

李海,刘巧红,唐雪颖,等. 我国近岸多室草苔虫(*Bugula neritina*)的群体遗传分化研究[J]. 海洋学报,2017,39(10):90—100, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2017.10.008

Li Hai, Liu Qiaohong, Tang Xueying, et al. Population genetic variation study of *Bugula neritina* in coastal waters of China[J]. *Haiyang Xuebao*, 2017, 39(10): 90—100, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2017.10.008

# 我国近岸多室草苔虫(*Bugula neritina*)的群体遗传分化研究

李海<sup>1,2</sup>, 刘巧红<sup>2</sup>, 唐雪颖<sup>2</sup>, 陈武个<sup>3</sup>, 丁少雄<sup>2\*</sup>

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物与生态实验室,福建 厦门 361005;2. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心,福建 厦门 361102;3. 厦门海洋职业技术学院,福建 厦门 361012)

**摘要:** 基于线粒体控制区序列和 SLAF-seq, 对重要药源生物多室草苔虫的群体遗传分化水平开展了研究。控制区序列中检测到 8 个单倍型, 单倍型多样性( $h$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )分别为 0.130 7 和 0.000 7, 单倍型网络图和 NJ 系统进化树的结构都较简单, 无明显拓扑结构。中性检验和核苷酸不配对分析结果均表明多室草苔虫未经历过大规模群体扩张。 $F_{st}$  和 AMOVA 分析显示遗传变异主要来自于群体内。SLAF 建库共开发得到 214 409 个 SLAF 标签, 其中多态性 SLAF 标签 23 437 个, 共开发出 99 432 个 SNP 位点。群体间的遗传距离较小, 且低于群体内的遗传距离。基于 SNP 所做的系统发育树和群体遗传结构分析表明, 各群体之间没有显著的遗传结构。综上所述, 我国沿海多室草苔虫的遗传多样性水平较低, 不同地理群体之间不存在显著的遗传结构。多室草苔虫较强的扩散能力是造成上述结果的主要原因。另外, 本研究还验证和讨论了 SLAF-seq 应用在海洋生物群体遗传分化研究中的可行性和优势。

**关键词:** 多室草苔虫; 群体遗传分化; 线粒体 DNA; SLAF-seq; 简化基因组

中图分类号:Q953<sup>+</sup>.1

文献标志码:A

文章编号:0253-4193(2017)10-0090-11

## 1 引言

多室草苔虫(*Bugula neritina*), 又称总合草苔虫, 隶属于苔藓动物门(Bryozoa), 裸唇纲(Cymndemata), 唇口目(Cheilostomida), 草苔虫科(Bugulidae), 草苔虫属(*Bugula*), 系环热带广布种, 广泛地分布于世界各地的中低纬海域<sup>[1]</sup>。在中国范围内的表层水体中, 多室草苔虫只分布于东海和南海等南方海区<sup>[2]</sup>。作为一类常见的污损苔虫, 多室草苔虫经常附着于船底、浮标、石油平台等人造水下设施以及养殖

网箱、定置渔网等水产养殖设施上。

多室草苔虫还是一种重要的海洋药源生物。到目前为止, 国内外学者一共从多室草苔虫中成功分离到 22 个抗癌活性成分<sup>[3—5]</sup>。草苔虫内酯 bryostatin 系列成分, 具有抗肿瘤和免疫调节作用<sup>[6]</sup>, 其中, bryostatin 1 对于阿尔茨海默症和许多癌症更有着显著的疗效, 是草苔虫内酯中最有希望成药的抗癌药物来源<sup>[7—11]</sup>。目前, 该活性成分已经被美国食品与药品管理局批准进入临床Ⅱ期试验<sup>[12]</sup>。然而, bryostatin 1 只在美国的东太平洋沿岸等海域生长的多室草苔虫

收稿日期:2017-02-28; 修订日期:2017-06-15。

基金项目:国家海洋局公益性项目“几种重要海洋药用生物种质资源发掘、保藏和利用——重要海洋药用生物优良种质评价和筛选”(201205024-2)。

作者简介:李海(1988—),男,江西省萍乡市人,博士,主要从事海洋生物遗传多样性与进化研究。E-mail:lihai@tio.org.cn

\*通信作者:丁少雄,教授,主要从事海洋生物资源保护与利用研究。E-mail:sxding@xmu.edu.cn

中发现<sup>[4]</sup>,从中国沿海生长的多室草苔虫中却一直未能成功分离。类似的由于多室草苔虫生长地点的地域性差别而造成活性产物不同的现象在世界其他地方也同样存在<sup>[4-13]</sup>,在中国范围内,从生长于不同地方的多室草苔虫中提取得到的草苔虫内酯亦存在一定差异<sup>[4]</sup>,但其影响因素是来源于内在的遗传差异还是外在的环境因子目前尚不得知。而关于这种重要药源生物的生物地理学和群体遗传学的研究至今仍少有报道。因此,开展中国沿海多室草苔虫的群体遗传分化研究不仅可为类似污损生物的扩散方式研究提供借鉴,亦可为该重要药源生物的种质资源保护及其活性产物研发提供必要参考。

线粒体 DNA(mtDNA)已被众多学者证实其在海洋生物群体遗传学研究中的适用性<sup>[14-17]</sup>。而 SLAF-seq 作为一种基于限制性酶切的简化基因组新技术,目前已经广泛应用在全基因组关联分析(GWAS)、遗传图谱构建及 QTL 定位、群体遗传进化分析和基因组选择等领域<sup>[18-21]</sup>。本研究同时采用线粒体 DNA 控制区(D-loop)片段和 SLAF-seq 技术对中国沿海多室草苔虫的群体遗传分化开展研究,研究结果对深入了解这种重要药源生物在我国的资源状况及种群分化具有重要意义。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品采集与 DNA 提取

根据中国多室草苔虫的分布范围及可能存在的地理阻隔特征,本研究采集了 4 个地理群体共 104 个个体(表 1),分别来自于三亚(SY)、深圳(SZ)、厦门(XM)和温州(WZ)(图 1)。所有个体都根据《中国海洋污损苔虫生物学》一书中的分类检索表进行鉴定。样品用无菌海水清洗 3 次后,置于 95% 的乙醇中固定,−20℃保存。

DNA 的提取参考孙名安等<sup>[22]</sup>关于苔藓动物基因组 DNA 的提取方法。提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测合格后于−20℃保存备用。

### 2.2 线粒体 DNA 控制区片段克隆和遗传多样性分析

根据 GenBank 上的多室草苔虫线粒体全基因组序列(序列号:NC\_010197),利用 Primer Premier 5 软件设计扩增 D-loop 片段的引物。引物 F-bncn 序列为 5'-CTAATTCTCACCCTTATTC-3',引物 R-bncn 序列为 5'-GTTGGTTGGCTGACACTT-3'。

PCR 的反应体系为 25 μL,其中包括 10× 反应缓

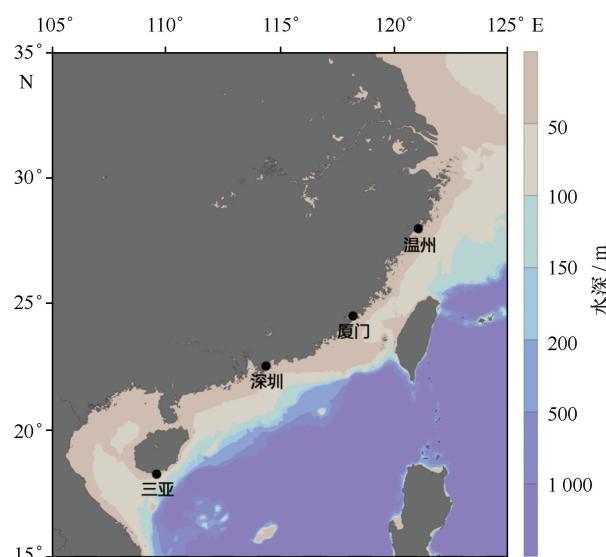


图 1 多室草苔虫采样地点示意图

Fig.1 Sampling localities of *B. neritina*

冲液(Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL,引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,  
*Taq* 酶(2.5 U/μL)0.2 μL,DNA 模板(100 ng/μL)  
 1 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL,ddH<sub>2</sub>O 18.3 μL。  
 PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,  
 53℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,共 30 个循环;72℃延伸  
 10 min。PCR 产物使用 TaKaRa DNA Fragment Purification kit 纯化后进行凝胶电泳检测,扩增结果良好的样品送至北京六合华大基因科技股份公司进行测序。

测序结果使用 Sequencher 4.1.4 软件进行比对和校正,使用 DnaSP 5.0 软件<sup>[23]</sup>统计单倍型数目,并计算单倍型多样性和核苷酸多样性。使用 Network 5.0.0.0 软件构建单倍型网络图。采用 Tajima's *D* 和 Fu's *Fs* 中性检验以及核苷酸不配对分布来检测多室草苔虫群体的历史动态。

### 2.3 SLAF-seq 简化基因组测序

#### 2.3.1 酶切建库

选取紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)基因组作为参考基因组进行酶切预测。根据最优酶切方案,从三亚(SY)、深圳(SZ)、厦门(XM)和温州(WZ)群体中各随机选取 12 个样品对其基因组 DNA 进行酶切,对得到的 SLAF 标签 3' 端进行加 A 处理,连接 Dual-index 测序接头后 PCR 扩增,纯化,产物混样处理后切胶回收目的大小片段的产物。

#### 2.3.2 高通量测序及测序片段质量检验和分析

文库构建成功质检合格后用 Illumina HiSeq

2500 进行测序。选取拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)参与酶切和测序作为对照。利用 Dual-index 对测序得到的原始数据进行识别, 得到各个样品的 reads。过滤掉测序 reads 的接头后, 对其进行 GC 含量和 Q30 分析, 以评估测序质量和数据量。通过对照的数据评估选取的酶切方案的酶切效率, 判断实验的准确性和有效性。

### 2.3.3 SLAF 标签的获得和全基因组范围 SNP 标记的开发

根据序列相似度对各个样品的 reads 进行聚类, 聚类到一起的 reads 来源于同一个 SLAF 标签, 同一个 SLAF 标签在不同样品间的序列相似度要远高于不同 SLAF 标签间的相似度。一个 SLAF 标签在不同样品间有差异即可定义为多态性 SLAF 标签。根据具有多态性的 SLAF 标签寻找 SNP 位点。

## 2.4 群体遗传结构分析

基于线粒体 DNA 控制区片段的测序结果, 使用 MEGA 5.0 软件<sup>[24]</sup>计算群体内和群体间基于 Kimura 2-parameter 的遗传距离, 并采用邻接法构建单倍型的系统进化树, 设定重复抽样 1 000 次以检验单倍型关系树各分枝的置信度。使用 Arlequin 3.5.1.2 软件<sup>[25]</sup>中的分子方差分析(AMOVA)估算遗传变异的分布和固定系数  $F_{st}$ , 1 000 次随机重复抽样后进行显著性检验。

从 SLAF-seq 技术开发得到的分子标记中, 选取群体内具有代表性的高质量(筛选标准为  $MAF > 0.05$ ) 的 SNP 位点开展群体遗传结构分析。使用 MEGA 5 软件<sup>[24]</sup>, 运用 neighbor-joining 算法<sup>[26]</sup>, 构建群体的进化树。使用 structure 软件<sup>[27]</sup> 和 admixture 软件<sup>[28]</sup>, 分别假设样品的分群数( $K$  值)为 1~10, 进行聚类, 通过交叉验证确定分群数为时验证结果的

错误率  $\Delta K$  最低, 以  $\Delta K$  值最低的分群作为最佳分群数。使用 cluster 软件<sup>[29]</sup>, 进行主元成分分析(Principal components analysis, PCA)分析, 通过样品间的接近程度辅助进化分析。

## 3 结果

### 3.1 基于线粒体控制区序列的结果

#### 3.1.1 遗传多样性分析和单倍型统计

共检测到 10 个多态简约信息位点和 11 个核苷酸变异位点, 定义了 8 个单倍型。单倍型多样性( $h$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )分别为 0.130 7 和 0.000 7, 显示其多样性水平较低。各个群体的遗传多样性参数统计情况见表 1。

单倍型网络图如图 2 所示。Hap 1 是所有群体共享的主单倍型。Hap 5、Hap 6、Hap 7 这 3 个单倍型均是三亚群体的独有单倍型, 且数量仅有 1 个。

4 个群体 D-loop 片段的单倍型 NJ 系统树, 如图 3 所示。从图中可以看出进化枝主要分为两支, 但两进化枝之间枝长均较短。

#### 3.1.2 群体历史动态

各群体和总体的 Fu's  $F_s$  和 Tajima's  $D$  中性检验结果如表 2 所示。结果显示, 除了三亚群体的 Fu's  $F_s$  中性结果为正值外, 其他的都为负值, 然而除了深圳群体的结果为显著以外, 其他群体和总体的中性检验结果都不显著。4 个群体的核苷酸不配对分析和吻合度分析见表 2, 根据核苷酸不配对分析结果所做的核苷酸不配对分布曲线如图 4 所示。结果显示, 4 个群体的核苷酸不配对分布曲线都不是典型的单峰分布, 说明多室草苔虫在历史上可能并未发生过大规模扩张事件。

表 1 不同群体的遗传多样性参数统计

Tab.1 The genetic diversity estimates of 4 *B. neritina* populations

变异参数	温州	厦门	深圳	三亚	总计/平均
个体数	18	32	33	21	104
长度	687	687	687	687	687
变异位点	1	1	1	9	11
单倍型数	2	2	2	5	8
单倍型多样性	0.111 1	0.062 5	0.060 6	0.352 4	0.130 7
核苷酸多样性	0.000 16	0.000 09	0.000 09	0.002 82	0.000 70



图2 多室草苔虫4个群体的单倍型网络图

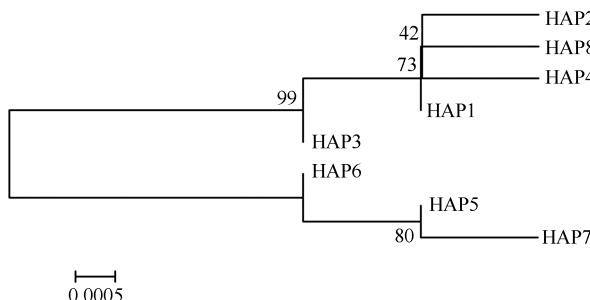
Fig.2 Haplotype network of 4 *B. neritina* populations

图3 多室草苔虫4个群体的D-loop片段的单倍型NJ系统树

Fig.3 Neighbor-joining tree of D-loop sequence haplotypes from 4 *B. neritina* populations

表2 多室草苔虫4个群体的中性检验、核苷酸不配对分析及吻合度检验

Tab.2 Neutrality tests, mismatch analysis and goodness-fit tests for 4 *B. neritina* populations

群体	中性检验		核苷酸不配对分析			吻合度检验	
	Tajima's <i>D</i> 检验	Fu's <i>Fs</i> 检验	$\tau$	$\theta_0$	$\theta_1$	SSD	Raggedness 指数
温州	-1.164 7	-0.794 3	3.000 0	0.000 0	0.132 23	0.000 10	0.617 28
厦门	-1.142 4	-1.264 8*	3.000 0	0.000 0	0.068 55	0.000 01	0.769 53
深圳	-1.140 1*	-1.290 3*	3.000 0	0.000 0	0.066 11	0.000 01	0.775 94
三亚	-0.796 7	0.645 1	3.000 0	0.000 0	0.336 04	0.070 64	0.433 47
总体	-1.061 0	-0.676 1	3.000 0	0.000 0	0.150 73	0.017 69	0.649 06

注: $\tau$ 用突变单位表示的种群扩张时间,  $\theta_0$  种群开始扩张前大小,  $\theta_1$  种群扩张后大小; 数值右上方的\*号表示结果显著。

## 3.2 基于 SLAF-seq 简化基因组的结果

### 3.2.1 SLAF 建库评估

根据对参考基因组序列的电子酶切结果, 确定最佳的限制性内切酶组合为 *HinCII*+*EcoRV*-HF®, 酶切长度在 314~344 bp 的序列定义为 SLAF 标签, 预测可得到 14 540 个 SLAF 标签。另外, 拟南芥的酶切片段双端比对效率为 79.21%, 表明比对效率基本正常; 酶切效率为 99.21%, 表明酶切反应正常。综上所述, 本实验 SLAF 建库正常。

### 3.2.2 测序数据统计与评估

为保证后续生物信息学分析质量, 实验采用去掉接头后读长的 80 bp×2 作为后续的数据评估和分析

数据。各样品经测序共获得 11.93 M 的 reads 数据, 每个样品的总测序读长 74 430~735 578 bp 不等。各样品的 GC 含量 35.09%~48.85%, 达到测序要求; 来自所有样品的个体碱基测序评估的指标 Q30 比例 80.01%~91.16%, 所有样品 Q30 比例都在 80% 以上, 说明测序过程中碱基错误率低, 获得的测序数据质量合格可信。

### 3.2.3 SLAF 标签的开发和 SNP 信息统计

实验中针对所有样品共开发得到 214 409 个 SLAF 标签, 样品的平均测序深度为 10.29×。根据等位基因数和基因序列之间的差异进行多态性分析, 共得到 23 437 个多态性 SLAF 标签, 比例为

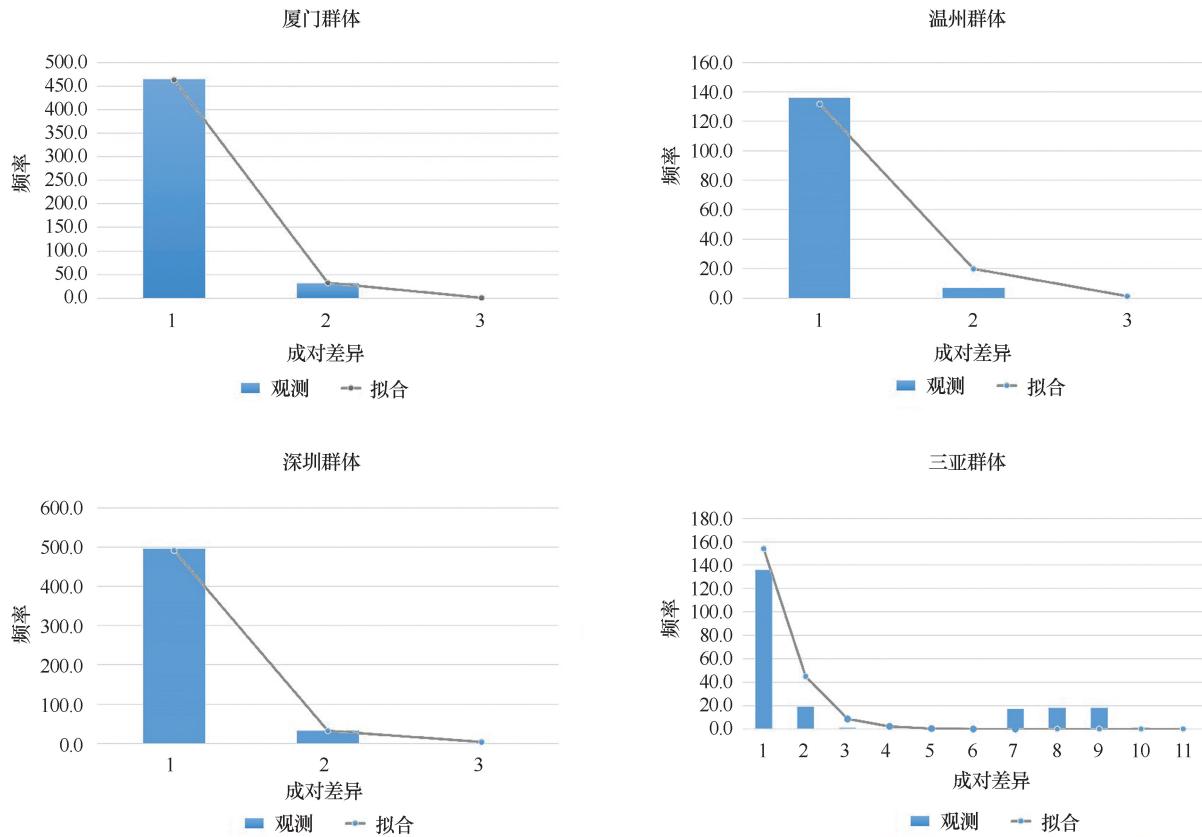


图 4 多室草苔虫 4 个群体 D-loop 序列核苷酸不配对分布图

Fig.4 Mismatch distribution for D-loop sequences of 4 *B. neritina* populations

10.93%; 190 972 个非多态性的 SLAF 标签, 比例为 89.07%。利用得到的多态性 SLAF 标签共开发出 99 432 个 SNP 位点。

### 3.3 多室草苔虫群体遗传结构分析

基于控制区序列的 4 个群体的遗传距离, 如表 3 所示。从中可以看出, 群体内遗传距离的大小比较为

三亚(0.002 82)>温州(0.000 16)>深圳(0.000 09)=厦门(0.000 09), 而群体间的遗传距离范围为 0.000 09~0.001 62。整体来看, 群体间的遗传距离水平低于群体内的遗传距离, 没有显著的遗传结构。但是, 三亚群体与另外 3 个群体之间的遗传距离相对较远。

表 3 群体间/群体内的 Kimura 2-parameter 遗传距离

Tab. 3 The average Kimura 2-parameter distance within and between populations

群体	温州	厦门	深圳	三亚
温州	0.000 16*			
厦门	0.000 13	0.000 09*		
深圳	0.000 13	0.000 09	0.000 09*	
三亚	0.001 62	0.001 59	0.001 57	0.002 82*

注: \* 为群体内 Kimura 2-parameter 遗传距离。

基于控制区序列的 4 个群体的遗传分化, 其结果如表 4 所示。Wright<sup>[30]</sup> 曾经提出了关于遗传分化指

数的大小和分化程度的解释, 他认为  $F_{st}$  值小于 0.05 时, 群体间遗传分化程度很低; 在 0.05~0.15 之间表

明群体遗传分化达中等水平。由基于 D-loop 片段序列的数据可知,三亚群体对另外 3 个群体的  $F_{st}$  值均高于 0.05,且三亚对深圳和三亚对厦门的  $F_{st}$  分析均

显示差异显著。这说明三亚群体相对于另外 3 个群体可能存在一定的遗传分化。

表 4 多室草苔虫 4 个群体的遗传分化

Tab.4 The genetic divergence among 4 *B. neritina* populations

群体	温州	厦门	深圳	三亚
温州	* * * *	—	—	—
厦门	0.007 57	* * * *	—	+
深圳	0.008 32	0.000 06	* * * *	+
三亚	0.071 25	0.118 53	0.112 68	* * * *

注:对角线以下群体间  $F_{st}$  值;对角线上基于  $F_{st}$  值的显著性分析(以  $P < 0.05$  为标准)结果差异显著为“+”,反之为“-”。

将三亚群体和另外 3 个群体分别归为 1 个群组进行 AMOVA 分析,结果如表 5 所示。可以看出,有 22.75% 的变异来自群组间,而 79.70% 的变异来自群

体内,而群体间、群组间固定系数  $F_{st}$  和  $F_{ct}$  分别为 0.095 12 和 0.227 47,说明三亚群体和其他群体间存在较大的遗传差异。

表 5 多室草苔虫群组间的 AMOVA 分析

Tab. 5 The AMOVA analysis between *B. neritina* population groups

变异来源	自由度	平方和	方差组分	方差比例/%
群组间	1	2.268	0.065 58	22.75
群组内群体间	2	0.081	-0.007 06	-2.45
群体内	100	22.978	0.229 78	79.70
总计	103	25.327	0.288 30	100
群体间固定系数		$F_{st}: 0.095\ 12$		
群组内群体间固定系数		$F_{sc}: -0.031\ 69$		
群组间固定系数		$F_{ct}: 0.227\ 47$		

基于 SNP 位点的系统发育树见图 5。由图可知,系统发育树呈现出与分布地点不相关的散状分枝,说明各群体之间的遗传分化并不明显。

基于 SNP 位点的群体遗传结构的分析结果显示,来自不同地点的群体的最佳分群数为 1(图 6,图 7),这表明所有多室草苔虫均属于同一个群体。PCA 分析结果(图 8)则显示,来自温州、厦门、深圳的样品比较接近,而来自三亚的样品与其他地点的样品较为疏远。

## 4 讨论

### 4.1 多室草苔虫的遗传多样性水平和群体遗传结构分析

物种的遗传多样性水平与其适应和生存的能力

以及进化的潜力密切相关<sup>[31]</sup>。基于线粒体控制区序列的结果表明,我国的多室草苔虫群体的单倍型多样性( $h$ )和核苷酸多样性( $\pi$ )均处于较低水平。当种群的  $h$  值和  $\pi$  值都较低时( $h < 0.5, \pi < 0.005$ ),说明该种群的遗传多样性水平较低,有可能在进化过程中经历了瓶颈效应(bottleneck effect)或者是奠基者效应(founder effect)<sup>[32]</sup>。群体历史动态结果也显示多室草苔虫在历史上没有发生过显著的扩张行为。基于 SLAF-seq 的群体遗传分化分析结果显示,只有约 10% 的 SLAF 标签是多态性的,这同样表明该物种的遗传多样性水平较低。由此,基于线粒体 DNA 和 SLAF-seq 的群体遗传分化结果都一致表明,多室草苔虫的遗传多样性处于较低的水平,这也与其他学者

对世界范围内多室草苔虫的群体遗传学研究中只发

现了 1 种 COI 单倍型的结果相吻合<sup>[33]</sup>。

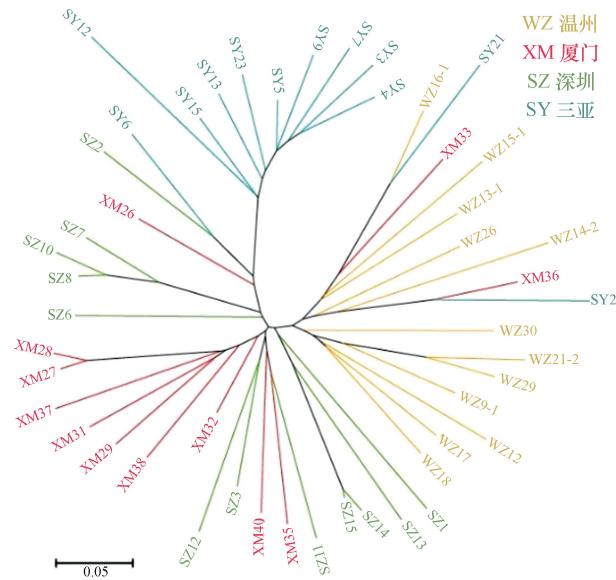


图 5 基于 SNP 位点的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on SNP loci

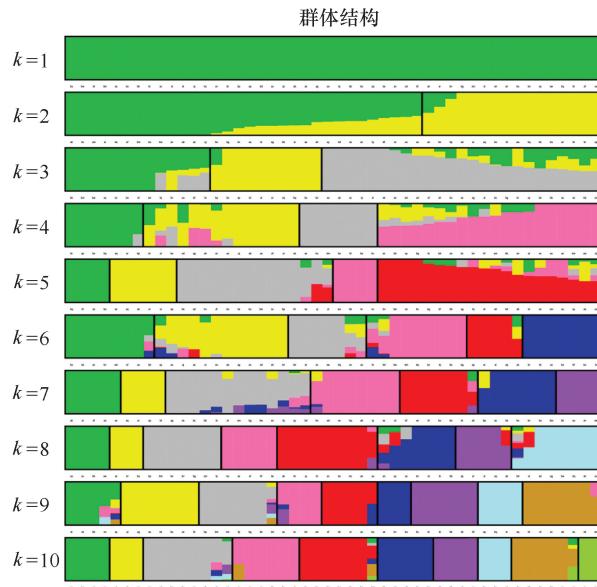


图 6 分群数为 1~10 的聚类图

Fig.6 Dendrogram of clustering from 1–10

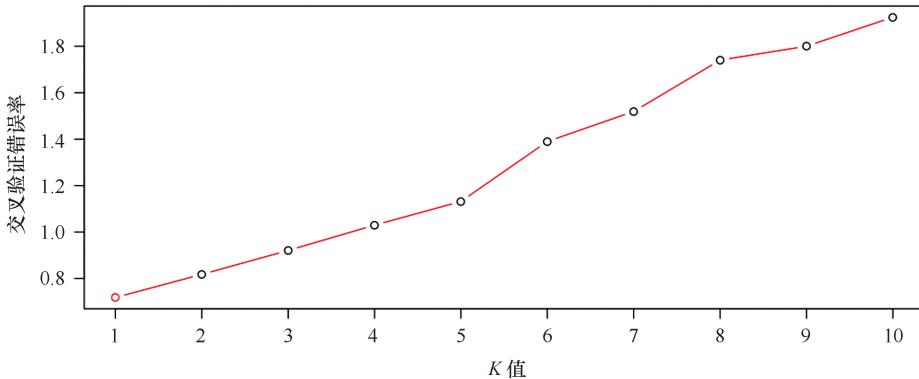


图 7  $\Delta K$  值分布图

Fig.7 Scattergram of  $\Delta K$  value

群体遗传结构分析结果表明，4 个不同地点的多室草苔虫之间未检测到显著的遗传结构，故应属于同一个群体。导致生物群体遗传结构同质化的原因有很多，对于海洋生物而言，其自身的生活史与扩散能力、海洋水文环境条件和理化因素、生境的连续性等，都是有可能影响其遗传结构的重要因素<sup>[34]</sup>。

多室草苔虫是固生的海洋动物，其完整生活史中只有幼虫阶段具有潜在的扩散能力，但幼虫在海水中仅能自由游动 1~2 h 便会附着在固着基上<sup>[35~36]</sup>，其较差的扩散能力，限制了不同地点群体间的基因交流<sup>[37~38]</sup>。在凭借自身条件难以实现远距离扩散的情

况下，多室草苔虫仍可以依靠舰船航行扩散。舰船航行使得依附在其表面的污损生物有可能克服其原本无法逾越的海洋陆地阻隔、温度差别以及低盐度的河口径流等障碍，从而扩大种群的分布范围<sup>[1]</sup>。然而，要实现上述目的污损生物还必须满足以下条件：(1) 能经受舰船快速航行和波浪冲击；(2) 能抵御温度、盐度等环境条件的急剧变化；(3) 能在新环境里进行有性生殖<sup>[39]</sup>。对多室草苔虫而言，其直立生长和钙化程度较低的群体特性不利于应对舰船快速航行和波浪冲击，但其幼虫附着变态后幼体生长发育迅速，形成初虫直立生长至群体第四次分歧仅需 30 d，因此，

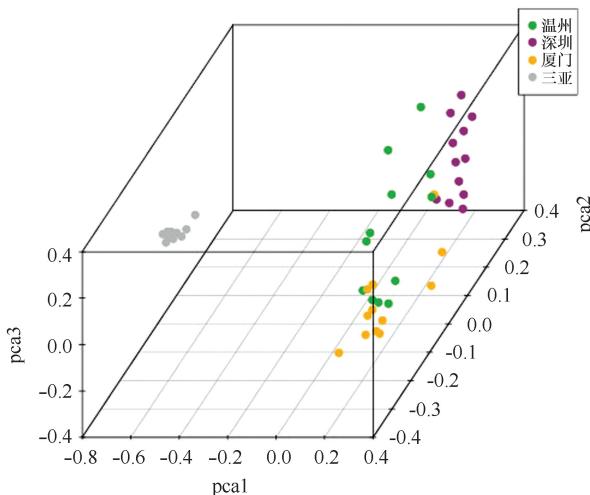


图8 PCA聚类分析图

Fig.8 PCA clustering analysis

多室草苔虫仍然可借助附着在舰船底部进行有效的长距离扩散<sup>[1]</sup>。另外一方面,作为一种常见的污损生物,多室草苔虫对栖息环境的适应范围较广,在半裸露的岩石、浮标、栈桥、渔排、船底、海带和石花菜表面等地方均可大量生长<sup>[1]</sup>,在扩散到新的环境后有能力生存下来。

综上所述,多室草苔虫广泛的扩散行为和对环境较好的适应性可以使不同群体间保持频繁的基因交流,在一定程度上使基因库趋于同质化,同时抵消了选择压力下对特定遗传变异的保留<sup>[40]</sup>,进而影响群体的遗传多样性水平并阻碍群体遗传结构的产生。

#### 4.2 SLAF-seq 应用在多室草苔虫群体遗传分化研究中的可行性和优势

目前,SLAF-seq 技术已经在各个领域的研究中成功开发出众多分子标记<sup>[41]</sup>。对于没有参考基因组的物种,如鲤鱼等,SLAF-seq 也能进行 SNP 位点的挖掘<sup>[42]</sup>;对于基因组序列组成高度杂合的物种,如牡丹、茶树、胡桃等,在没有参考基因组序列的情况下,SLAF-seq 可以通过先进行电子酶切设计方案再测序的方式,实现分子标记的大规模开发<sup>[43~45]</sup>;而对于多态率低的物种,如大豆等,SLAF-seq 大规模开发分子标记的能力也得到过检验<sup>[18]</sup>。因此,尽管目前由于没有多室草苔虫及其近缘物种的基因组序列可供参考,无法了解其基因组的复杂程度和组成特性,但是根据 SLAF-seq 技术在其他诸多物种上的成功实践案例,我们依然可以将其用于多室草苔虫全基因组范围内 SNP 位点的开发。

分子标记开发的结果显示,实际开发出的 SLAF

标签数远高于用电子酶切预测的结果,同时做到了对所有样品的深度覆盖。 $10.29\times$ 的覆盖率,不仅高于预期的  $5\times$ ,同时也确保了碱基读取的准确性和 SNP 位点的有效性。另外,获得的 SLAF 标签中没有重复性标签,而只有多态性标签和非多态性标签。由于缺乏参考基因组信息,无法排除多室草苔虫基因组本身重复序列比例较低的可能性;但是事先通过电子酶切来预测最优酶切方案,显然对于研究结果中重复性标签的杜绝和分子标记挖掘效率的提升起到了重要的作用。最终开发出的 99 432 个分子标记,数量可观,并实现了在全基因组范围内的高密度均匀覆盖,因此完全可以用于后续的群体遗传分析。另外,SLAF-seq 在遗传多样性水平和群体遗传结构方面,呈现出与线粒体 DNA 序列相一致的结果,这也从另一个侧面证明了,SLAF-seq 技术完全可以应用于包括多室草苔虫在内的海洋生物群体遗传分化研究。

作为一种生物信息学分析辅助的基于酶切的简化基因组技术,SLAF-seq 有着(1)不受参考基因组限制,可以应用于各种非模式生物;(2)对 SLAF 标签的深度测序可以保证基因分型的高度准确性;(3)对目标基因组简化代表的策略显著降低了测序成本;(4)酶切方案灵活,能够有效避开重复序列,优化了分子标记的挖掘效率;(5)开发的 SNP 分子标记性价比高,稳定性好,在基因组中分布均匀;(6)双端 barcode 接头的系统非常适合大群体研究等诸多优势<sup>[42,46]</sup>。特别是相较于其他传统的分子标记,如线粒体 DNA 等,SLAF-seq 有着高出几个数量级的分子标记数目。另外,由于在全基因组范围内的高密度均匀覆盖,而非其它分子标记仅仅来源于基因组的局部有限范围,如线粒体基因组等,SLAF-seq 在群体研究中有着更精细的分辨率,因而能传递出更多的遗传信息。在本研究中,尽管两种技术手段的结果基本一致,但是相较于线粒体控制区序列结果中的 8 个单倍型,SLAF-seq 从来源相同、样品数目却更少的 4 个群体中共得到 99 432 个 SNP 位点,其呈现出的有关遗传变异的信息量显然更为丰富和准确,因此,能够更加全面和深入地反映多室草苔虫的群体遗传结构和群体遗传分化水平。另外,SLAF-seq 在群体遗传学研究中对每个群体的样品数量要求较低,在综合考虑研究结果的准确性和测序成本的前提下,通常只需要 10~15 个,较线粒体 DNA 等传统分子标记所需的 30~50 个而言大幅减少,在一定程度上降低了采样成本和难度。由此可见,相较于线粒体 DNA 等传统分子标记,

SLAF-seq 技术在群体遗传分化研究中有着无可比拟 的巨大技术优势。

## 参考文献：

- [1] 刘锡兴, 尹学明, 马江虎. 中国海洋污损苔虫生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 79—467.  
Liu Xixing, Yin Xueming, Ma Jianghu. Biology of Marine-fouling Bryozoans in the Coastal Waters of China[M]. Beijing: Science Press, 2001: 79—467.
- [2] 林厚文, 易杨华, 姚新生, 等. 中国南海总合草苔虫抗癌活性成分研究(IV) Bryostatin 8, 16 的分离与结构鉴定[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(4): 1—6.  
Lin Houwen, Yi Yanghua, Yao Xinsheng, et al. Studies on antineoplastic constituents from marine bryozoan *Bugula neritina* inhabiting South China Sea (IV): isolation and structural elucidation of bryostatins 8 and 16[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2001, 20(4): 1—6.
- [3] 林厚文, 易杨华, 姚新生, 等. 中国南海总合草苔虫抗癌活性成分研究——II 总草苔虫内酯的超强抗癌活性[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(2): 1—3.  
Lin Houwen, Yi Yanghua, Yao Xinsheng, et al. Studies on the antineoplastic constituents from marine bryozoan *Bugula neritina* inhabiting South China Sea (II): remarkable antineoplastic activities of active principals[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2000, 19(2): 1—3.
- [4] Lei Hui, Zhou Xuefeng, Yang Yaling, et al. Bryostatins from South China Sea bryozoan *Bugula neritina* L.[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(6): 1231—1233.
- [5] Lopanik N, Gustafson K R, Lindquist N. Structure of bryostatin 20: a symbiont-produced chemical defense for larvae of the host bryozoan, *Bugula neritina*[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(8): 1412—1414.
- [6] 孙鹏, 李玲, 易杨华, 等. 总合草苔虫中抗癌活性成分的提取和含量测定[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(3): 240—242.  
Sun Peng, Li Ling, Yi Yanghua, et al. Extraction and quantitative determination of antineoplastic constituents in *Bugula neritina* L.[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2002, 23(3): 240—242.
- [7] Kraft A S, Smith J B, Berkow R L. Bryostatin, an activator of the calcium phospholipid-dependent protein kinase, blocks phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(5): 1334—1338.
- [8] Kuzirian A M, Epstein H, Gagliardi C J, et al. Bryostatin enhancement of memory in *Hermissenda*[J]. The Biological Bulletin, 2006, 210(3): 201—214.
- [9] Parkinson D R, Arbuck S G, Moore T, et al. Clinical development of anticancer agents from natural products[J]. Stem Cells, 1994, 12(1): 30—43.
- [10] Sun Miaokun, Alkon D L. Bryostatin-1: pharmacology and therapeutic potential as a CNS drug[J]. CNS Drug Reviews, 2006, 12(1): 1—8.
- [11] Sun Miaokun, Alkon D L. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression[J]. European Journal of Pharmacology, 2005, 512(1): 43—51.
- [12] 林厚文, 易杨华, 李文林, 等. 中国南海总合草苔虫中新的抗癌活性成分 Bryostatin19[J]. 中国海洋药物, 1998, 17(1): 1—3.  
Lin Houwen, Yi Yanghua, Li Wenlin, et al. Bryostatin 19: a new antineoplastic component from *Bugula neritina* in the South China Sea[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1998, 17(1): 1—3.
- [13] Pettit G R, Kamano Y, Herald C L, et al. Isolation and structure of bryostatins 5—7[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1985, 63(6): 1204—1208.
- [14] 曹艳, 章群, 宫亚运, 等. 基于线粒体 COI 序列的中国沿海蓝点马鲛遗传多样性[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 485—493.  
Cao Yan, Zhang Qun, Gong Yayun, et al. Genetic variation of *Scomberomorus niphonius* in the coastal waters of China based on mt DNA COI sequences[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 485—493.
- [15] 刘若愚, 孙忠民, 姚建亭, 等. 中国近海重要生态建群红藻真江蓠的群体遗传多样性[J]. 生物多样性, 2016, 24(7): 781—790.  
Liu Ruoyu, Sun Zhongmin, Yao Jianting, et al. Genetic diversity of the habitat-forming red alga *Gracilaria vermiculophylla* along Chinese coasts [J]. Biodiversity Science, 2016, 24(7): 781—790.
- [16] Guo Xiang, Zhao Dan, Jung D, et al. Phylogeography of the rock shell *Thais clavigera* (Mollusca): evidence for long-distance dispersal in the northwestern Pacific[J]. PLOS One, 2015, 10(7): e0129715.
- [17] Wang Jie, Tsang L M, Dong Yunwei. Causations of phylogeographic barrier of some rocky shore species along the Chinese coastline[J]. BMC Evolutionary Biology, 2015, 15: 114.
- [18] Li Bin, Tian Ling, Zhang Jingying, et al. Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max*[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 1096.
- [19] Wang Wenhao, Zhang Tao, Zhang Genxi, et al. Genome-wide association study of antibody level response to NDV and IBV in Jinghai yellow chicken based on SLAF-seq technology[J]. Journal of Applied Genetics, 2015, 56(3): 365—373.
- [20] 陈士强, 秦树文, 黄泽峰, 等. 基于 SLAF-seq 技术开发长穗偃麦草染色体特异分子标记[J]. 作物学报, 2013, 39(4): 727—734.  
Chen Shiqiang, Qin Shuwen, Huang Zefeng, et al. Development of specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* chromosome using

- SLAF-seq technique[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(4): 727–734.
- [21] 苏文瑾, 赵宁, 雷剑, 等. 基于 SLAF-seq 技术的甘薯 SNP 位点开发[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(1): 27–34.  
Su Wenjin, Zhao Ning, Lei Jian, et al. SNP sites developed by specific length amplification fragment sequencing (SLAF—seq) in Sweetpotato[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(1): 27–34.
- [22] 孙名安, 吴志刚, 申欣, 等. 颈链血苔虫线粒体基因组的测定及其系统发育学意义[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 89–94.  
Sun Ming'an, Wu Zhigang, Shen Xin, et al. The complete mitochondrial genome of *Watersipora subtorquata* and its phylogenetic significance[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 89–94.
- [23] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [25] 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]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3): 564–567.
- [26] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [27] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611–2620.
- [28] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals[J]. *Genome Research*, 2009, 19(9): 1655–1664.
- [29] de Hoon M J L, Imoto S, Nolan J, et al. Open source clustering software[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(9): 1453–1454.
- [30] Wright S. The genetical structure of populations[J]. *Annals of Eugenics*, 1949, 15(1): 323–354.
- [31] 牛素芳, 苏永全, 王军, 等. 福建近海蓝圆鲹群体遗传结构分析[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2012, 51(4): 759–766.  
Niu Sufang, Su Yongquan, Wang Jun, et al. Population genetic structure analysis of *Decapterus maruadsi* from Fujian coastal waters[J]. *Journal of Xiamen University:Natural Science*, 2012, 51(4): 759–766.
- [32] Grant W A S, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(5): 415–426.
- [33] Mackie J A, Keough M J, Christidis L. Invasion patterns inferred from cytochrome oxidase I sequences in three bryozoans, *Bugula neritina*, *Watersipora subtorquata*, and *Watersipora arcuata*[J]. *Marine Biology*, 2006, 149(2): 285–295.
- [34] 张丽艳. 台湾海峡三种中上层鱼类遗传多样性的 AFLP 分析[D]. 厦门: 厦门大学, 2011.  
Zhang Liyan. Genetic diversity of three pelagic fishes in the Taiwan Strait, inferred by AFLP fingerprinting[D]. Xiamen: Xiamen University, 2011.
- [35] Dahms H U, Dobretsov S, Qian Peiyuan. The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 313(1): 191–209.
- [36] Wendt D E. Energetics of larval swimming and metamorphosis in four species of *Bugula* (Bryozoa)[J]. *The Biological Bulletin*, 2000, 198(3): 346–356.
- [37] Keough M J. Dispersal of the bryozoan *Bugula neritina* and effects of adults on newly metamorphosed juveniles[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1989, 57: 163–171.
- [38] Wendt D E. Effect of larval swimming duration on success of metamorphosis and size of the ancestrular lophophore in *Bugula neritina* (Bryozoa)[J]. *The Biological Bulletin*, 1996, 191(2): 224–233.
- [39] 黄宗国, 蔡如星. 海洋污损生物及其防除[M]. 北京: 海洋出版社, 1984: 1–352.  
Huang Zongguo, Cai Ruxing. Marine Fouling and Its prevention[M]. Beijing: China Ocean Press, 1984: 1–352.
- [40] Guo Baocheng, de Faveri J, Sotelo G, et al. Population genomic evidence for adaptive differentiation in Baltic Sea three-spined sticklebacks[J]. *BMC Biology*, 2015, 13: 19.
- [41] Wei Qingzhen, Wang Yunzhu, Qin Xiaodong, et al. An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in cucumber using specific-length amplified fragment (SLAF) sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1158.
- [42] Sun Xiaowen, Liu Dongyuan, Zhang Xiaofeng, et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale *de novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58700.
- [43] Cai Changfu, Cheng Fangyun, Wu Jing, et al. The first high-density genetic map construction in tree peony (*Paeonia Sect. Moutan*) using genotyping by specific-locus amplified fragment sequencing[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128584.
- [44] Ma Jianqiang, Huang Long, Ma Chunlei, et al. Large-scale SNP discovery and genotyping for constructing a high-density genetic map of tea plant using specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128798.
- [45] Zhu Yufeng, Yin Yanfei, Yang Keqiang, et al. Construction of a high-density genetic map using specific length amplified fragment markers and identification of a quantitative trait locus for anthracnose resistance in walnut (*Juglans regia* L. )[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 614.
- [46] Zheng Wenjing, Li Zhiqiang, Zhao Jiaming, et al. Study of the long-distance migration of small brown planthoppers *Laodelphax striatellus* in

China using next-generation sequencing[J]. Pest Management Science, 2016, 72(2): 298—305.

## Population genetic variation study of *Bugula neritina* in coastal waters of China

Li Hai<sup>1,2</sup>, Liu Qiaohong<sup>2</sup>, Tang Xueying<sup>2</sup>, Chen Wuge<sup>3</sup>, Ding Shaoxiong<sup>2</sup>

(1. Laboratory of Marine Biology and Ecology, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361102, China; 3. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361012, China)

**Abstract:** We studied the genetic diversity and population genetic variation of *Bugula neritina*, an important pharmaceutical organism, sampled from 4 distinct localities along China coastline by mitochondrial control region amplification and SLAF-seq. 8 haplotypes were detected in control region, haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were 0.130 7 and 0.000 7, respectively. No significant topological structure was found in haplotype network and NJ phylogenetic tree. Neutrality tests and mismatch distribution both suggested that *B. neritina* did not experience a range expansion.  $F_{st}$  and AMOVA analysis indicated that genetic variation mainly occurred within populations. SLAF library construction generated 214 409 SLAFs, among which 23 437 were polymorphic, 99 432 SNP loci were developed. Genetic distances among populations were short and even shorter than those within populations. Phylogenetic tree and population genetic analysis based on SNP data revealed that no significant genetic structure were observed among populations. In conclusion, genetic diversity of *B. neritina* in coastal waters of China were low, and no significant genetic structure existed among geographically distinct populations. We assumed this was mainly attributed to bryozoan's capability to disperse. In addition, our study validated the application and advantages of SLAF-seq in population genetic variation study of marine organisms.

**Key words:** *Bugula neritina*; population genetic variation; mitochondrial DNA; SLAF-seq; reduced representation sequencing