

# 小管福寿螺 SNP 标记开发及其在物种鉴定中的应用

林 英<sup>1</sup>, 肖 麒<sup>1</sup>, 林友福<sup>2</sup>, 李雪霞<sup>2</sup>, 殷文莉<sup>2</sup>, 李 宏<sup>1</sup>, 陈 炼<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(2. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037)

**[摘要]** 小管福寿螺(*Pomacea canaliculata*)是全球 100 种恶性外来入侵物种之一,对入侵地的经济和环境造成了严重危害。研究发现,入侵中国的福寿螺除小管福寿螺外,还包括斑点福寿螺(*P. maculata*)。本研究基于全基因组重测序数据开发单核苷酸多态性标记(single nucleotide polymorphism, SNP)用于福寿螺的遗传多样性分析及物种鉴定。利用 Sanger 测序法对开发的 22 个 SNP 位点在浙江丽水小管福寿螺群体中进行遗传多样性分析,结果表明观测杂合度和期望杂合度范围分别为 0~0.933 和 0.033~0.549,多态信息含量(PIC)范围为 0.032~0.466。通过计算上述位点在小管福寿螺和斑点福寿螺之间分化指数( $F_{st}$ )和等位基因频率,获得在两物种中存在明显差异的 5 个 SNP 位点用于物种鉴定。在 30 个小管福寿螺和 18 个斑点福寿螺样本中进行分型验证,结果表明,5 个 SNP 位点单独使用时物种鉴定准确率均较高(>84.21%),当联合使用 3~5 个位点时准确率可达到 100%。这些 SNP 位点将有助于福寿螺种群遗传学方面的研究以及小管福寿螺和斑点福寿螺高效、准确的物种鉴别。

**[关键词]** 小管福寿螺,斑点福寿螺,全基因组重测序,单核苷酸多态性位点,分子鉴定

**[中图分类号]** K826.15 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2021)03-0096-07

## Development of SNP Markers for *Pomacea canaliculata* and Application of Species Identification in *P. maculata*

Lin Ying<sup>1</sup>, Xiao Qi<sup>1</sup>, Lin Youfu<sup>2</sup>, Li Xuexia<sup>2</sup>, Yin Wenli<sup>2</sup>, Li Hong<sup>1</sup>, Chen Lian<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** *Pomacea canaliculata* is one of the 100 world's worst invasive alien species, which causes serious economic and environmental damage in the invaded areas. Both *P. canaliculata* and *P. maculata* invaded most southern provinces in China. In order to investigate the population genetic structure and diversity of these taxa, 22 single nucleotide polymorphism markers(SNP) were isolated from the whole genome sequencing data of *Pomacea* spp.. Polymorphisms of these SNPs were evaluated in *P. canaliculata* from Lishui City, Zhejiang Province. The results showed that the observed, expected heterozygosity and polymorphism information content per locus ranged from 0 to 0.933, 0.033 to 0.549, 0.032 to 0.466, respectively. Five SNPs were identified with the high  $F_{st}$  values and different allele frequency between *P. canaliculata* and *P. maculata*. Then these five diagnostic SNPs were genotyping in 30 samples of *P. canaliculata* and 18 samples of *P. maculata*. Species identification accuracy of single SNP locus was high (>84.21%) and the accuracy could reach 100% when three to five diagnostic SNPs were used simultaneously. Those polymorphic SNP markers will be helpful for population genetics study on *P. canaliculata* and efficient and accurate species identification of *P. canaliculata* and *P. maculata*.

**Key words:** *Pomacea canaliculata*, *P. maculata*, whole genome resequencing, SNPs, molecular identification

福寿螺属(*Pomacea*)隶属于腹足纲(Gastropoda)新进腹足目(Caeogastropoda)瓶螺科(Ampullariidae),是原产于南美洲亚马逊河流域的一类大型淡水螺<sup>[1]</sup>。因人类有意引种或无意传播,福寿螺属多个物种现已入侵到亚洲、北美、欧洲及大洋洲的许多国家和地区,成为严重的入侵性有害生物<sup>[2]</sup>。小管福寿螺(*Pomacea canaliculata*)和斑点福寿螺(*P. maculata*)是福寿螺属中常见且入侵性最强的两种物种<sup>[3]</sup>。其中,

收稿日期:2021-03-20.

基金项目:国家自然科学基金项目(31770402)、江苏省自然科学基金项目(BK20171407)。

通讯作者:陈炼,博士,副教授,研究方向:入侵生物学. E-mail:chenlian\_2004@163.com

小管福寿螺被国际自然保护联盟(IUCN)列为全球 100 种恶性外来物种之一<sup>[4]</sup>. 小管福寿螺自 20 世纪 80 年代初作为食物引入到我国以来,迅速定殖并扩展到很多地区,成为我国长江以南大部分省区的严重农业有害生物,并且呈现由南向北扩散的趋势<sup>[5]</sup>.

福寿螺属传统的分类方法主要依靠形态学特征<sup>[6]</sup>. 然而,福寿螺属物种形态相似,且具有较高的形态可塑性,难以实现物种的准确鉴定和鉴别<sup>[7]</sup>. 过去认为,引入中国的福寿螺属生物仅有小管福寿螺, Lv 等<sup>[8]</sup>利用线粒体 COI 基因序列对我国 54 个福寿螺地理种群进行系统发育关系分析,中国大陆地区的福寿螺种群结构复杂,可能有多来源和扩散模式,并且发现入侵中国的福寿螺除了有小管福寿螺和斑点福寿螺这两种之外,还存在一个中国特有的隐存种团(Cryptic groups). 近期研究基于线粒体 COI 基因序列的系统发生分析和形态学特征确定其为中国分布的第三种入侵性福寿螺(*P. occulta* nov. sp.)<sup>[9]</sup>.

虽然福寿螺种间形态相似,但其生物学、生态学特征以及原产地的地理分布不同,入侵能力和扩散趋势等方面存在差异<sup>[3]</sup>. 利用有效的鉴定方式对福寿螺进行准确的种类鉴别,对于控制其快速扩散、制定有效的防治措施具有重要意义. 现有研究大多利用基于线粒体 COI 基因和核基因 EF1 $\alpha$  的序列分析<sup>[10]</sup>或多重 PCR 扩增技术<sup>[11-12]</sup>来鉴别福寿螺种类. 然而,长片段扩增对于样本的质量要求较高,并且鉴定成本高. 此外,遗传多样性和种群结构是影响入侵种定殖的重要因素,利用分子标记进行种群遗传学研究有利于开展入侵物种的控制与管理<sup>[13]</sup>. SNP 标记作为第三代分子遗传标记,具有数量丰富、分布广泛、遗传稳定性高、二等位性、分析成本较低且 DNA 降解耐受性较高等特点<sup>[14-15]</sup>,近年来在群体遗传分析及动物个体、品种鉴定方面的研究应用较多. 本研究基于小管福寿螺和斑点福寿螺全基因组重测序数据,借助 Sanger 测序法验证开发多态性 SNP 位点,为后续群体遗传学研究的开展提供了工具. 同时,针对多态性位点根据其在小管福寿螺和斑点福寿螺间的遗传分化指数(*F<sub>st</sub>*)及基因频率信息,进一步筛选在两物种中存在明显区别的 SNP 位点,为两种福寿螺提供高效、便捷、准确的鉴定方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及物种鉴定

2019 年 3 月至 7 月共采集来自重庆(*N*=10)、四川成都(*N*=5)、浙江丽水(*N*=30)、江苏苏州(*N*=3)的 48 只野生福寿螺,螺长范围为 30 mm~45 mm.

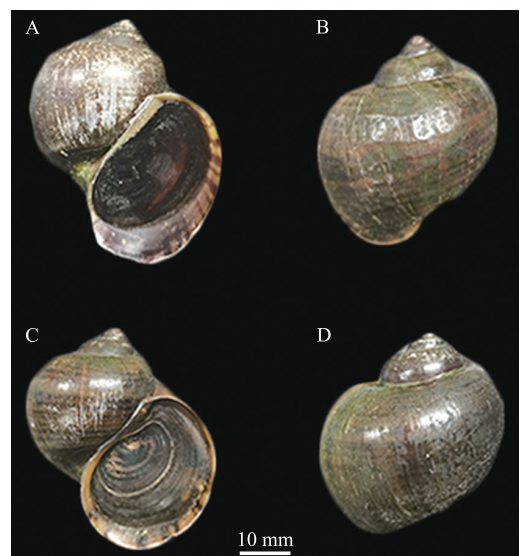
剪取福寿螺腹足肌提取基因组总 DNA, DNA 提取使用百奥莱博科技(北京)有限公司柱式动物 DNA 提取试剂盒(BTN101111),方法参照试剂盒的使用说明. 利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性.

由于福寿螺属物种如小管福寿螺和斑点福寿螺外部形态相似,难以区分,在螺壳形态鉴定基础上(图 1)结合线粒体 COI 基因序列进行物种鉴定<sup>[3,9]</sup>. 结果表明,本研究样本中包括 30 只小管福寿螺,均来自浙江丽水和 18 只斑点福寿螺,来自重庆、四川成都和江苏苏州.

### 1.2 SNP 位点筛选

本研究基于课题组前期已获得的 75 只小管福寿螺和 23 只斑点福寿螺全基因组重测序数据(数据未发表),将原始数据(raw data)去除接头序列和数据质控后,利用 BWA 软件<sup>[16]</sup>,将有效测序数据(clean data)比对小管福寿螺参考基因组(ASM307304v1)<sup>[17]</sup>,比对结果经 Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>)去除重复. 使用 GATK 4.0 软件<sup>[18]</sup>进行 SNP 检测分析,筛选测序深度不低于 7X、覆盖所有群体 95% 以上个体、次等位基因频率(MAF)不低于 0.05 的 SNP 位点用于 SNP 标记开发. 使用 ANNOVAR 软件<sup>[19]</sup>对 SNP 进行注释.

基于上述成功开发的多态性 SNP 位点,利用 VCFtools



A-B:小管福寿螺;C-D:斑点福寿螺

图 1 福寿螺的螺壳形态

Fig. 1 Shell morphology of *Pomacea* spp.

(v0.1.16 版本)<sup>[20]</sup> 软件进行  $F_{st}$  值的计算,同时基于重测序基因型数据,利用 GENEPOP 4.0.10 软件<sup>[21]</sup> 分别统计这些 SNP 位点在小管福寿螺和斑点福寿螺中的等位基因频率信息,挑选  $F_{st}$  值和等位基因频率在两种福寿螺间存在较大差异的 SNP 位点用于物种鉴定.

1.3 基于 Sanger 测序 SNP 验证

基于小管福寿螺基因组测序信息,将筛选的位点定位在基因组上,利用 TBtools 软件<sup>[22]</sup> 提取该 SNP 位点上下游各 200 bp 碱基序列,利用 Primer Premier 5.0 软件<sup>[23]</sup> 进行引物设计. 随机选取 4 个小管福寿螺样本,进行 PCR 扩增,利用 Sanger 测序验证 SNP 位点是否存在双峰,若扩增产物出现不同峰值,即认为该位点在群体内存在多态性. PCR 反应体系为 20  $\mu$ L:10  $\mu$ L Premix Taq,引物各 1  $\mu$ L,1  $\mu$ L DNA 和 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O;反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,合适的退火温度下 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,28 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 针对存在双峰的位点,用相同的 PCR 条件,对剩下的福寿螺样本进行扩增测序. 引物合成和测序均由上海迈浦生物科技有限公司完成.

1.4 数据分析

将测序得到的序列用 MEGA X 软件<sup>[24]</sup> 分析基因序列的 SNP 位点,对比测序后的数据峰图,找到峰值图中对应 MEGA X 序列里观察到的 SNP 位点,二倍体纯合位点记为两个相同的碱基,显示为单峰图;而杂合位点则记为两个不同的碱基,显示为套峰,进行基因型统计. 使用 Cervus 3.0 软件<sup>[25]</sup> 计算 SNP 位点的观测杂合度(observed heterozygosities,  $H_o$ ),期望杂合度(expected heterozygosities,  $H_e$ )和多态信息含量(poly-morphism information content,  $PIC$ ). 使用 GENEPOP 4.0.10 软件进行位点间的连锁不平衡(linkage disequilibrium)检验和哈迪温伯格平衡偏离检验(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE).

针对筛选得到的用于小管福寿螺和斑点福寿螺物种鉴定的 SNP 位点,依据这些 SNP 位点在重测序数据中得到的基因频率信息(表 1),以及 48 个福寿螺样本进行 Sanger 测序得到的基因型信息,对这 48 个个体进行物种鉴定,验证这些 SNP 位点用于物种鉴定的准确性. 具体分析方法参考程方圆等<sup>[26]</sup> 和 Jiang 等<sup>[27]</sup> 的研究:如果使用一个 SNP 位点,以 SNP4 为例(表 1),某样本测序结果为 TT,计算该 SNP 位点小管福寿螺 T 基因频率(0.133)的乘积,以及斑点福寿螺该 SNP 位点 T 基因频率(0.935)的乘积,如果小管福寿螺的乘积高于斑点福寿螺,则支持此样本为小管福寿螺,反之,则为斑点福寿螺. 如果使用 2 个及以上 SNP 位点,先按上述单个 SNP 标记方法分别独立计算,再将每个 SNP 位点得到的数值依次相乘获得综合判定数值,如果小管福寿螺的综合判定数值高,则支持此样本为小管福寿螺,反之,则为斑点福寿螺.

表 1 5 个用于物种鉴定的 SNP 分子标记基因频率  
Table 1 Gene frequency of 5 diagnostic SNP markers

SNP 位点	小管福寿螺 ( $N=75$ )					斑点福寿螺 ( $N=23$ )					两种福寿螺相应 等位基因频率差异
	基因型 & 频率			等位基因 & 频率		基因型 & 频率			等位基因 & 频率		
SNP4	CC	CT	TT	C	T	CC	CT	TT	C	T	0.802
	0.813	0.107	0.080	0.867	0.133	0	0.130	0.870	0.065	0.935	
SNP7	TT	TG	GG	T	G	TT	TG	GG	T	G	0.823
	0.800	0.133	0.067	0.867	0.133	0.043	0	0.957	0.044	0.957	
SNP8	TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC	T	C	0.815
	0.813	0.133	0.053	0.880	0.120	0.043	0.043	0.913	0.065	0.935	
SNP11	CC	CT	TT	C	T	CC	CT	TT	C	T	0.763
	0.827	0.133	0.040	0.893	0.107	0.087	0.087	0.826	0.130	0.870	
SNP13	GG	GA	AA	G	A	GG	GA	AA	G	A	0.832
	0.027	0.240	0.733	0.147	0.853	0.957	0.043	0	0.978	0.022	

利用单个(或多个)SNP 位点得到的某个物种鉴定结果与实际物种鉴定结果一致时,记录判断正确次数 1 次. 基于单个 SNP 位点以及多个位点对 48 个个体进行判断,分别统计判断正确次数,计算验证准确率. 计算公式如下: $R=N_{\text{correct}}/N_{\text{all}}\times 100\%$ ,式中: $R$  为验证准确率即判断正确次数占总次数的比值; $N_{\text{correct}}$  为判断正确的次数; $N_{\text{all}}$  为判断总次数<sup>[26]</sup>.

2 结果与讨论

2.1 SNP 标记的鉴定和筛选

通过与小管福寿螺参考基因组序列比较,在小管福寿螺和斑点福寿螺全基因组范围内共检测到的



SNP 数量为 27 950 000 个,通过进一步过滤得到 46 693 个高质量 SNP 位点,其中碱基转换(transition)占 55.56%,高于碱基颠换(transversion)44.44%。位于 3'-非编码区、5'-非编码区、基因上游、基因下游、基因间区、剪切位点和内含子的 SNP 数量分别为 2 593、1 088、3 392、3 007、13 454、6 和 24 146 个,位于外显子的 SNP 数量为 2423 个(5%),随机选取 34 个 SNP 位点设计引物。

2.2 SNP 分型

在 34 对引物中,有 30 对引物成功扩增出 DNA 片段。以位点 SNP11 为例,测序结果如图 2 所示,峰图清晰规则,无杂峰,目标位点在不同样本中单峰(纯合)或套峰(杂合)明显,即 SNP11 为潜在的 SNP 位点,在 4 个福寿螺 DNA 样品的扩增测序中,共筛选到 22 个潜在的 SNP 位点(表 2),准确率为 64.70%。Yang 等<sup>[28]</sup>基于广东鲂(*Megalobrama terminalis*)简化基因组测序数据开发并验证了 30 个 SNP 位点,准确率为 83%;有研究对大西洋鳕(*Gadus morhua*)的全基因组进行测序并开发和验证 SNP,其准确率为 74.60%<sup>[29]</sup>。SNP 标记开发的准确率可能与不同的测序方法、质量及深度有关<sup>[30]</sup>。

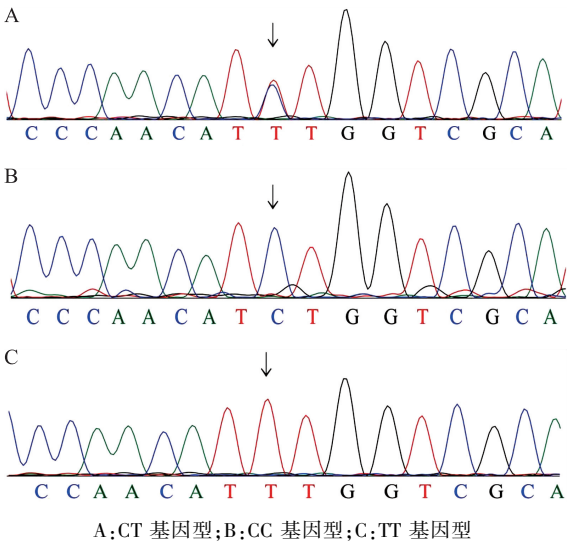


图 2 位点 SNP11 分型结果  
Fig. 2 The results of genotyping in SNP11

表 2 小管福寿螺 22 个 SNP 位点信息

Table 2 Genetic information for 22 SNPs in *Pomacea canaliculata*

SNP 位点	类型	引物序列(5'→3')	退火温度 $T_m/^{\circ}\text{C}$	片段大小/bp	$N_a$	$H_o$	$H_e$	$PIC$
SNP1	C/G	F: TGGTAGTGGTGGTGGTGGT R: GAATATCCGATCCGAAAGCAGC	58	276	2	0.233	0.413	0.324
SNP2	A/C	F: GTTTGCTACATTTTACTCCCGAAAG R: GAGAGTGAACCTGACCTACCTGGC	55	221	2	0.200	0.549	0.466
SNP3	C/A	F: CAGATGATAGTTCTATCACTGCAC R: CAGCCTGTTGCTATTATCTTCCT	55	147	2	0.100	0.097	0.090
SNP4	C/T	F: CCCAAATGCAAATTCTCTCCCA R: CTGTGATAAGCCACCTTCAAGTAAAG	55	194	2	0.100	0.097	0.090
SNP5	T/G	F: AGAAATGCCCAGACCTACAATG R: AATACTCAACCCGAAAATCCAGTT	55	175	2	0.033	0.033	0.032
SNP6	A/G	F: TGTATGTCAGTATGCTTTTCAGTTCC R: GCTGCTCTGGCTGTTTCTGTCT	55	295	2	0.033	0.033	0.032
SNP7	T/G	F: AATGTTGATGATGACAAGACTGGTTC R: ATAGTGGAGGTGGCAAGGTGTG	55	178	2	0.100	0.097	0.090
SNP8	T/C	F: GGTCCAGTAGTACAACGGTTAGTGC R: CCACTTTACAGTAGGCTCAATGTGTT	55	284	2	0.100	0.097	0.090
SNP9	C/G	F: CAGTGTAATCCAGTTGCCGAATA R: TGATAAAATGCCAGTTGATAGAA	55	142	2	0.167	0.155	0.141
SNP10	G/T	F: CGTCATCGTGAACATCATAGTACAGA R: ACAGGATGGAGTACTGCGGTT	55	180	2	0.367	0.345	0.282
SNP11	C/T	F: ACAAGATCACGTGTTTACGGATAGG R: AAGACGAGAACCATAACCGCAC	55	184	2	0.167	0.305	0.255
SNP12	C/G	F: CAAAACCTTAGATTCTTCTCAGACT R: ATGCTGCTCCATCACCATTCTC	55	210	2	0.267	0.452	0.346
SNP13	G/A	F: ACGCTCTGATAACAAATGGTAGATAG R: ACCTTCCGCATCTTCAGCCTCT	55	283	2	0.300	0.381	0.305
SNP14	A/G	F: TGGTCATCTAAGGTAACAGGTCT R: TTATGGCAACAAAGACACGCAG	55	128	2	0.267	0.508	0.375
SNP15	G/A	F: CAAACAAAGATGAAATGAACAGTACA R: CAGATGGACAGGCAGAAAGAGG	55	303	2	0.300	0.440	0.339
SNP16	A/G	F: CTTTGGTCTGCTTAGTGCCATAG R: GATTCGCTTGTTCCTGTGTT	55	239	2	0.933	0.506	0.374
SNP17*	A/T	F: CTCCACCACCATCTCCAT R: TCTTACAATATCCTCGGCTC	58	277	2	0.033	0.305	0.255

续表 2 Table 2 continued

SNP 位点	类型	引物序列(5'→3')	退火温度 $T_m/^{\circ}\text{C}$	片段大小/bp	$N_a$	$H_o$	$H_e$	$PIC$
SNP18*	A/T	F:TCCTGACCCTGACCTATTT R:CACGCTCATTGACAACG	58	297	2	0.200	0.499	0.371
SNP19	C/G	F:AAGGCATGAAGATAAGTGGG R:CTGCGATGGAGTTTGTGAAGAT	58	478	2	0.067	0.066	0.062
SNP20*	G/A	F:CCCATCAGAACTGGCACA R:GCTTCAGATACCTGGACGA	58	433	2	0.000	0.364	0.294
SNP21	T/A	F:GCAGGGAAGACAATCAAGTAAAGA R:TTAGGATAACGAGCAAGCAAAGA	55	246	2	0.367	0.440	0.339
SNP22*	A/G	F:TGGATTTAGGGACAACGACTGC R:AAAAGTAAGACAAGGAGACGATGTTC	55	260	2	0.133	0.364	0.294

注: $N_a$ :等位基因数; $H_o$ :观测杂合度; $H_e$ :期望杂合度; $PIC$ :多态信息含量;“\*”表示偏离哈迪温伯格平衡。

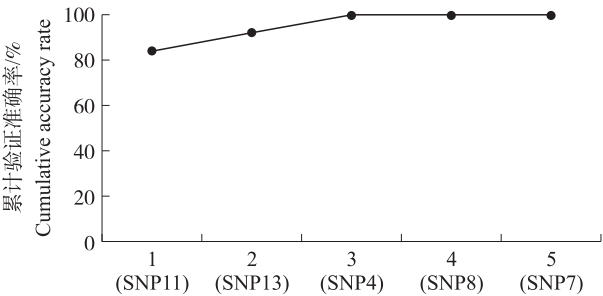
通过计算上述 22 个 SNP 位点在小管福寿螺和斑点福寿螺间的  $F_{st}$  值,发现有 5 个 SNP 位点  $F_{st}$  值位于前 1%,且等位基因频率信息在两种福寿螺间有明显差异(表 1).小管福寿螺各位点等位基因频率差值在 0.706~0.786,平均值为 0.744,而该差值在斑点福寿螺数据中较大,为 0.740~0.956,平均值为 0.870.两种福寿螺各位点等位基因频率差值在 0.763~0.832,平均值为 0.807,说明这些标记具有较高的鉴别能力(表 1).Jiang 等<sup>[27]</sup>基于前人研究的二代测序数据利用 Snapshot 分型方法开发了 12 个 SNP 位点用于鉴别蒙古狼(*Canis lupus*)和家犬(*C. l. familiaris*),各位点在两物种中等位基因频率差值在 0.640~0.889,平均值为 0.797,具有良好的鉴别能力.

2.3 SNP 位点多态性分析

对上述 22 个 SNP 位点在 30 个小管福寿螺样本中进行多态性分析,结果如表 2 所示,22 个 SNP 位点的平均等位基因数为 2,观测杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )范围分别为 0~0.933 和 0.033~0.549,多态信息含量( $PIC$ )范围为 0.032~0.466.  $PIC$  值是衡量 DNA 座位变异程度高低的重要指标<sup>[31]</sup>.根据 Botstein 等<sup>[32]</sup>划分的原则, $PIC<0.25$  为低度多态性, $0.25<PIC<0.50$  为中度多态性, $PIC>0.50$  为高度多态性.本研究开发的 22 个 SNP 位点中有 14 个位点表现为中度多态性,说明这些 SNP 位点在小管福寿螺遗传多样性研究中能提供较为有效的遗传信息.经 Boferroni 校正后,22 个位点中仅有 4 个位点(SNP17、SNP18、SNP20、SNP22)偏离哈迪温伯格平衡,部分位点之间(SNP11 和 SNP22、SNP15 和 SNP18、SNP17 和 SNP20、SNP2 和 SNP15 以及 SNP2 和 SNP18)存在连锁不平衡现象.本研究中筛选的这些 SNP 位点能应用于福寿螺的种群遗传学研究.

2.4 物种鉴定 SNP 位点验证

尽管基因组中拥有数以百万计的 SNP 位点,但使用更多的 SNP 位点并不代表会达到更高的分辨率. SNP 是基于等位基因频率的标记,它们在物种水平上的分辨率取决于物种之间等位基因频率的差异<sup>[27]</sup>.基于 5 个物种鉴定 SNP 位点在小管福寿螺和斑点福寿螺中的等位基因频率信息,对 48 个福寿螺样本进行物种鉴别验证,结果表明当 5 个 SNP 位点分别单独使用时,判别准确率为 94.74%(SNP4)、97.37%(SNP7)、94.74%(SNP8)、84.21%(SNP11)和 92.10%(SNP13).当同时使用多个 SNP 位点时,判别准确率结果如图 3 所示,同时使用前 3 个位点 SNP11、SNP13 和 SNP4 时准确率即可达到 100%.Lapègue 等<sup>[33]</sup>利用高通量测序数据,在入侵物种长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)中成功筛选出具有较大  $F_{st}$  值和等位基因频率差异的 15 个 SNP 位点用于两个物种的准确鉴定.本研究中使用较少的 SNP 位点可以达到 100%的分辨率.



横坐标:分子标记个数,括号内为依次增加的 SNP 标记;  
纵坐标:分子标记累计验证准确率.

图 3 分子标记和累计验证准确率

Fig. 3 SNP markers and cumulative accuracy rate

### 3 结论

本研究首次基于福寿螺重测序数据,成功开发 22 个多态性 SNP 标记,可用于小管福寿螺群体遗传多样性、遗传结构等相关研究,且进一步筛选 5 个 SNP 位点用于入侵中国的小管福寿螺和斑点福寿螺物种鉴定,通过 Sanger 测序法在 48 个福寿螺样本中进行分型验证,结果表明,物种鉴定准确率较高(>84.21%),当同时使用 3~5 个 SNP 位点时准确率可达到 100%。为小管福寿螺和斑点福寿螺准确的种类鉴别提供了有效的工具,对于控制其快速扩散、制定有效的防控措施具有重要意义。

### [参考文献]

- [1] COWIE R H. Apple snails( Ampullariidae) as agricultural pests; their biology, impacts and management[ M]//BAKER G M. Molluscs as crop pests. CABI Publishing, NY, 2002.
- [2] DE BRITO F C, JOSHI R C. The golden apple snail *Pomacea canaliculata*: a review on invasion, dispersion and control[ J]. Outlooks on pest management, 2016, 27( 4) : 157–163.
- [3] HAYES K A, COWIE R H, THIENGO S C, et al. Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae( Caenogastropoda) [ J]. Zoological journal of the linnean society, 2012, 166( 4) : 723–753.
- [4] LOWE S, BROWNE M, BOUDJELAS S, et al. 100 of the world's worst invasive alien species[ R]//A selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group, Auckland, New Zealand, 2000.
- [5] 郭靖, 章家恩. 福寿螺入侵机制的研究进展[ J]. 生态学杂志, 2014, 33( 3) : 806–815.
- [6] HAYES K A, BURKS R L, CASTRO V A, et al. Insights from an integrated view of the biology of apple snails( Caenogastropoda: Ampullariidae) [ J]. Malacologia, 2015, 58( 1–2) : 245–302.
- [7] ESTEBENET A L, MARTIN P R. Shell interpopulation variation and its origin in *pomacea canaliculata*( Caenogastropoda: Ampullariidae) from southern pampas, argentina[ J]. Journal of molluscan studies, 2003, 69( 4) : 301–310.
- [8] LV S, ZHANG Y, LIU H X, et al. Phylogenetic evidence for multiple and secondary introductions of invasive snails: *Pomacea* species in the People's Republic of China[ J]. Diversity and distributions, 2013, 19( 2) : 147–156.
- [9] YANG Q Q, YU X P. A new species of apple snail in the genus *Pomacea*( Gastropoda: Caenogastropoda: Ampullariidae) [ J]. Zoological studies, 2019, 58: 13.
- [10] YANG Q, LIU S, HE C, et al. Invisible apple snail invasions: importance of continued vigilance and rigorous taxonomic assessments[ J]. Pest management science, 2019, 75( 5) : 1277–1286.
- [11] YANG Q Q, HE C, LIU G F, et al. Introgressive hybridization between two non-native apple snails in China: widespread hybridization and homogenization in egg morphology[ J]. Pest management science, 2020, 76( 12) : 4231–4239.
- [12] 贺超, 杨倩倩, 刘苏汶, 等. 我国外来入侵生物福寿螺种类的多重 PCR 鉴别方法[ J]. 植物保护学报, 2019, 46( 1) : 97–105.
- [13] ZHAO S Y, SUN S G, DAI C, et al. Genetic variation and structure in native and invasive *Solidago canadensis* populations[ J]. Weed research, 2015, 55: 163–172.
- [14] CABEZAS J A, IBÁÑEZ J, LIJAVETZKY D, et al. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification[ J]. BMC plant biology, 2011, 11( 1) : 153.
- [15] CAMPBELL N R, NARUM S R. Quantitative PCR assessment of microsatellite and SNP genotyping with variable quality DNA extracts[ J]. Conservation genetics, 2009, 10( 3) : 779–784.
- [16] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[ J]. Bioinformatics ( Oxford, England) , 2009, 25( 14) : 1754–1760.
- [17] LIU C, ZHANG Y, REN Y, et al. The genome of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* provides insight into stress tolerance and invasive adaptation[ J]. GigaScience, 2018, 7( 9) : giy101.
- [18] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[ J]. Cold spring harbor laboratory press, 2010, 20( 9) : 1297–1303.
- [19] WANG K, LI M, HAKONARSON H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data[ J]. Narnia, 2010, 38( 16) : e164.
- [20] DANECEK P, AUTON A, ABECASIS G, et al. The variant call format and VCFtools[ J]. Bioinformatics, 2011, 27( 15) : 2156–2158.
- [21] RAYMOND M, ROUSSET F. An exact test for population differentiation[ J]. Evolution, 1995, 49( 6) : 1280–1283.
- [22] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[ J]. Molecular plant, 2020, 13( 8) : 1194–1202.

- [23] LALITHA S. Primer premier 5[J]. Biotech software and internet report,2000,1(6):270-272.
- [24] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular biology and evolution,2018,35(6):1547-1549.
- [25] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular ecology,2007,16(5):1099-1106.
- [26] 程方圆,陶紫玉,李晨虹. 应用单核苷酸多态性(SNP)标记鉴定短颌鲚、湖鲚和刀鲚[J]. 上海海洋大学学报,2019,28(1):10-19.
- [27] JIANG H H, LI B, MA Y, et al. Forensic validation of a panel of 12 SNPs for identification of Mongolian wolf and dog[J]. Scientific reports,2020,10(1):13249.
- [28] YANG J, LI X, LI Y, et al. Isolation and characterization of 30 SNP markers in Guangdong bream(*Megalobrama terminalis*) by next-generation sequencing[J]. Conservation genetics resources,2020,12:399-402.
- [29] HUBERT S, HIGGINS B, BORZA T, et al. Development of a SNP resource and a genetic linkage map for Atlantic cod(*Gadus morhua*)[J]. BMC genomics,2010,11:191.
- [30] 孙雪,李胜杰,姜鹏,等. 利用RNA-Seq技术开发草鱼生长性状相关基因和SNP标记[J]. 水产学报,2021,45(3):333-344.
- [31] 宋伟,王风格,田红丽,等. 利用核心SNP位点鉴别玉米自交系的研究[J]. 玉米科学,2013,21(4):28-32.
- [32] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American journal of human genetics,1980,32(3):314-331.
- [33] LAPÈGUE S, HEURTEBISE S, CORNETTE F, et al. Genetic characterization of cupped oyster resources in europe using informative single nucleotide polymorphism(SNP)panels[J]. Genes,2020,11(4):451.

[责任编辑:黄敏]

(上接第95页)

- [11] REAGAN S S, AHMAD N. RNA interference-mediated depletion of phosphoinositide 3-kinase activates forkhead box class O transcription factors and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cells[J]. Cancer research,2006,66(2):1062-1069.
- [12] FARHAN M, WANG H, GAUR U, et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. International journal of biological sciences,2017,13(7):815-827.
- [13] FABRE S, LANG V, BISMUTH G. PI3-kinase and the control of T cell growth and proliferation by FoxOs[J]. Bulletin du cancer,2006,93(5):E36-38.
- [14] MARK D M L. Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes[J]. Nature genetics,2015,47(2):106-114.
- [15] JACQUES L. hCAP-D3 expression marks a prostate cancer subtype with favorable clinical behavior and androgen signaling signature[J]. The American journal of surgical pathology,2008,32(2):205-209.
- [16] CHEN H, ZHOU L, WU X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Frontiers in bioscience (Landmark Ed),2016,21:1084-1091.
- [17] MATSUZAKI H, LEE S, MAEDA M, et al. FoxO1 regulates apoptosis induced by asbestos in the MT-2 human T-cell line[J]. Journal of immunotoxicology,2016,13(5):620-627.
- [18] FASANO C, DISCIGLIO V, BERTORA S. FOXO3a from the nucleus to the mitochondria: a round trip in cellular stress response[J]. Cells,2019,8(9):1110.
- [19] PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. Frontiers oncology,2014,4:64.
- [20] CHEN H, ZHOU L, WU X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Frontiers in bioscience (Landmark Ed),2016,21:1084-1091.
- [21] PUSSILA M, TÖRÖNEN P, EINARSDOTTIR E, et al. Mlh1 deficiency in normal mouse colon mucosa associates with chromosomally unstable colon cancer[J]. Carcinogenesis,2018,39(6):788-797.
- [22] DAWKINS J B, WANG J, MANIATI E, et al. Reduced expression of histone methyltransferases KMT2C and KMT2D correlates with improved outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer research,2016,76(16):4861-4871.

[责任编辑:黄敏]