

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200707001

http://www.yykxjz.cn/

吴玉萍, 田永胜, 王林娜, 李振通, 张晶晶, 黎琳琳, 李子奇, 陈帅, 马文辉, 王清滨, 李波. 棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂)及其杂交子代遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 25–32

WU Y P, TIAN Y S, WANG L N, LI Z T, ZHANG J J, LI L L, LI Z Q, CHEN S, MA W H, WANG Q B, LI B. Genetic diversity analysis of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) and *E. tukula* (♂) hybrids. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 25–32

棕点石斑鱼(♀)与蓝身大斑石斑鱼(♂) 及其杂交子代遗传多样性分析*

吴玉萍^{1,3} 田永胜^{1,2①} 王林娜^{1,2} 李振通^{1,4} 张晶晶^{1,4} 黎琳琳^{1,5}
李子奇^{1,4} 陈 帅^{1,4} 马文辉⁶ 王清滨⁶ 李 波⁶

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;
3. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
5. 中国农业科学院 北京 100081; 6. 莱州明波水产有限公司 山东 莱州 261400

摘要 本研究利用 20 对石斑鱼微卫星引物对金虎斑[棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*) (♀)×蓝身大斑石斑鱼(*E. tukula*) (♂)]及其父母本进行微卫星分析,从分子水平对金虎斑及其双亲的遗传多样性进行研究。结果显示,20 个微卫星位点共检测到 215 个等位基因,平均多态信息含量(PIC)为 0.638 6;棕点石斑鱼平均有效等位基因数(N_e)最多(4.367 9),金虎斑次之(3.370 6),蓝身大斑石斑鱼最少(2.412 8);蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑 3 个群体平均观测杂合度(H_o)分别为 0.385 5、0.474 9 和 0.473 6, PIC 分别为 0.491 9、0.645 3 和 0.555 1;3 种石斑鱼群体群内近交系数(F_{is})、总群体近交系数(F_{it})、遗传分化系数(F_{st})和基因流(N_m)平均值分别为 0.228 0、0.344 1、0.150 4 和 1.411 9,群体间分化较大;采用 UPGMA 法构建的聚类分析图显示,金虎斑与棕点石斑鱼先聚为一类,二者亲缘关系更近。研究表明,金虎斑存在较丰富的遗传多样性表现,在遗传学方面可进行杂交石斑鱼进一步选育及杂种优势研究。

关键词 棕点石斑鱼; 蓝身大斑石斑鱼; 杂交; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0025-08

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)和蓝身大斑石斑鱼(*E. tukula*)均为我国重要的海水经济鱼类,其市场需求大,经济价值高。近年来,因人类滥捕行

为,野生石斑鱼资源大幅减少,而人工养殖石斑鱼产业的快速发展在一定程度上缓解了野生资源捕捞的压力。渔业统计年鉴相关数据显示,我国石斑鱼养殖

* 山东省重点研发计划(2019GHY112063)、山东省良种工程(2019LZGC020)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020XT0601; 2020TD19; 2020TD25)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022019002; 20603022020015)共同资助 [This work was supported by Shandong Province Key Research and Development Plan (2019GHY112063), Shandong Province Agricultural Variety Engineering (2019LZGC020), Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (2020XT0601; 2020TD19; 2020TD25), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (20603022019002; 20603022020015)]. 吴玉萍, E-mail: wuyuping12@foxmail.com

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-07-07, 收修改稿日期: 2020-08-07

总量在 2018 年升至 159,579 t, 广东、海南、福建三省养殖量分别位居前三, 在石斑鱼总养殖量中占 97.10%。在石斑鱼人工养殖产业快速发展的同时, 面临着一些问题亟待解决, 如出苗率低、生长周期长、病害等问题。因此, 将杂交育种技术运用到石斑鱼育种中, 旨在筛选出兼具双亲优势性状的石斑鱼新品种。本课题组利用棕点石斑鱼卵和蓝身大斑石斑鱼冷冻精子杂交获得杂交品种“金虎斑”, 现已完成对金虎斑发育、生长及与其亲本在形态差异等方面的研究(田永胜等, 2019; 吴玉萍等, 2019), 但对其分子水平的遗传差异研究尚未见报道。

微卫星标记(microsatellite), 也称“简单重复序列”(simple sequence repeats, SSR)或“短串联重复序列”(short tandem repeats, STRs), 该 DNA 片段由长度为 1~6 个核苷酸的简单序列重复串联组成。微卫星标记具有多态性高、共显性、分析过程快等优点, 在群体遗传结构分析、遗传连锁图谱构建、遗传多样性鉴定和亲鱼选择等方面, 均具有应用价值(Chistiakov *et al.*, 2006)。微卫星在石斑鱼属分子水平上的遗传多样性研究应用也很广泛, 刘丽等(2008)利用 13 对多态微卫星引物对我国南海海域青石斑(*E. awoara*)进行遗传多样性分析, 发现其遗传多样性较高, 但种群结构和种质资源受到一定程度的人为干扰。陈省平等(2012)利用 7 对微卫星引物对 7 个赤点石斑鱼(*E. akaara*)群体进行分析, 显示 7 个群体皆有较丰富的遗传多样性, 且群体间存在遗传差异; Dong 等(2007)通过微卫星分析发现, 鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)、斜带石斑鱼(*E. coioides*)、棕点石斑鱼等 9 种石斑鱼的遗传多样性处于中等水平。

目前, 微卫星的检测方法主要有 DNA 指纹图谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测法、毛细管电泳法、PCR-RFLP 检测法和多重 PCR 微卫星荧光标记全自动基因组扫描法(管峰等, 2004)。微卫星荧光标记技术利用 FAM、HEX 和 TAMRA 三种不同颜色荧光染料中的一种标记微卫星引物, 对 PCR 产物可进行电泳检测, 利用软件图像分析和等位基因片段大小计算, 此方法准确率更高, 更加快速简单。本研究从分子水平利用微卫星荧光标记技术对金虎斑的遗传多样性进行分析, 旨在为石斑鱼杂交育种、规模化繁殖以及新品种培育提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验用蓝身大斑石斑鱼与金虎斑取自山东莱州明波水产有限公司, 棕点石斑鱼取自海南恒昌生物科

技有限公司。每个群体随机挑选 30 尾, 剪鳍条保存于无水乙醇中, 置于-20℃冰箱备用。

1.2 DNA 提取

采用常规酚-氯仿法提取 3 种石斑鱼样品基因组 DNA(唐江等, 2018), DNA 纯度和浓度分别利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白分析仪检测。根据所得检测结果计算稀释倍数, 稀释 DNA 浓度至 50 ng/μL, 置于-20℃冰箱保存备用。

1.3 微卫星引物、PCR 扩增和荧光检测

1.3.1 微卫星引物 本研究所用 52 对微卫星引物均从石斑鱼近缘物种[夏威夷石斑鱼(*E. quernus*)、赤点石斑鱼、鞍带石斑鱼、小鳞喙鲈(*Mycteroperca microlepis*)]开发的引物中选取, 由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 从中筛选出 28 对有稳定扩增产物且具清晰条带的引物。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 20 μL: DNA 模板 1 μL, 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 正反向引物各 0.5 μL, 荧光标记引物(6-FAM、HEX 或 TAMRA) 0.2 μL, ddH₂O 7.8 μL。扩增反应在 Veriti PCR 仪上完成。PCR 反应程序: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s, 退火 30 s(采用降落 PCR 方法, 退火温度由 65℃降到 55℃, 分别为 65℃、63℃、60℃、58℃和 55℃, 前 4 个温度各 2 个循环, 55℃退火 29 个循环), 72℃延伸 30 s, 共 36 个循环, 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

1.3.3 荧光检测 利用琼脂糖凝胶电泳对荧光 PCR 产物进行鉴定, 筛选出条带单一且大小相符的引物, 对照 DNA Marker 浓度进行定量, 将所有产物稀释至相同的浓度范围, 在 ABI 3730 XL 测序仪上进行自动荧光检测。使用 GeneMarker 软件, 导入基因分析仪的原始结果文件, 根据位点信息设置分析模板; 使用 GeneScan 500 LIZ Size Standard 进行数据分析。

1.4 数据分析

利用 Popgene32 软件计算 20 个微卫星位点和 3 种石斑鱼群体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及群体间 Nei 氏遗传距离、群内近交系数(F_{is})、遗传分化系数(F_{st})和基因流(N_m), 基于 Botstein 等(1980)建立的公式, 借助 Excel 2010 计算多态信息含量(PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

式中, P_i 、 P_j 分别为第 i 个和第 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

参考群体间 Nei's 标准遗传距离(Nei, 1973), 采用算术平均数的非加权成组配对法(UPGMA), 利用 MEGA 4.0 软件构建 3 个石斑鱼群体的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点多态性分析

对筛选的 28 对微卫星引物进行相关测定, 其中 20 对引物的峰图清晰、等位基因数较多、多态性较

好(表 1), 可用于后续遗传多样性分析。20 个微卫星位点在蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼及金虎斑中均可扩增, 片段大小为 106~424 bp, 各位点等位基因数有所区别, 每个位点 3~19 个不等, 平均等位基因为 10.75 个。观测杂合度、期望杂合度平均值分别为 0.443 3、0.674 9。An22 位点属于低度多态位点($PIC < 0.25$), 此外, 除 An11、An32、CX-6 和 CX-20 位点为中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$)外, 其他位点皆属于高度多态位点($PIC > 0.5$), 平均多态信息含量为 0.638 6 (表 2)。

表 1 20 对微卫星引物序列
Tab.1 20 pairs of microsatellite primer sequences

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature/°C	等位基因大小 Allele size range/bp	登录号 Accession No.
CA2	GACTTGATTCAGCAAATAAAGATG AGAGACGGTGCCAGTAAATGAA	55	280~312	AF539606
RH_GATA_003	GGGCAATTTGGTCTTCACA TGTCATGCCACAGGATACA	57	106~253	DQ223790
PM12	AGAAAAAGCTCCACAACACAACAA GAGCCCCAGTCCCAAATATTG	55	164~225	EU117134
RH_CA_001	CGAGATAAGCCCTGGTGAAA AGTCCCAGATGTGGTAACGAG	60	392~425	EU117135
An1	ACTACAGAGCGTGGCAGGTT TGCAGTCAGTGCAAATGAGTC	60	166~303	JN185622
An11	GCTCTGTGGATGGCCTTTAT TTCATCCTCTGGGGACTACG	58	146~169	JN185632
An23	GACAGCAACGTCAGACCAGA TGCACAAAGTGTTATTAGTCATCA	59	216~264	JN185644
An15	CCTGTGTGTGAGCTGGAGAA GGTGGAGGAGTACGAAACCA	58	108~267	JN185636
An10	GAGAGATAAATACCAGCTTCACTGC TTCACAGTTTCTCCTCGGTTCC	58.5	185~217	JN185631
An22	GCTGGGGAATGCATTATGTT TCAGTTGATGCTGAGTGGA	58.5	216~243	JN185626
DY73	AGTCACCATCCCCACTGAAA GGGGCAGGAAGACACACTTA	58.5	180~226	KP230431
An32	TTCTCCATCATTAGTCGCACA TCTTTGTCTCCCTGTTTTTGC	58.5	191~222	JN185653
An30	GGCAGGTGTGTTTATTGCAG CTAGCCATGGTTTGGTGGAT	58.5	216~265	JN185651
Gag023	GCATTTGTGTTAGGATGACACT CACATGGACAGGATTGAGGA	58.5	109~125	AF183143
DY52	CTCCCCATAATCCCCTCTGT GAGTAATGTGTGCCGGGAGT	58.5	266~298	KP230429
DY230	GAGCTGCGTCTGTCAGGACT CAGCCACTCAAACATCCTCA	58.5	179~214	KP230437
CX-6	GGAAACCTCAGAAAAGTTGTCC CATAGAGAAGTGGCATGTTTGT	60	141~153	
CX-12	AAAGGTCAGACTTTCCACCTGAT ACCTCAGCTAAAGACCTCGTGTT	60	123~150	
CX-14	CTGTGGTGTACACAATACTGCT CCTTTTACCTCCTCTACTACTGCT	58	125~145	
CX-20	AGCTGTAGTGAATGTTTGGTGT TAGCATTGTGTAGCAGTCAGGTG	60	122~131	

2.2 遗传多样性分析

由表 3 可以看出, 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑的平均有效等位基因数分别为 2.412 8、4.367 9 和 3.370 6。棕点石斑鱼的观测杂合度、期望杂合度在 3 种石斑鱼群体中均为最高, 分别为 0.474 9、0.701 3, 金虎斑次之(0.473 6、0.603 2), 蓝身大斑石斑鱼的观测杂合度、期望杂合度最低, 分别为 0.385 5、0.462 4。3 种石斑鱼群体中, 棕点石斑鱼的平均多态信息含量最高(0.645 3), 高度多态性位点占 75%; 蓝身大斑石斑鱼的平均多态信息含量最低(0.491 9), 中度、高度多态位点分别占 30%、40%; 杂交子代金虎斑的平均多态信息含量为 0.555 1, 高度多态位点占 60%。上述结果表明, 本研究所选用的 20 对微卫星引物可作为蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼及杂交子代金虎斑的有效标记, 可用于 3 类石斑鱼群体相应遗传多样性分析。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检验

借助 Hardy-Weinberg 平衡来检验 3 类石斑鱼的 20 个位点。结果显示, 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼、金虎斑分别有 7、13、9 个位点表现出极显著偏离哈迪温伯格平衡($P < 0.01$)。此外, 蓝身大斑石斑鱼

表 2 20 个微卫星位点的遗传变异参数
Tab.2 Genetic diversity of 20 microsatellite loci

位点 Locus	N_a	H_o	H_e	PIC
CA2	14	0.585 4	0.801 7	0.775 1
RH_GATA_003	12	0.620 0	0.820 0	0.789 3
PM12	12	0.458 8	0.621 2	0.5793
RH_CA_001	13	0.762 5	0.762 1	0.727 9
An1	19	0.671 2	0.861 6	0.840 8
An11	6	0.156 9	0.432 3	0.409 4
An23	17	0.371 0	0.879 2	0.860 6
An15	21	0.743 9	0.880 9	0.865 8
An10	15	0.408 5	0.847 7	0.830 3
An22	5	0.169 8	0.259 7	0.247 2
DY73	12	0.394 7	0.639 1	0.609 5
An32	5	0.393 9	0.515 6	0.443 4
An30	15	0.745 1	0.911 9	0.894 8
Gag023	7	0.177 8	0.623 7	0.550 6
DY52	12	0.246 8	0.590 3	0.566 6
DY230	11	0.691 4	0.809 8	0.785 0
CX-6	3	0.241 0	0.491 3	0.435 7
CX-12	6	0.173 9	0.657 8	0.595 9
CX-14	7	0.531 6	0.691 3	0.624 4
CX-20	3	0.321 4	0.400 7	0.340 6
平均值 Mean	10.750 0	0.443 3	0.674 9	0.638 6
标准差 St.Dev	5.280 5	0.213 0	0.184 7	0.188 2

表 3 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑的遗传变异参数
Tab.3 Parameters of genetic variation for the *E. tukula*, *E. fuscoguttatus* and Jinhu grouper

位点 Locus	蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>				棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>				金虎斑 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀)× <i>E. tukula</i> (♂)			
	N_e	H_o	H_e	PIC	N_e	H_o	H_e	PIC	N_e	H_o	H_e	PIC
CA2	2.104 7	0.678 6	0.534 4	0.472 8	8.561 6	0.560 0	0.901 2	0.872 4	4.751 4	0.517 2	0.803 4	0.762 6
RH_GATA_003	3.515 6	0.666 7	0.727 7	0.673 1	5.555 6	0.600 0	0.863 2	0.798 0	1.739 1	0.500 0	0.447 4	0.410 8
PM12	1.071 3	0	0.067 8	0.064 4	4.072 3	0.769 2	0.769 2	0.720 2	3.098 1	0.633 3	0.688 7	0.633 0
RH_CA_001	1.919 0	0.633 3	0.487 0	0.427 7	4.173 9	0.791 7	0.776 6	0.734 6	4.225 0	0.884 6	0.778 3	0.732 2
An1	2.090 7	0.416 7	0.532 8	0.469 7	8.000 0	0.846 2	0.892 2	0.863 7	4.853 2	0.739 1	0.811 6	0.773 0
An11	1.700 8	0.277 8	0.423 8	0.383 1	2.107 0	0.187 5	0.542 3	0.486 8	1.409 8	0	0.299 5	0.248 4
An23	3.791 5	0.350 0	0.755 1	0.696 9	7.367 3	0.263 2	0.887 6	0.851 1	5.597 9	0.748 3	0.839 6	0.804 9
An15	4.130 3	0.629 6	0.772 2	0.738 9	7.308 1	0.730 8	0.880 1	0.850 0	7.859 8	0.862 1	0.888 1	0.859 4
An10	4.624 3	0.500 0	0.803 8	0.750 5	7.005 2	0.423 1	0.874 1	0.842 2	5.458 5	0.320 0	0.833 5	0.794 3
An22	1.000 0	0	0	-	2.160 3	0.312 5	0.554 4	0.508 7	1.246 2	0.222 2	0.203 2	0.178 0
DY73	2.850 9	0.607 1	0.661 0	0.610 5	2.721 1	0.300 0	0.648 7	0.564 1	1.955 1	0.250 0	0.497 4	0.462 7
An32	2.071 9	0.500 0	0.539 9	0.420 0	1.361 5	0.230 8	0.270 7	0.239 0	1.689 7	0.500 0	0.415 6	0.324 9
An30	4.800 0	0.666 7	0.863 6	0.763 0	8.791 2	0.750 0	0.909 0	0.875 3	8.389 3	0.760 0	0.898 8	0.869 2
Gag023	1.175 9	0.080 0	0.152 7	0.142 8	1.941 7	0.300 0	0.510 5	0.406 4	1.369 9	0.300 0	0.284 2	0.259 1
DY52	1.292 9	0.166 7	0.231 4	0.214 6	4.125 4	0.240 0	0.773 1	0.722 5	2.279 1	0.321 4	0.571 4	0.539 8
DY230	4.245 3	0.700 0	0.777 4	0.726 4	2.720 3	0.692 3	0.644 8	0.608 5	2.551 0	0.680 0	0.620 4	0.569 2

续表 3

位点 Locus	蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>				棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>				金虎斑 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀)× <i>E. tukula</i> (♂)			
	N_e	H_o	H_e	PIC	N_e	H_o	H_e	PIC	N_e	H_o	H_e	PIC
CX-6	1.000 0	0	0	—	2.704 0	0.384 6	0.642 5	0.554 5	2.096 3	0.357 1	0.532 5	0.468 3
CX-12	2.415 1	0.458 3	0.598 4	0.534 3	2.314 3	0	0.584 1	0.488 9	2.467 0	0.037 0	0.605 9	0.518 1
CX-14	1.456 3	0.379 3	0.318 8	0.274 0	2.327 3	0.500 0	0.582 4	0.521 7	2.731 3	0.730 8	0.646 3	0.567 7
CX-20	1.000 0	0	0	—	2.039 2	0.615 4	0.519 6	0.397 9	1.644 2	0.379 3	0.398 7	0.327 3
平均值 Mean	2.412 8	0.385 5	0.462 4	0.491 9	4.367 9	0.474 9	0.701 3	0.645 3	3.370 6	0.473 6	0.603 2	0.555 1
标准差 St.Dev	1.313 1	0.261 0	0.296 7	0.216 7	2.548 9	0.243 1	0.177 2	0.187 2	2.141 2	0.255 2	0.214 4	0.212 9

的 An22、CX-6 和 CX-20 位点呈现单态(表 4)。

2.4 群体间遗传分化分析

表 5 为 3 种石斑鱼群体遗传分化结果。由表 5 可知, 群内近交系数、总群体近交系数平均值分别为 0.228 0、0.344 1, 有 5 个位点的杂合子过剩($F_{is}<0$),

15 个位点的杂合子缺失($F_{is}>0$); 遗传分化系数在不同位点差异较大, 其变化范围在 0.024 6~0.529 0 之间, 平均值为 0.150 4, 表明 3 种石斑鱼之间的遗传变异中有 15.04% 存在于各群体之间, 而多数遗传变异源自个体。在 F_{st} 值的基础上, 估算石斑鱼群体间的基因流平均值为 1.411 9。

表 4 3 种石斑鱼群体 20 个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab.4 Hardy-Weinberg equilibrium test of 20 microsatellite loci in three grouper populations

位点 Locus	蓝身大斑 石斑鱼 <i>E.tukula</i>	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	金虎斑 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀)× <i>E. tukula</i> (♂)
	CA2	0.475 1	0**
RH_GATA_003	0.003 8**	0.003 4**	1.000 0
PM12	0**	0.001 1**	0.225 5
RH_CA_001	0.417 9	0.001 2**	0**
An1	0**	0.222 7	0.727 5
An11	0**	0**	0**
An23	0.000 4**	0**	0**
An15	0.134 2	0.001 1**	0**
An10	0.060 1	0**	0**
An22	—	0.008 1**	0.650 2
DY73	0.814 3	0**	0**
An32	0.848 1	0.755 6	0.269 6
An30	0.077 3	0.270 4	0.118 2
Gag023	0.001 3**	0.309 0	0.999 8
DY52	0.001 7**	0**	0**
DY230	0.606 6	0.955 4	0.060 3
CX-6	—	0**	0**
CX-12	0.161 1	0**	0**
CX-14	0.699 8	0.951 8	0.590 9
CX-20	—	0.485 1	0.927 8

注: —: 单态位点; **: $P<0.01$

Note: Single locus; **: $P<0.01$

表 5 3 种石斑鱼的遗传分化系数和基因流
Tab.5 Genetic differentiation coefficient and gene flow of three grouper populations

位点 Locus	群内近交 系数 F_{is}	总群体近 交系数 F_{it}	群体间分 化系数 F_{st}	基因流 N_m
CA2	0.201 0	0.269 9	0.086 1	2.652 0
RH_GATA_003	0.098 9	0.274 4	0.194 7	1.033 9
PM12	0.063 9	0.253 9	0.203 0	0.981 3
RH_CA_001	-0.153 3	-0.005 9	0.127 8	1.706 3
An1	0.086 1	0.218 3	0.144 6	1.478 8
An11	0.621 1	0.639 9	0.049 5	4.802 0
An23	0.549 4	0.583 5	0.075 8	3.049 7
An15	0.108 8	0.153 5	0.050 2	4.733 6
An10	0.494 2	0.506 6	0.024 6	9.932 1
An22	0.272 1	0.348 9	0.105 5	2.120 1
DY73	0.346 3	0.399 2	0.080 8	2.842 2
An32	-0.033 3	0.318 1	0.340 1	0.485 0
An30	0.149 3	0.198 8	0.058 2	4.048 0
Gag023	0.248 3	0.645 9	0.529 0	0.222 6
DY52	0.528 9	0.584 0	0.117 0	1.885 9
DY230	-0.037 7	0.129 5	0.157 8	1.334 0
CX-6	0.356 7	0.505 1	0.230 7	0.833 9
CX-12	0.716 7	0.744 4	0.097 8	2.305 2
CX-14	-0.061 0	0.220 6	0.265 4	0.692 0
CX-20	-0.103 5	0.188 1	0.264 2	0.696 2
平均值 Mean	0.228 0	0.344 1	0.150 4	1.411 9

2.5 遗传距离、遗传相似系数与聚类分析

表 6 所示为 3 类石斑鱼群体间的遗传相似系数以及遗传距离情况。从表 6 可以看出, 杂交子代金虎斑与母

本棕点石斑鱼的遗传距离最近(0.117 5), 且遗传相似系数最高(0.889 2)。聚类分析(图 1)表明, 母本棕点石斑

鱼和杂交后代金虎斑聚为一支, 父本位于最外支。上述结果表明, 金虎斑与母本棕点石斑鱼的亲缘关系更近。

表 6 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑的遗传距离和遗传相似系数
Tab.6 Genetic distances and genetic similarity among *E. tukula*, *E. fuscoguttatus* and Jinhu grouper

物种 Species	蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	金虎斑 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. tukula</i> (♂)
蓝身大斑石斑鱼 <i>E. tukula</i>	—	0.488 4	0.636 1
棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	0.716 6	—	0.889 2
金虎斑 <i>E. fuscoguttatus</i> (♀) × <i>E. tukula</i> (♂)	0.452 3	0.117 5	—

注: Nei's 遗传相似系数(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

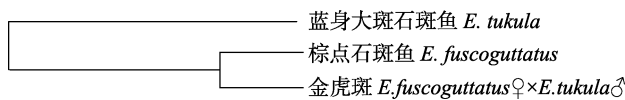


图 1 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑的 UPGMA 聚类分析图

Fig.1 UPGMA molecular tree based on genetic distance of *E. tukula*, *E. fuscoguttatus* and Jinhu grouper

3 讨论

3.1 SSR 荧光标记技术的应用

微卫星荧光标记-半自动基因分型技术实现了 SSR 标记与高效、自动化技术的结合, 近年来得到广泛应用及改进。吕锋骅等(2010)利用 SSR 荧光标记技术对我国南方海域 4 种石斑鱼的遗传多样性及系统发生关系进行研究, 发现 4 类石斑鱼的遗传多样性均很丰富, 且分化关系明确。本研究通过 SSR 荧光标记技术分析了 20 对引物在 3 种石斑鱼群体中的多态性, 结果表明, 20 个微卫星位点的平均等位基因数为 10.75, 平均多态信息含量为 0.638 6, 20 个位点中存在 15 个高度多态位点, 可用于 3 类石斑鱼遗传多样性分析。

3.2 石斑鱼的遗传多样性

通过有效等位基因数, 可了解群体的遗传变异状况。本研究中, 相比等位基因数, 各位点的有效等位基因数均偏小, 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼及金虎斑的平均有效等位基因数分别为 2.412 8、4.367 9 和 3.370 6, 杂交子代有效等位基因数高于父本蓝身大斑石斑鱼, 低于母本棕点石斑鱼, 基因杂合性介于亲本之间。

通过基因杂合度, 能够了解群体遗传变异具体程度, 可有效衡量群体遗传变异情况(Ott, 1999), 该值愈大, 说明遗传多样性愈高, 种群适应环境改变以及自然选择的能力愈强(Beardmore *et al*, 1997)。通过微卫星标记法, Zeng 等(2008)围绕鞍带石斑鱼开展了遗

传多样性分析, 其观测杂合度和期望杂合度范围分别为 0.200~0.733 和 0.185~0.801; 董秋芬等(2007)的研究结果表明, 9 种石斑鱼平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.589 8、0.472 8; 尹绍武等(2008)分别对海南近海的点带石斑鱼野生以及养殖群体开展了遗传变异研究, 研究发现, 在杂合度上, 野生与养殖群体无明显不同($P=0.637>0.05$), 二者种质资源均较好。本研究结果显示, 杂交子代金虎斑平均观测杂合度(0.473 6)与母本棕点石斑鱼(0.474 9)近似, 而比父本蓝身大斑石斑鱼(0.385 5)高, 存在部分遗传变异。

多态信息含量是等位基因频率和数目变化的函数, 其范围在 0~1 之间, 通常认为 $PIC>0.5$ 为高度多态, 若 $0.25<PIC<0.5$, 则为中度多态, $PIC<0.25$ 为低度多态(Botstein *et al*, 1980)。本研究中, 蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼及二者杂交子代金虎斑平均多态信息含量分别为 0.491 9、0.645 3 和 0.555 1, 棕点石斑鱼与金虎斑均表现为高度多态, 父本蓝身大斑石斑鱼为中度多态, 金虎斑多态性高于父本、低于母本, 与同是石斑鱼杂交子代的虎龙杂交斑(0.5426)(周翰林等, 2012)、云龙石斑鱼(0.544 6 或 0.481 8)(唐江等, 2018; 李炎璐等, 2018)的多态性相近, 具有一定杂交优势。

哈迪-温伯格平衡定律主要反映群体中等位基因频率和基因型频率之间的关系。本研究 3 种石斑鱼群体多个位点均处于不平衡状态, 尤其是棕点石斑鱼有 13 个基因座存在不平衡现象, 造成这种现象的原因可能是金虎斑为人工繁殖而来的子一代, 亲本经过人工选择、数量有限, 限制了基因间的交流(唐江等, 2018)。因此, 在选育过程中, 应该避免形成封闭群体, 扩大亲本选择范围。

3.3 群体遗传结构

影响种群遗传结构的因素有生境、地理隔离、种群瓶颈、基因流和选择等, 物种适应环境变化主要通

过必要的遗传变异,对广布种的种群遗传学研究能够发现种群的遗传隔离和潜在的种的分化(全迎春等, 2006)。本研究结果中, 3 种石斑鱼群体平均遗传分化系数是 0.150 4, 群体间遗传分化较大($F_{st} = 0.15 \sim 0.25$); 基因流是 1.411 9, 能够有效抑制因遗传漂变所致的种群间分化(Wright, 1978)。群体间存在遗传分化的主要原因是基因流的存在, 本研究虽然存在基因流, 但群体仍出现较大分化, 推测可能与亲本的人工选择有关(Shapiro *et al.*, 1969)。

群体间遗传分化和变异可以通过遗传距离来反映, 群体间遗传距离愈大, 亲缘关系愈远, 遗传分化愈大。本研究中, 父本蓝身大斑石斑鱼与母本棕点石斑鱼的遗传距离最远(0.716 6), 杂交子代金虎斑与母本之间的遗传距离最近(0.117 5)。亲本之间的遗传距离是衡量亲本间异质性的一个重要指标, 且遗传距离与杂种优势呈正相关(Dong, 1998), 遗传育种方面, 为防止盲目进行杂交实验, 可以通过遗传距离的大小预测杂交组合的优劣性(孙少华等, 2000)。

本研究利用 20 对微卫星标记, 对蓝身大斑石斑鱼、棕点石斑鱼和金虎斑的遗传多样性进行研究, 发现金虎斑存在较为丰富的遗传多样性表现, 对环境的适应能力较好, 亲缘关系与母本更近, 体现出一定杂交优势。

参 考 文 献

- BEARDMORE J A, MAIR G C, LEWIS R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 1997, 28(10): 829–839
- BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- CHEN S P, DING S X, CHEN J H, *et al.* Genetic diversity of the red spotted grouper in China population using simple sequence repeat markers. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science)*, 2012, 51(3): 83–89 [陈省平, 丁少雄, 陈嘉慧. 赤点石斑鱼群体遗传结构的微卫星分析. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(3): 83–89]
- CHISTIakov D A, HELLEMANS B, VOLCKAERT F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 2006, 255(1/2/3/4): 1–29
- DONG Q F, LIU C F, GUO Y S, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of nine species of grouper in genus *Epinephelus*. *Hereditas*, 2007, 29(7): 837–843 [董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 9 种石斑鱼遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析. 遗传, 2007, 29(7): 837–843]
- DONG Z, ZHOU E. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 1998, 29(8): 595–600
- GUAN F, YANG L G, JIA M W, *et al.* Microsatellite structure and its application of detection techniques. *Journal of Biology*, 2004, 21(2): 1–3, 13 [管峰, 杨利国, 贾名威, 等. 微卫星的构成及其检测技术. 生物学杂志, 2004, 21(2): 1–3, 13]
- LI Y L, CHEN C, CHEN J G, *et al.* Microsatellite analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and hybrid F_1 . *Hans Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 8(10): 1149–1157 [李炎璐, 陈超, 陈建国, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼与杂交 F_1 的微卫星分析. 农业科学, 2018, 8(10): 1149–1157]
- LIU L, LIU C W, GUO Y S, *et al.* Isolation and population genetic diversity analysis of microsatellite DNA markers in yellow grouper (*Epinephelus awoara*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(1): 22–29 [刘丽, 刘楚吾, 郭昱嵩, 等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析. 中国水产科学, 2008, 15(1): 22–29]
- LÜ F H, HAN J, DONG Y, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationships of four grouper species in genus *Epinephelus* sample from sea area of southern China. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(6): 9–18 [吕锋骅, 韩洁, 董颖, 等. 中国南方海域 4 种石斑鱼的遗传多样性及分子系统发生关系的分析. 动物学杂志, 2010, 45(6): 9–18]
- NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70(12): 3321–3323
- OTT J. Analysis of human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, 1999
- QUAN Y C, LI D Y, CAO D C, *et al.* Population genetic variation and structure analysis on five populations of mirror carp *Cyprinus carpio* L. using microsatellites. *Hereditas*, 2006, 28(12): 1541–1548 [全迎春, 李大宇, 曹鼎辰, 等. 微卫星 DNA 标记探讨镜鲤的种群结构与遗传变异. 遗传, 2006, 28(12): 1541–1548]
- SHAPIRO A M, EHRlich P R, RAVEN P H, *et al.* Differentiation of population. *Science*, 1969, 165(3899): 1228–1232
- SUN S H, SANG R Z, SHI S K, *et al.* Prediction and evaluation of heterosis of beef cattle and their application. *Journal of Genetics and Genomics*, 2000, 27(7): 580–589 [孙少华, 桑润滋, 师守堃, 等. 肉牛杂交优势预测、评估及其应用研究. 遗传学报, 2000, 27(7): 580–589]
- TANG J, TIAN Y S, LI Z T, *et al.* Analysis of genetic characters in *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus* and their hybrids. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(5): 819–829 [唐江, 田永胜, 李振通, 等. 云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼及其杂交后代遗传性状分析. 农业生物技术学报, 2018, 26(5): 819–829]
- TIAN Y S, TANG J, MA W H, *et al.* Development and growth of hybrid offspring of brown grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × blue speckled grouper *Epinephelus tulcula* (♂) using

- cryopreserved sperm. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 36–47 [田永胜, 唐江, 马文辉, 等. 蓝身大斑石斑鱼冷冻精子(♀)与棕点石斑鱼(♂)杂交后代发育及生长特征分析. *渔业科学进展*, 2019, 40(6): 36–47]
- WRIGHT S. *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press, 1978
- WU Y P, TIAN Y S, LI Z T, *et al.* Analysis on morphological difference between hybrid *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂ and its parents. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(6): 17–22 [吴玉萍, 田永胜, 李振通, 等. 棕点石斑鱼(♀) × 蓝身大斑石斑鱼(♂)杂交后代与亲本的形态差异. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(6): 17–22]
- YIN S W, LIAO J Q, HUANG H, *et al.* Genetic polymorphism of microsatellite DNA of natural and cultured populations of *Epinephelus malabaricus* in the sea close to Hainan, China. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008(2): 215–219 [尹绍武, 廖经球, 黄海, 等. 海南近海点带石斑鱼野生和养殖群体微卫星多态分析. *应用与环境生物学报*, 2008(2): 215–219]
- ZENG H S, DING S X, WANG J, *et al.* Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* Bloch). *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(4): 805–807
- ZHOU H L, ZHANG Y, QI X, *et al.* SSR analysis of the heterosis in the two grouper hybrids. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(2): 161–169 [周翰林, 张勇, 齐鑫, 等. 两种杂交石斑鱼子一代杂种优势的微卫星标记分析. *水产学报*, 2012, 36(2): 161–169]

(编辑 冯小花)

Genetic Diversity Analysis of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) and *E. tukula* (♂) Hybrids

WU Yuping^{1,3}, TIAN Yongsheng^{1,2①}, WANG Linna^{1,2}, LI Zhentong^{1,4}, ZHANG Jingjing^{1,4}, LI Linlin^{1,5}, LI Ziqi^{1,4}, CHEN Shuai^{1,4}, MA Wenhui⁶, WANG Qingbin⁶, LI Bo⁶

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 5. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 6. Mingbo Aquatic Co. Ltd., Laizhou, Shandong 261400, China)

Abstract The genetic diversity of Jinhua grouper hybrids (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. tukula* ♂) and their parents were analyzed via microsatellites. The results detected 215 alleles at 20 microsatellite loci, with an average polymorphic information content (PIC) of 0.638 6. The highest average effective allele number (N_e) was measured in *E. fuscoguttatus* (4.367 9), followed by the hybrids (3.370 6) and *E. tukula* (2.412 8). The average observed heterozygosity values (H_o) were 0.385 5 (*E. tukula*), 0.474 9 (*E. fuscoguttatus*), and 0.473 6 (hybrids), and the average PIC values were 0.491 9, 0.645 3, and 0.555 1, respectively. The three grouper populations were averaged to calculate the inbreeding coefficient (F_{is} ; 0.228 0), total population inbreeding coefficient (F_{it} ; 0.344 1), genetic differentiation coefficient (F_{st} ; 0.150 4), and gene flow (N_m ; 1.411 9), but differentiation among the populations was also observed. Cluster analysis, performed by the unweighted pair group method with arithmetic mean, placed the hybrids and *E. fuscoguttatus* into one group, indicating a close relationship. Prior studies showed that the Jinhua grouper is genetically diverse, which allowed for selective breeding, hybrid generation, and exploration of the genetic basis of heterosis.

Key words *Epinephelus fuscoguttatus*; *E. tukula*; Hybrid; Microsatellite markers; Genetic diversity

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn