversity of snail populations in Jiaxing City is generally low, and the snail populations are unstable, with a great degree of genetic differentiation and insufficient gene flow among populations. This study can provide a basis for evaluating the effectiveness of the control of the snail as well as monitoring the trend of the spread of the snail.

Keywords: *Oncomelania hupensis*; microsatellite marker; population genetics; demographic history; Jiaxing City

血吸虫病(schistosomiasis)是一种人兽共患传染性寄生虫病,全球有78个国家近2.5亿人受血吸虫病流行影响^[1]。我国流行日本血吸虫病已2000余年,经过70余年科学防治,阶段性防治目标已基本实现^[2]。

然而,截至2022年底全国仍有109个血吸虫病流行县(市、区)尚未达到消除阶段^[3],实现《健康中国行动(2019—2030年)》提出的“到2030年消除血吸虫病”目标仍然面临挑战^[4-5]。湖北钉螺作为日本血吸虫的唯一

【基金项目】国家自然科学基金(81971957);浙江省嘉兴市科技计划项目(2022AY10032)

【作者简介】顾伟玲,女,硕士,主任医师;研究方向:流行病学,E-mail:jxgw1@126.com。彭晗琪,女,硕士在读;研究方向:血吸虫流行病学与群体遗传学;E-mail:penghanqi0520@163.com。并列第一作者

【通信作者】吕大兵,E-mail:ludabing@suda.edu.cn

中间宿主,其分布与血吸虫病流行区高度一致^[6]。由于湖北钉螺分布广泛,且长期受到地理隔离和孳生环境复杂等因素影响,来自不同地区甚至同一地区的不同湖北钉螺个体均呈现明显遗传分化^[7],对日本血吸虫的易感性存在明显差异^[8]。因此,深入开展钉螺群体遗传学研究有助于控制钉螺和消除血吸虫病。

微卫星遗传标记法具有共显性遗传、高度多态性、检测方便等优点^[9],已在群体遗传学研究中广泛应用,如李石柱等^[10-11]基于微卫星、宏观尺度探讨我国长江中下游地区湖北钉螺群体遗传结构。浙江省嘉兴市是历史上水网型血吸虫病重度流行区,境内河道纵横、水系密集,其中嘉兴、嘉善2个县(区)曾是全国10个血吸虫病严重流行县之一^[12],2022年调查发现螺环境分布于4个乡镇、7个行政村。本研究选取其中3个有螺环境的钉螺标本,应用9个微卫星位点进行基因分型和群体遗传学分析,以探讨钉螺存在或扩散的原因及其影响因素,为进一步开展钉螺监测和控制提供依据。

1 对象与方法

1.1 样本采集

于嘉兴市2022年重点有螺环境平湖市新埭街道姚浜(简称“YB”)村、广陈镇三兴(简称“SX”)村,以及嘉兴市秀洲区新塍镇运河(简称“YH”)农场3个有螺环境采集钉螺样本种群,分别命名为YB、SX、YH种群。采样时间为2022年4月,其中YB村和SX村有水系相通。所获得的钉螺均通过逸蚴法检验确认为非感染性钉螺,保存在无水乙醇中。每个地点随机抽样30只钉螺进行分析。

1.2 钉螺脱氧核糖核酸提取及微卫星位点扩增

取钉螺腹足肌肉组织30 mg,采用软体动物组织DNA抽提试剂盒(HiPure Mollusc DNA Kit)提取脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)后于-25℃保存。使用QIAGEN多重聚合酶链反应(PCR)试剂盒对9个微卫星位点进行扩增反应,采用2个多重PCR反应体系,体系1包含T6-17、DH02、B14、C22及DH01 5个位点,体系2包含T4-25、T4-22、D11GW及T1-10 4个位点,每个位点的正向引物用6-FAM、HEX、TAMRA或ROX进行荧光标记。扩增体系15 μL,其中钉螺DNA 1.5 μL。PCR扩增条件:95℃ 5 min循环1次;95℃ 30 s,60℃ 60 s,72℃ 30 s循环30次;65℃ 30 min循环1次。PCR扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司检测,由ABI3100测序仪完成测序。每次送检时,选取1个钉螺DNA样本重复测序作为阳性对照,用于质量控制。

1.3 数据分析

1.3.1 遗传多样性分析 测序数据经GeneMarker HID V2.6软件^[13]读取等位基因;应用Microsatellite Analyser V4.05软件计算等位基因总数, FATAT V2.9.3.2软件计算等位基因数(number of alleles, Na)、有效等位基因数(effective number of allele, NeA)、观察杂合度(observed heterozygosity, Ho)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)、Shannon指数、近交系数等;GENEPOP 4.8.3软件检测是否偏离Hardy-Weinberg平衡。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.2 瓶颈效应、有效种群大小和种群遗传结构 采用Bottleneck V1.2软件,基于无限等位基因模型(infinite allele model, IAM)和双相突变模型(two-phase mutation model, TPM)确定钉螺种群是否经历瓶颈效应。运用NeEstimator V2.1^[14]和LDNe软件^[15]计算有效种群大小及其95%CI。运用Arlequin V3.5软件^[16]进行分子变异方差分析,计算钉螺种群间遗传分化指数。采用GenAlex V6.5软件^[17]进行种群间主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA),绘制PCoA图。运用MEGA V11.0软件基于遗传距离构建非加权平均系统发生树。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.3 种群历史动态分析 使用软件Migrate-N V5.0.4计算钉螺种群间基因流变化,迁入和迁出种群的有效迁移率(4NeM)系通过移动参数M与迁入种群 Θ 之积计算^[18]。运用DIYABC V2.1.0软件分析YB村、SX村、YH农场的历史分化和动态,共分析27种(3个种群,各9个位点)可能的历史场景,运算中假设所有参数为一致的先验模型,每个场景模拟10⁶个数据集,计算后验概率及95%CI,选择后验概率最高场景。

2 结果

2.1 群体遗传多样性

2022年嘉兴市YB、SX、YH种群共发现84个等位基因,YB、SX和YH种群的Na分别为7.889、5.667和3.778, NeA分别为4.807、3.329和2.294;YB种群的Ho、He和Shannon指数均为3个种群最大值,分别为0.456、0.742和1.659;近交系数均 >0 。见表1。

Hardy-Weinberg平衡检验显示,在所检测的27个数据中,每个种群各有7个(78%, 21/27)位点显著偏离平衡($P<0.05$)。

2.2 瓶颈效应、有效种群大小和种群遗传结构

在IAM模型下,SX种群与YH存在显著杂合子过剩($P=0.002, 0.014$),近期可能经历瓶颈效应;在IAM和TPM模型下,YB种群未检测到瓶颈效应和潜在扩张

表1 2022年嘉兴市3个钉螺分布地钉螺种群的遗传多样性指标

Table 1 Genetic diversity indices of three *Oncomelania hupensis* populations in Jiaxing City in 2022

钉螺种群 Population	姚浜村种群 YB		三兴村种群 SX		运河农场种群 YH	
	平均数 Mean	标准误 SE	平均数 Mean	标准误 SE	平均数 Mean	标准误 SE
等位基因数 Na	7.889	1.033	5.667	0.764	3.778	0.813
有效等位基因数 NeA	4.807	0.820	3.329	0.382	2.294	0.338
观察杂合度 Ho	0.456	0.082	0.413	0.081	0.259	0.085
期望杂合度 He	0.742	0.044	0.675	0.028	0.462	0.092
平均期望杂合度 Mean He	0.756	0.044	0.690	0.028	0.472	0.093
Shannon指数 Shannon index	1.659	0.153	1.326	0.108	0.854	0.192
近交系数 Inbreeding coefficient	0.400	0.098	0.377	0.125	0.493	0.138

趋势($P>0.05$)。基于连锁不平衡法计算有效种群值及其95%CI见表2, YB种群的有效种群值均 >50 。分子变异方差分析结果显示, 钉螺变异主要存在于个体间, 占总变异的41.44%, 群体间遗传分化指数为0.286, 群

体内、群体内个体间钉螺变异分别占总变异的28.60%、29.97%。PCoA(图1)和系统发生树结果均表明, 3个种群被划分为2个不同的谱系: YB和SX种群构成1个谱系, 而YH种群则形成了一个独立的谱系。

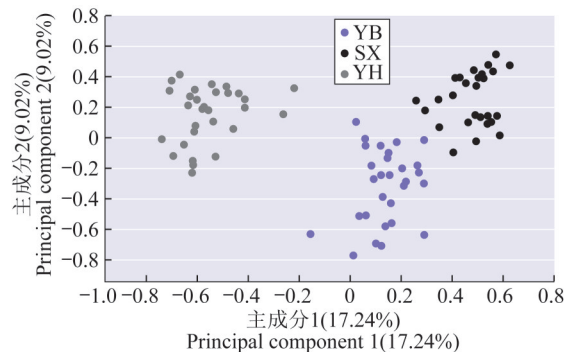
表2 2022年嘉兴市3个钉螺种群瓶颈效应和有效种群大小及其95% CI

Table 2 The results of three *Oncomelania hupensis* populations with the Wilcoxon sign-rank test and effective population size and its 95% CI in Jiaxing City in 2022

种群 Population		姚浜村种群 YB	三兴村种群 SX	运河农场种群 YH
杂合子过剩	无限等位基因模型 IAM	0.064	0.002 ^a	0.014 ^a
Probability for heterozygosity excess	双相突变模型 TPM	0.180	0.064	0.125
杂合子缺失	无限等位基因模型 IAM	0.976	0.999	0.990
Probability for heterozygosity deficiency	双相突变模型 TPM	0.850	0.976	0.902
不同软件计算的有效种群	NeEstimator软件 NeEstimator software	59.8(31.0, 265.9)	31.9(16.0, 123.7)	33.1(12.6, Inf)
Effective population size calculated different software	LDNe软件 LDNe software	89.3(36.9, Inf)	Inf(64.9, Inf)	78.5(17.1, Inf)

【注】a: $P<0.05$; Inf: 无限大。

[Note] a: $P<0.05$; Inf: Infinite.



【注】YB: 姚浜村种群; SX: 三兴村种群; YH: 运河农场种群。

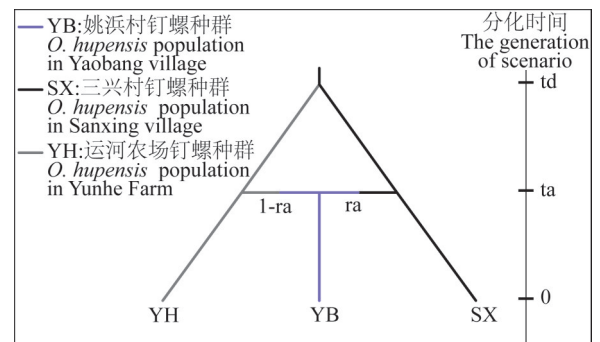
[Note] YB: *Oncomelania hupensis* population in Yaobang Village; SX: *Oncomelania hupensis* population in Sanxing Village; YH: *Oncomelania hupensis* population in Yunhe Farm.

图1 2022年嘉兴市3个钉螺种群的PCoA

Figure 1 PCoA for three *Oncomelania hupensis* populations in Jiaxing City in 2022

2.3 钉螺种群基因流和动态分析

YB、SX、YH种群的 $4N_eM$ 值均 <1 , 表示种群之间的迁移率不足以中和遗传漂变影响使种群间区分明显。进一步通过DIYABC分析, 计算出27个场景的后验概率, 场景22后验概率最高, 即YH首先从SX分化, YB由SX和YH接触融合形成, 如图2所示。



【注】ta、td: 分化时间; ra: 混合率。

[Note] ta, td: The generation of scenario; ra: Admixed rate.

图2 DIYABC溯源分析后验概率最高的场景

Figure 2 DIYABC highest posterior probability scenario

3 讨论

运用微卫星基因分型对血吸虫病传播阻断地区、浙江省嘉兴市的YB村、SX村以及YH农场3个有螺环境的钉螺群体进行遗传学分析。研究结果显示, 嘉兴市钉螺种群遗传多样性整体呈现较低水平, 低于安徽省石台县^[19]、湖南省汉寿县^[11]以及江苏省仪征市^[20]等种群, 其遗传多样性低的原因, 可能是生境片段化影响种群数量和种群间基因流^[21-22]。此外, 近亲繁殖会使致

种群多态性受限和杂合子缺失,而遗传漂变在近亲种群中影响则更严重^[23-24]。在Hardy-Weinberg平衡检验中近78%微卫星位点显著偏离平衡状态。Hardy-Weinberg平衡是各等位基因频率在理想状态(种群足够大、种群个体间随机交配、没有突变、没有选择、没有迁移)下稳定不变^[25],由于现场收集的钉螺样本难以满足理想条件,尤其近年来长江中下游洪涝灾害频发,流域内的钉螺实为“钉螺聚集体”,很难保持稳定的种群。

瓶颈效应结果显示,SX和YH种群出现杂合子过剩,检测出瓶颈效应,说明这2个钉螺群体近期可能遭遇重大环境打击,如药物灭螺和栖息地破坏等,导致钉螺数量急剧下降,这一结果显示了这些地区钉螺控制措施的有效性。相反,YB种群近期未显示出瓶颈效应和扩张趋势,处于稳定状态,暗示YB村存在对钉螺监测和管理中的漏洞。此外,有效种群越大,其遗传多样性水平就越高,对环境变化的适应性就越强。Lynch等^[26]认为当 $N_e \geq 50$ 时,才能使近交衰退对种群的影响降至最小,YB种群的有效种群大小相对较高,说明其具备更强地适应环境变化的能力。YB种群来源于平湖市YB村的河道,SX种群来源于平湖市SX村的滩地。尽管这2个有螺环境地理位置相近,分析结果却不尽相同,推测YB村可能存在漏查或查漏情况,也可能由于河道内孳生,钉螺易随水流或附着在漂浮物上扩散所致^[27],因此相对陆地遗传多样性较高。此外,SX种群在LDNe软件下的有效种群大小显示无穷大,提示与秀洲区YH农场相比,平湖市YB村和SX村钉螺情况更为复杂,彻底消除钉螺难度较大,需要加大监测力度和采取更加有力的控制措施。

根据Balloux等^[28]提出的遗传分化指数标准:0~0.05为低度遗传分化、0.05~0.15为中度分化、0.15~0.25为高度分化,本研究中遗传分化指数均达到0.286,表明3个群体之间遗传分化程度高,基因流少。PCoA与系统发育树结果一致,YB种群和SX种群聚为一类,YH种群单独聚为一类,分析原因可能为YB村和SX村水系相连,YH农场水系与前两者不相连,也符合地理邻近聚集特点。基于钉螺种群的历史与动态分析发现,3个不同地理位置种群之间的基因流动较为有限,这种现象可能源于不同孳生环境或是不同地区采取的灭螺措施,导致钉螺之间的相互迁徙较少。DIYABC溯源分析显示最佳场景为YH种群最初从SX种群分化出来,随后YB种群通过SX、YH种群之间接触和融合而形成。基于这一分析,可以推断SX种群所处环境可能是钉螺最早出现的地区,而YB种群的出现

则相对较晚。

综上所述,嘉兴市3个有螺环境的钉螺具有较低遗传多样性,其中平湖市钉螺情况比秀洲区更为复杂,应强化持续监测,同时注意防控外来钉螺迁入风险。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献

- [1] LOVERDE P T. Schistosomiasis[M]//TOLEDO R, FRIED B. Cham: Springer, 2019: 45-70.
- [2] 许静,曹淳力,吕山,等.血吸虫病防治这10年:进展与挑战[J].中国血吸虫病防治杂志,2022,34(6):559-565,579.
- [3] 张利娟,何君逸,杨帆,等.2022年全国血吸虫病防治进展[J].中国血吸虫病防治杂志,2023,35(3):217-224,250.
- [4] 健康中国行动推进委员会.健康中国行动(2019—2030年):总体要求、重大行动及主要指标[J].中国循环杂志,2019,34(9):846-858.
- [5] 操治国.我国血吸虫病防治的进展、挑战与对策[J].热带病与寄生虫学,2022,20(3):130-135.
- [6] SONG L G, WU X Y, SACKO M, et al. History of schistosomiasis epidemiology, current status, and challenges in China: on the road to schistosomiasis elimination[J]. Parasitol Res, 2016, 115(11): 4071-4081.
- [7] 周艺彪.日本血吸虫中间宿主湖北钉螺遗传变异及分类的研究[D].上海:复旦大学,2007.
- [8] 洪青标,周晓农,孙乐平,等.不同地区不同环境类型钉螺对日本血吸虫易感性的测定[J].中国血吸虫病防治杂志,1995,7(2):83-86.
- [9] TROCHEZ-SOLARTE J D, RUIZ-ERAZO X, ALMANZA-PINZON M, et al. Role of microsatellites in genetic analysis of *Bombyx mori* silkworm: a review[J]. F1000Res, 2019, 8: 1424.
- [10] 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.
- [11] 李石柱,张丽,刘琴,等.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[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2012,30(4):268-273.
- [12] 王金荣,俞文美,顾伟玲,等.嘉兴市血吸虫病传播阻断后螺情监测[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(4):325-326.
- [13] HOLLAND M M, PARSON W. GeneMarker[®] HID: a reliable software tool for the analysis of forensic STR data[J]. J Forensic Sci, 2011, 56(1): 29-35.
- [14] DO C, WAPLES R S, PEEL D, et al. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data[J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(1): 209-214.
- [15] WAPLES R S, DO C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium [J]. Mol Ecol Resour, 2008, 8(4): 753-756.
- [16] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10(3): 564-567.
- [17] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [18] FERNANDO H S D, HAPUGODA M, PERERA R, et al. Gene flow patterns among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in Sri Lanka[J]. Insects, 2020, 11(3): 169.
- [19] 邓姚.基于微卫星(STR)位点的新发现、复现和现有有螺环境中钉螺遗传多样性分析[D].苏州:苏州大学,2019.
- [20] 何健.基于时空与遗传信息的江苏省江淮钉螺分布规律研究[D].无锡:江苏省血吸虫病防治研究所,2016.

(下转第569页)