

四川光壳钉螺微卫星遗传变异的小尺度空间自相关分析

郭俊涛 周艺彪 张志杰 刘刚明 依火伍力 王海银 赵根明

【摘要】 目的 采用小尺度空间自相关分析方法对四川省普格县的湖北钉螺自然居群微卫星(SSR)遗传变异的空间结构进行分析,探讨湖北钉螺自然居群遗传变异的空间分布特征。方法 选用5对SSR引物对湖北钉螺基因组DNA进行扩增,选择频率在15%~85%的72个SSR等位基因,运用等样本对频率方法划分14个距离等级分别计算空间自相关系数Moran's *I*。结果 5对SSR引物经PCR扩增共得到274个等位基因,SSR等位基因的平均多态信息量高达0.965,表现出很高的遗传多态性。钉螺种群中39个SSR等位基因的遗传变异存在一定程度的空间结构,表现为不同模式的正空间自相关。根据这39个等位基因在14个距离等级上的平均Moran's *I*值,可以发现随着距离增大正空间自相关性逐渐减小,但未发现表现为负空间自相关的距离等级和等位基因。结论 普格县湖北钉螺种群中SSR遗传变异的空间分布,表现为随着距离增加而减少的正空间自相关性。

【关键词】 湖北钉螺; 微卫星; 空间自相关; Moran's *I*

Simple sequence repeat variation and small-scale spatial autocorrelation analysis on smooth-shell populations of *Oncomelania hupensis* in Sichuan province GUO Jun-tao*, ZHOU Yi-biao, ZHANG Zhi-jie, LIU Gang-ming, YIHUO Wu-li, WANG Hai-yin, ZHAO Gen-ming. *Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: ZHAO Gen-ming, Email: gmzhao@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analysis the spatial autocorrelation on the small-scale distribution of the genetic variation in the population of *Oncomelania hupensis* in Puge county, Sichuan province, using simple sequence repeat (SSR) marker. **Methods** 5 pairs of SSR primer were used to amplify the genomic DNA of *Oncomelania hupensis*, and the alleles with frequency ranging from 15% to 85% were used to calculate Moran's *I* spatial autocorrelation coefficients in 14 distance band based on equal numbers of paired samples. **Results** A total of 274 alleles were scored by 5 pairs of SSR primer, the average polymorphic information content of the 274 alleles were 0.965 which indicated a high level of genetic diversity. 39 alleles showed different patterns of positive spatial autocorrelation of genetic variation, which was non-random spatial structure. When the distance band increased, the spatial auto-correlativity decreased based on the average Moran's *I* value at 14 distance band. The alleles which showed a negative spatial autocorrelation were not found in any distance band. **Conclusion** The spatial distribution of the genetic variation of SSR showed positive spatial autocorrelation in the population of *Oncomelania hupensis*, and the spatial auto-correlativity decreased with the increase of distance band.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Microsatellite (simple sequence repeat); Spatial autocorrelation analysis; Moran's *I*

湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)作为日本血吸虫的惟一中间宿主,在中国、日本、菲律宾等亚洲国家与地区广泛分布^[1]。对湖北钉螺居群中的生态与进化过程可以用钉螺居群内遗传变异的空间分布模式进行深入研究。由于自然选择与生态环境变化、

土地利用、人为的环境改造等影响因素之间的相互作用,使钉螺的生境破碎化或斑块化^[2,3],空间模式分析能更好地理解这些因素之间的相互作用。要估计选择与漂变对居群遗传结构的潜在影响,就必须定量测定遗传变异空间结构的大小与尺度^[4],而这些均依赖于空间结构的精确描述。同时,遗传变异的空间结构将影响现实居群内取样的样本基因型频率,使我们对居群的遗传学指标的估计发生偏差,因此,居群遗传变异空间结构的研究还有利于对居群遗传特征的正确解释^[5]。

目前在数量、密度及形态性状等方面已经对钉

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.05.021

基金项目: 国家自然科学基金(30671799, 30872159); 国家“863”计划课题(2006AA02Z 402); 上海市重点学科建设项目(B118)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室公共卫生安全教育重点实验室(郭俊涛、周艺彪、张志杰、王海银、赵根明); 四川省普格县疾病预防控制中心(刘刚明、依火伍力)

通信作者: 赵根明, Email: gmzhao@shmu.edu.cn

螺居群的空间结构进行了初步的研究^[6,7],还有一些研究以扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记的方法进一步对遗传变异的空间结构进行描述^[8]。Wright's F-统计量、遗传分化度等参数在一定程度上可以提供物种居群间遗传结构的信息,但对于深入了解亚居群或邻近个体之间遗传变异的空间分布,有效信息仍显不足^[5,9]。而空间自相关分析作为一种有效的工具,可以在未预先假设居群结构尺度大小的情况下提供比Wright's F-统计量、遗传分化度更详细的空间分布信息^[9]。本次研究将在这些研究的基础上,以微卫星(microsatellite, simple sequence repeat, SSR)为分子标记采用空间自相关分析方法对钉螺居群内遗传变异的空间分布模式进行较精确的统计学描述。

材料与方 法

1. 钉螺标本采集:2008 年 4 月在四川省普格县采集钉螺标本,为光亮钉螺,螺壳高 3.10~6.96 mm,体螺旋数为 3~6 旋,最后用于本次研究的钉螺共 166 只。所有钉螺采集时均经 GPS 定位,用以上材料做小尺度的空间自相关分析。采样点之间的距离分布为 2.5~1320.6 m,均数为 554.5 m,标准差 377.9 m。采样点之间均有一定的空间间隔,取样点具体分布情况如图 1。

2. 基因组 DNA 的提取:用 0.3%NaCl 清洗钉螺,吸干表面水分后用玻璃板轻轻压碎,在解剖镜下观察有无母胞蚴、子胞蚴、尾蚴,剔除感染钉螺。将未感染的钉螺软体置于研钵中,加入适量液氮并研磨成白色粉末,使用 Genomic DNA Purification Kit (Fermentas 公司生产)提取基因组 DNA。提取出的 DNA 在 0.8%琼脂糖凝胶中 130 V 电泳 2 h 以检验其完整性,并用紫外分光光度计测定其含量和纯度。

3. PCR 扩增及产物检测:按文献^[10]报道的 28 个微卫星位点设计引物进行筛选预实验,选取其中多态性高、稳定性好的 5 对 SSR 引物用于正式实验。每 50 μl 反应体系中含有:20 pmol/L 引物,10~20 ng 模板,0.25 U Taq 酶 (Ampli Taq Gold, Branchburg, New Jersey, USA),250 μmol/L dNTPs,10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.3),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂。反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 45 s,共进行 35 个循环,末次循环后 72℃ 延伸 10 min。最后在 4℃ 保存待测。扩增产物在 7% 的聚丙烯酰胺凝胶 [每 50 ml 含:35 ml 水、5 ml 10×TBE 溶液、12 ml 30% 丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺胶液(29:1)、500 μl 10% 过硫酸铵和 40 μl TEMED] 上进行电泳分离,以 pUC18/MspI 作为标准对照。150 V 恒电压下电泳 140 min。参照周艺彪等^[11]报道的银染法染色,略有改动。凝胶用扫描仪扫描并记录。

4. 数据判读和空间自相关分析:本研究将引物扩增的谱带作为等位基因分析,并视为绝对型变异,按等位基因的有和无分别作为“1”或“0”赋值,以此构建二态数据矩阵进行多态性分析和空间自相关分析。

微卫星遗传变异的指标采用多态信息量 (polymorphic information content, PIC),各等位基因 PIC 值的计算公式:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n X_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2X_i X_j$$

式中 X_i 表示该位点第 i 个等位基因的表型频率。

在空间自相关分析中,如果某一等位基因的频率过高或过低,则该位点在空间自相关分析中提供的有效信息将很少^[12]。为了保证数据具有足够的统

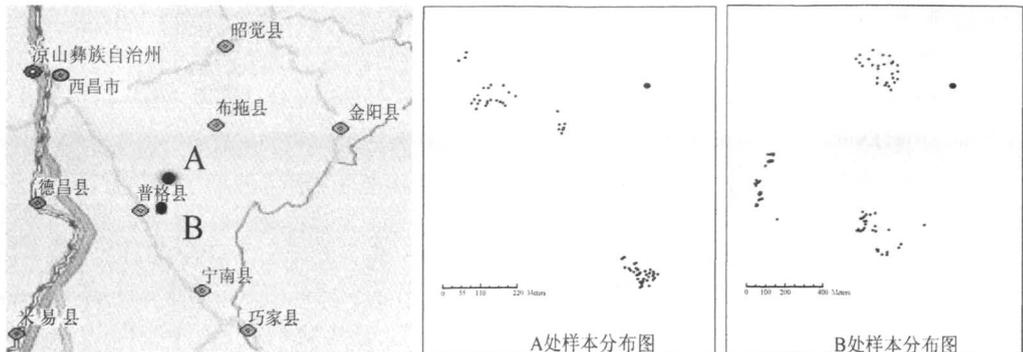


图1 四川省普格县湖北钉螺样本分布

计学意义,我们统一选取了表型频率在 15%~85% 范围内的等位基因。使用 ARCGIS 软件进行分析,分析时依据等样对频率原则划分了 14 个距离等级,尽量使每个距离等级内的样对数均匀分布。空间自相关分析统计量选择 Moran's *I* 系数,当 *I* 值显著大于 *I* 的期望值($I = -1/(n-1)$, $n =$ 样点数)且为正值时,说明两点存在相似关系;而当 *I* 值显著小于 *I* 的期望值时,说明两点不存在相似关系^[5,13]。通过统计学检验来判定上述的相似和不相似是否是由于随机过程造成的,进而分析居群在两个不同分布尺度上的空间结构^[13]。

结 果

1. 湖北钉螺种群的 SSR 分析:本次研究用 5 对引物对 166 只湖北钉螺的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,共检测到清晰可靠的谱带 274 个,谱带大小约在 60~320 bp 范围,每对引物扩增的谱带数在 32~72 个之间,平均每对引物可以扩增出 54.8 个谱带(95%CI: 34.9~74.7)。各位点的 PIC 均超过 0.9,平均值为 0.965,说明四川钉螺有很高的遗传多态性(表 1)。

表 1 四川钉螺微卫星分析的 5 对引物、等位基因数及 PIC

引物编号	引物序列	重复类型	等位基因数	PIC
9	CATCTTCATCATTTTAGTAGGC	(GA) _n	72	0.976 79
	AAAACCTGCATATGGATTAAAA			
15	GCGTCTAAGCAGCCTCTCTTAC	(CT) _n	66	0.976 06
	CACAGACAGATGGGGATGAGGG			
18	GGGTGGAGATAGGGAAGGAAAT	(GA) _n	46	0.953 66
	GAITTCITTTTGCTCGTCTCTTG			
20	TCCTTTCCTTTCCACATTTTCT	(CT) _n	58	0.973 08
	GGGTGGAGATAGGGAAGGAAAT			
21	TTCGATTAAGTTAATTTGCTTTT	(CAT) _n	32	0.947 51
	ACACACACAGTTCATCGTCTT			

2. 四川钉螺种群的 SSR 遗传变异的空间分析:经过筛选,频率在 15%~85% 的 72 个等位基因用于空间自相关分析,在 14 个距离等级上共得到的 1008 个 Moran's *I* 值,经统计学检验,其中有 518 个 *I* (51.39%) 与期望 *I* 的差异在 $\alpha = 0.01$ 水平上有统计学意义,有 128 个 *I* (12.70%) 与期望 *I* 的差异在 $\alpha = 0.05$ 水平上有统计学意义,其余 362 个 *I* (35.91%) 与期望 *I* 的差异无统计学意义。所有 1008 个 Moran's *I* 值中有 43 个为负数,但统计学检验均无统计学意义,其余 Moran's *I* 值均 > 0。

从有统计学意义的 Moran's *I* 值在各距离等级中的分布看,所有有统计学意义的 Moran's *I* 值均 >

0;在近距离等级内(第 1~4 距离等级,30~186 m),表现为显著正相关的等位基因比例逐渐增加,从第 5 个距离等级开始(259~1169 m),显著正相关的等位基因比例稳定在 66.7% 的水平,不再继续增加(表 2)。

表 2 湖北钉螺各距离等级中表现显著正相关的等位基因数

距离等级(m)	显著正相关等位基因数*	等位基因构成比(%)
34	35	48.6
60	38	52.8
107	46	63.9
186	47	65.3
259	48	66.7
567	48	66.7
624	48	66.7
712	48	66.7
775	48	66.7
817	48	66.7
883	48	66.7
967	48	66.7
1047	48	66.7
1169	48	66.7

注: * $P < 0.05$

在所有 72 个用来空间自相关分析的等位基因中,33 个(45.8%)等位基因不存在明显的空间结构,为随机分布模式,又称为百纳被模式^[14],有 39 个(54.2%)等位基因具有明显的空间结构,且均为正空间自相关分布。

从有统计学意义的 Moran's *I* 值的等位基因看,各等位基因的空间模式不尽一致(图 2),其中 P1533、P1540、P1551、P1552、P1554、P1558、P2194、P2054、P2045、P9641 等 19 个等位基因在 1~8 距离等级内 Moran's *I* 值逐渐减小,这些等位基因的空间自相关性随着距离增大而减小,即距离越近这些基因在个体间的相似性越大;等位基因 P214、P2148、P2055 在 1~3 距离等级内 Moran's *I* 值迅速增大然后趋于稳定,但结合统计学检验的结果,这些等位基因在 1~3 距离等级内的 Moran's *I* 值并无统计学意义;其他部分等位基因如 P1839 等在绝大多数距离等级内差异不显著,表现为稳定的正空间自相关。

通过计算各个距离等级上 39 个有统计学意义的 Moran's *I* 值的均数(图 3),可以发现平均 Moran's *I* 值随着距离等级的增加呈现下降趋势,且曲线下降速率基本恒定,没有明显的拐点。可见,虽然各个等位基因的空间分布模式不同,但是总体上 SSR 的空间分布有以下规律:距离越近,湖北钉螺个体间微卫星的相似性越高,随着距离的增加,相似性逐渐降低。

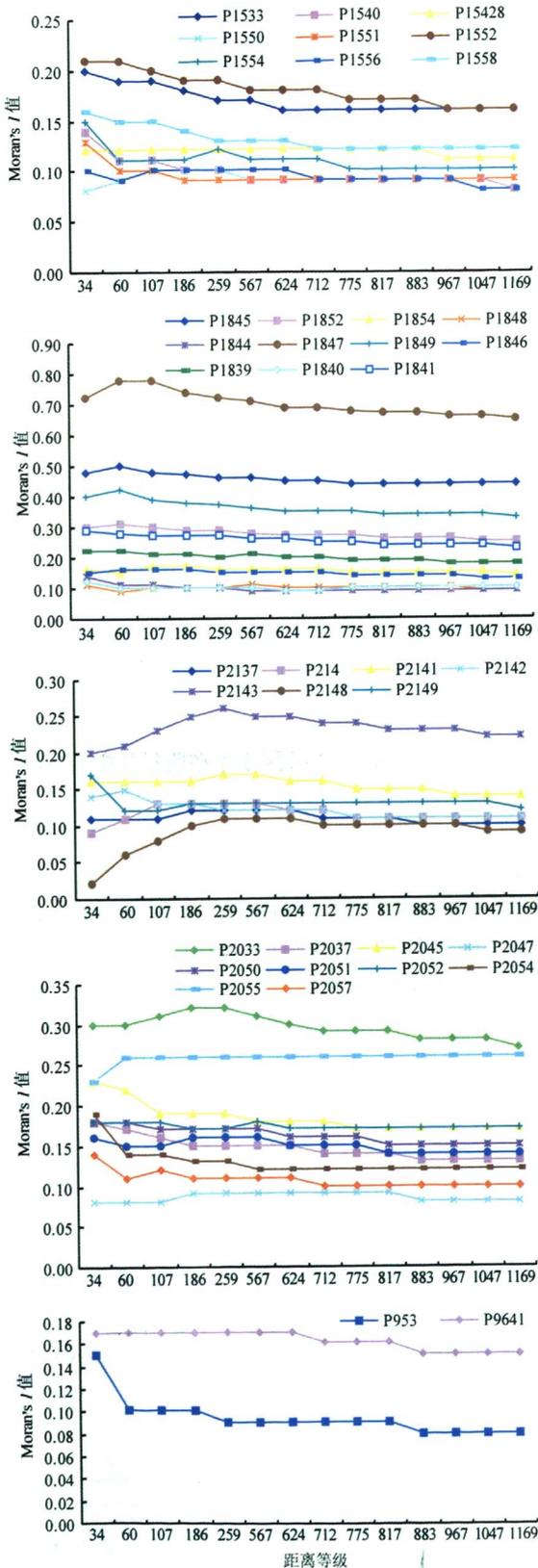


图2 Moran's I 值有统计学意义的等位基因在 14 个距离等级上的 Moran's I 值分布

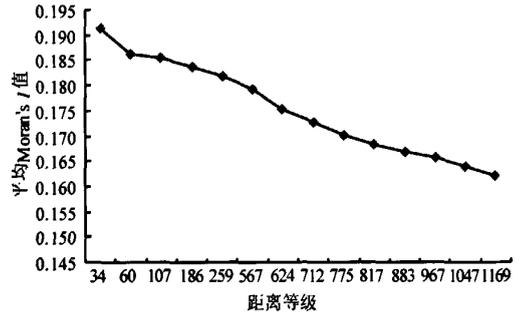


图3 各距离等级上的平均 Moran's I 值

讨 论

SSR 为数个核苷酸的串联重复序列,属于中等重复序列,在复制过程中和由于 DNA 滑移 (slippage) 和 DNA 修复系统共同作用下很容易发生长度变化,具有很高的多态性^[15]。此次研究发现湖北钉螺居群 SSR 的 PIC 值达到 0.965,平均每对引物扩增出的等位基因数高达 54 个,表现出非常丰富的居群遗传多态性,这一结果明显高于等位酶水平的遗传多样性^[16],同样也高于 AFLP 水平的遗传多样性^[11]。除多态性丰富外,SSR 作为分子标记还有共显性、稳定性好等优点^[10],在钉螺居群遗传学和空间结构研究中有着广阔的运用前景。

空间结构的形成主要取决于个体遗传物质传播距离的有限性和居群生境的异质性,生存环境间的相互隔离以及人为的环境改造形成了钉螺基因频率或基因型的初始分布,而钉螺的迁移能力十分有限^[17,18],个体只能选择就近交配,因此遗传物质的传播距离有限,基因无法在整个居群中自由流动,从而形成非随机分布的特定空间结构。此次研究发现钉螺居群在 14 个距离等级上存在一定程度的正空间自相关性:从距离等级看,除第一个距离等级 (34 m) 上表现为正空间自相关的等位基因比例少于 50% (48.6%),其他等级上该比例均超过 50%,最高比例达到 66.7%;从各等位基因看,用于空间自相关分析的 72 个等位基因有 39 个表现出空间正相关性。

进一步分析各距离等级上的平均 Moran's I 值发现正空间自相关性随着距离增加而减少。因此空间距离较近的钉螺遗传物质有更高的相似性,而随着距离增加空间自相关性逐渐减小。当距离增加到一定程度时,个体间将可能不存在空间自相关性或表现为负空间自相关性。这个临界距离既是钉螺个体的遗传物质可以影响的范围,也可以认为是斑块化钉螺生境的空间尺度大小^[5]。此次研究中未发现

该临界值,但发现随着距离增加, Moran's I 值曲线下下降的速率比较恒定,据此粗略估计该临界值可能在 7200 m 左右,这一距离与钉螺本身的迁移能力不符。导致这一现象的原因可能有:第一,在普格县钉螺主要分布在山区梯田(水田),海拔高度相差较大,当水流从地势较高处流向地势较低处时,钉螺也将随之迁移。有文献报道耕牛可以将牛蹄两趾间的钉螺携带至 1100 m 以外^[18],人和其他动物也可能以类似的方式增加钉螺地迁移范围。这些都在很大程度上扩大了钉螺遗传物质的传播范围。有研究表明,局部药物灭螺特别适合控制或消灭呈斑块化分布的钉螺^[19],但钉螺斑块化生境的直径较大,可能给灭螺增加了难度。第二,虽然钉螺居群 SSR 遗传变异的空间结构整体上呈现随距离增加而逐渐减弱的正空间自相关性,但是各等位基因的空间分布模式却并不完全相同:48.7%的等位基因表现出随距离增加逐渐减弱的正空间自相关性,这一类等位基因在钉螺居群中表现为簇状或散点状聚集性分布,基因流从聚集分布的中心向四周或某个方向扩散,影响一定范围内的钉螺,导致特有的空间分布模式;另外部分等位基因的正空间自相关性并没有随着距离增加减小,这类等位基因在个体间的相似性没有随着空间距离的增加而明显改变,由于这些平均 Moran's I 值是根据所有存在空间结构的等位基因计算的,因此这一部分等位基因减缓了平均 Moran's I 值随距离增加而减小的速率,可能使我们过高估计钉螺的播散范围。等位基因的空间自相关性不随着空间距离增加而改变,说明在各位置的钉螺中这些基因的有或无是基本一致的,因此这些基因可能和钉螺某些基本的生存能力有关,对这些基因进一步深入的分子生物学研究,可能为研制新型灭螺药物提供一种新途径。

由于钉螺遗传变异存在空间自相关性,在研究钉螺的遗传变异而进行采样时,就需要考虑样本之间的空间间隔。如果样本间的空间间隔过小,将使所采集样本的遗传物质具有一定程度的相似性,不能代表整个种群的遗传变异情况。例如进行全国范围大尺度的钉螺种群研究时,采样间隔应达到数千米;在小尺度的采样中,也应该保证各样本之间有一定的空间间隔,各样本尽量散布在整个采样区域内,这样可以避免因随机抽样导致的偏差从而降低样本中的遗传多样性,有利于以相同的样本量获取更多钉螺居群的遗传多样性。

参 考 文 献

- [1] Gredler V. Zur conchilen-fauna von China. Malakoz Ges, 1881, 18:110-132.
- [2] Schilhuizen M, Lombaerts M. Population structure and levels of gene flow in the Mediterranean land snail *Albinaria corrugata* (Pulmonata: Clausiliidae). *Evolution*, 1994, 48: 577.
- [3] Pfenniger M, Bahl A, Sterit B. Isolation by distance in a population of a small land snail *Trochoidea geyeri*: evidence from direct and indirect methods. *Proc R Soc B*, 1996, 263: 1211.
- [4] Heywood JS. Spatial-analysis of genetic-variation in plant-populations. *Annu Rev Ecol System*, 1991, 22:335-355.
- [5] 何田华,杨继,饶广远. 植物居群遗传变异的空间自相关分析. *植物学通报*, 1996, 16(6):636-641.
- [6] 张志杰,彭文祥,周艺彪,等. 湖沼地区湖北钉螺小尺度分布的空间自相关分析. *中国血吸虫病防治杂志*, 2007, 19(6): 418-423.
- [7] 周艺彪,赵根明,彭文祥,等. 湖北钉螺数量性状研究 III. 种群间形态性状变异及空间自相关分析. *中国血吸虫病防治杂志*, 2006, 18(4):241-246.
- [8] 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. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34(2): 207-212.
- [9] Dewey SE, Heywood JS. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. *Evolution*, 1988, 42, 834-838.
- [10] 郭俊涛,周艺彪,韦建国,等. 湖北钉螺微卫星锚定 PCR 产物序列分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(11):1094-1097.
- [11] 周艺彪,赵根明,韦建国,等. 湖北钉螺种群内 AFLP 分子标记遗传变异分析. *中国寄生虫病学与寄生虫病杂志*, 2006, 24(1): 27-34.
- [12] Geburek T. Are genes randomly distributed over space in mature populations of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh)? *Ann Botany*, 1993, 71:217-222.
- [13] Sokal RR, Oden NL. Spatial autocorrelation in biology. I. Methodology. *Biol J Linn Soc*, 1978, 10:199-228.
- [14] Sokal RR, Oden NL. Spatial autocorrelation in biology. II. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biol J Linn Soc*, 1978, 10:229-249.
- [15] 罗永文,胡骏,李晓方,等. 微卫星序列及其应用. *遗传*, 2003, 25(5):615-619.
- [16] Davis GM, Zhang Y, Guo YH, et al. Population genetics and systematic status of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsida) throughout China. *Malacologia*, 1995, 37(1): 133-156.
- [17] Denny M. Locomotion: the cost of Gastropod crawling. *Science*, 1980, 208:1288.
- [18] 毛守白. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治. 北京:人民卫生出版社, 1990:312-313.
- [19] Woolhouse MEJ. Population biology of the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* in the Zimbabwe highveld. *J Appl Ecol*, 1992(29):687.

(收稿日期:2008-10-27)

(本文编辑:张林东)