

两种杂交石斑鱼子一代杂种优势的微卫星标记分析

周翰林¹, 张勇¹, 齐鑫¹, 张海发², 张磊², 王乐¹,
蒙子宁¹, 刘晓春¹, 林浩然^{1,3*}

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省大亚湾水产试验中心, 广东 惠州 516081;

3. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要: 使用6对微卫星引物对两种杂交子一代(青龙斑和虎龙斑)及其亲本(斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼)共5个群体进行微卫星分析, 计算等位基因频率、有效等位基因数、基因杂合度、多态信息含量、相似指数和Nei氏遗传距离。结果显示, 在5种石斑鱼中, 棕点石斑鱼的平均有效等位基因数最大(6.8493), 最小的是鞍带石斑鱼(2.6086)。6对微卫星引物在这5个群体中具有丰富的多态性, 平均多态信息含量(PIC)分别为0.6667、0.7513、0.4419、0.6640、0.5426。在平均观测杂合度(H_o)中, 虎龙斑和青龙斑的最高均为0.9400, 鞍带石斑鱼的最低为0.5083。遗传距离和遗传相似率结果显示, 青龙斑和虎龙斑均与父本鞍带石斑鱼的亲缘关系较近。杂交子一代群体的等位基因基本来自父母本群体双方, 可推断杂交子一代的遗传物质来自父母双方, 属两性融合生殖, 是真正意义上的杂交种。杂交后代的遗传变异水平明显增强, 这是杂种优势得以形成的重要遗传物质基础。

关键词: 斜带石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 棕点石斑鱼; 杂交子代; 微卫星

中图分类号: Q 321⁺.6; S 917

文献标志码: A

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)都隶属于鲈形目(Perciformes), 鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*)。斜带石斑鱼俗称青斑, 主要分布于西太平洋硫球群岛、澳大利亚、贝劳和非济群岛的东部, 在我国主要分布于在台湾、广东、海南沿海。斜带石斑鱼对环境的适应能力强、生长速度快、肉质鲜美、营养丰富, 是我国重要的经济鱼类。鞍带石斑鱼俗称龙趸、龙胆石斑鱼, 主要分布于东南亚和澳洲海域, 在我国主要产于海南岛等海域, 但数量稀少。鞍带石斑鱼具有生长速度快, 抗病性强等诸多优点, 且肌肉氨基酸组成与人体氨基酸组成较为接近, 营养价值极高, 是目前养殖前景极大的石斑鱼种类。棕点石斑鱼是一种暖水性及

广盐性的中下层鱼类, 主要分布于太平洋和印度洋热带及亚热带海区, 其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 是目前我国沿海地区主要的海水养殖鱼类^[1-5]。为了得到肉质鲜美、营养丰富、生长速度快以及抗病力强的石斑鱼新品种, 我们利用人工授精的杂交方法, 由斜带石斑鱼(♀)和鞍带石斑鱼(♂)杂交获得子一代青龙斑, 由棕点石斑鱼(♀)和鞍带石斑鱼(♂)杂交获得子一代虎龙斑。在养殖试验中, 两种杂交石斑鱼子一代在生长和抗病力方面均呈现出杂种优势, 是非常值得开发的优良新品种^[6]。微卫星标记因多态性丰富、信息含量丰富、杂合度高、共显性遗传、数量多而分布广以及检测快速方便等优点而倍受推崇^[7]。在远缘杂交育种上, 微卫星标记可以用于分析亲本与杂交子代的遗传关系、探测杂种优势、分析群

收稿日期:2011-08-13 修回日期:2011-10-19

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903046);国家自然科学基金面上项目(30871914);广东省科技计划项目(2008B020800010, 2010B090400551, 2011B020307009);广东省海洋渔业科技推广专项(A200800H01, A200900H01)

通讯作者:林浩然, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

体的遗传变异等方面。由于两种杂交石斑鱼子一代的遗传物质基础尚未研究,本研究使用6对微卫星引物对两种杂交子一代青龙斑和虎龙斑及其亲本共5个群体进行微卫星分析,计算等位基因频率、有效等位基因数、基因杂合度、多态信息含量、相似指数和Nei氏遗传距离,以期能分析两种杂交石斑鱼子一代与亲本的遗传关系,在分子水平上为其杂种优势研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

亲鱼(斜带石斑鱼、鞍带石斑鱼和棕点石斑鱼)均取自广东省大亚湾水产试验中心,杂交试验于2009年7—8月进行,分别以斜带石斑鱼、棕点石斑鱼为母本,鞍带石斑鱼为父本进行种间远缘杂交。选择体色和体形正常、性腺发育成熟的

健康亲鱼,将亲鱼用丁香酚麻醉,人工挤压亲鱼腹部,采集成熟卵子和精液,湿法人工授精获得受精卵,放入孵化池孵出仔鱼,再将仔鱼转移至土塘培育,30 d后收集鱼苗放入室内水泥池培育。每种样本数量为20个个体,每个样本剪取鳍条保存于95%酒精中。

1.2 方法

总DNA的提取 DNA提取方法参照天根海洋动物组织DNA提试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit)说明。DNA放置在4℃下保存备用,放置在-80℃下长期保存。

微卫星引物 参考文献[8-10]的方法,使用本实验室在英潍捷基(上海)贸易有限公司STR实验项目中的6对荧光标记引物(Pm02、CA-2、CA-6、GAA-1、RH_GATA_003和Ec_122)(表1)。

表1 实验所采用的6对微卫星标记的特征
Tab.1 The characteristics of 6 microsatellite markers in this experiment

位点 loci	引物序列(5'-3') primer sequence	荧光 dye	重复核 repeat motif	退火温度 annealing temperature	登录号 GenBank accession no.
CA-2	GACTTGATTGAGCAAAATAAAGATG AGAGACGGTGCCAGTAAATGAA	HEX	(CA) _N	55	AF539606
CA-6	GTGTTGCTGGGGTTACTAATGAAG TTAGACACATTGTCACGATGGTCC	HEX	(CA) _N	50	AF539608
GAA-1	GGAGTGTTAAATATGCCACCA CAGAAATCGCTGAGGACAAGAG	HEX	(GAA) _N	60	AF539612
RH_GATA_003	GGGCAATTTGGTTCTTCACA TGTC AATGCCACAGGATACA	6-FAM	(GATA) _N	57	DQ223790
Pm02	GATCAGCCTGTTAGCCCTGGATAA CCCCCTGGCCAAGTCACAG	6-FAM	(CA) _N	55	AY688377
Ec_122	CATTCCTTAAAGTATTCTGTG CCACAGCCAGTCTAGGTATTC	HEX	(CA) _N	55	GQ267997

PCR扩增和荧光检测 将DNA样品送至英潍捷基(上海)贸易有限公司,用ABI公司9700型PCR扩增仪进行PCR扩增反应。采用20 μL的扩增反应体系,其中含10×PCR Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTP混合液1.6 μL、50 mmol/L MgCl₂ 0.6 μL、Platinum Taq DNA聚合酶0.24 μL、4 μmol/L正反向引物各1 μL、25 ng DNA模板1 μL。使用96孔PCR封口硅胶板盖封住扩增板,带加热盖式功能扩增。PCR循环为94℃预变性2 min,1个循环;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃1 min,30个循环;72℃终延伸30 min,

4℃保存。不同引物选择适宜的退火温度。在ABI Prism 3730XL型基因分析仪上毛细管电泳。通过DataCollection软件和Genemapper软件进行数据的收集和分析,输出扫描图谱,精确计算出各SSR等位基因的大小。

数据处理 使用POPGEN 32软件计算等位基因数(observed alleles number, A_o)、有效等位基因数(effective alleles number, A_e)、等位基因频率(allele frequency)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、Nei氏遗传距离(genetic

distances) 以及遗传相似度 (genetic similarity)。根据 Botstein 等^[11] 提出的公式, 借助 Excel 2003 计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \left(2 \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^{n-1} p_i^2 p_j^2 \right)$$

式中, p_i 、 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因基因频率; n 为等位基因数。

使用 Mega 4.0 软件^[12] 通过 Nei 氏遗传距离^[13] 构建系统进化树, 采用的方法为算术平均数的非加权成组配对法 (unweighted pair group with arithmetic average, UPGMA)。

2 结果

2.1 引物通用性及扩增结果

使用 6 对微卫星引物对斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑基因组 DNA 进行检测, 其中 4 对引物 CA-2、CA-6、GAA-1 和 RH_GATA_003 在 5 种石斑鱼群体中都可扩增出条带, 除 CA-2 在鞍带石斑鱼中呈现单态性, 其他均表现出多态性, 而引物 Pm02 只在棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼以及杂交子代虎龙斑中扩增出条带, 引物 Ec_122 只在斜带石斑鱼、鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑中扩增出条带。

引物 CA-6 扩增的片段大小范围在棕点石斑鱼群体中为 294 ~ 318 bp, 而在鞍带石斑鱼群体为 280 ~ 288 bp, 在斜带石斑鱼群体中扩增出特异条带为 284、286 和 292 bp; 引物 GAA-1 扩增的片段大小范围在棕点石斑鱼群体中为 207 ~ 222 bp, 而在鞍带石斑鱼群体为 234 ~ 276 bp, 在斜带石斑鱼群体中扩增出特异条带为 219 bp; 引物 RH_GATA_003 扩增的片段大小范围在棕点石斑鱼群体中为 186 ~ 210 bp, 而在鞍带石斑鱼群体为 226 ~ 254 bp, 在斜带石斑鱼群体中扩增出特异条带为 202、214、218 和 222 bp, 可见引物 CA-6、GAA-1 和 RH_GATA_003 均能区分棕点石斑鱼群体和鞍带石斑鱼群体, 其中的斜带石斑鱼特异条带能区别该群体。引物 CA-2 中, 父本鞍带石斑鱼群体均为纯合型, 只有一条带 245 bp, 母本棕点石斑鱼群体和斜带石斑鱼群体有杂合型, 而杂交子代青龙斑与虎龙斑均为杂合型, 均有一条 245 bp 的条带, 父、母本条带同时出现 (图 1), 是鉴别杂交子代的最佳分子标记。引物 Ec_122 中,

父本鞍带石斑鱼群体的片段大小范围为 162 ~ 168 bp, 母本斜带石斑鱼群体的片段大小范围为 174 ~ 200 bp, 而杂交子代青龙斑均为杂合型, 父、母本条带同时出现 (图 2), 是亲本与杂交子代青龙斑相互区别的最佳分子标记 (表 2 和表 3)。

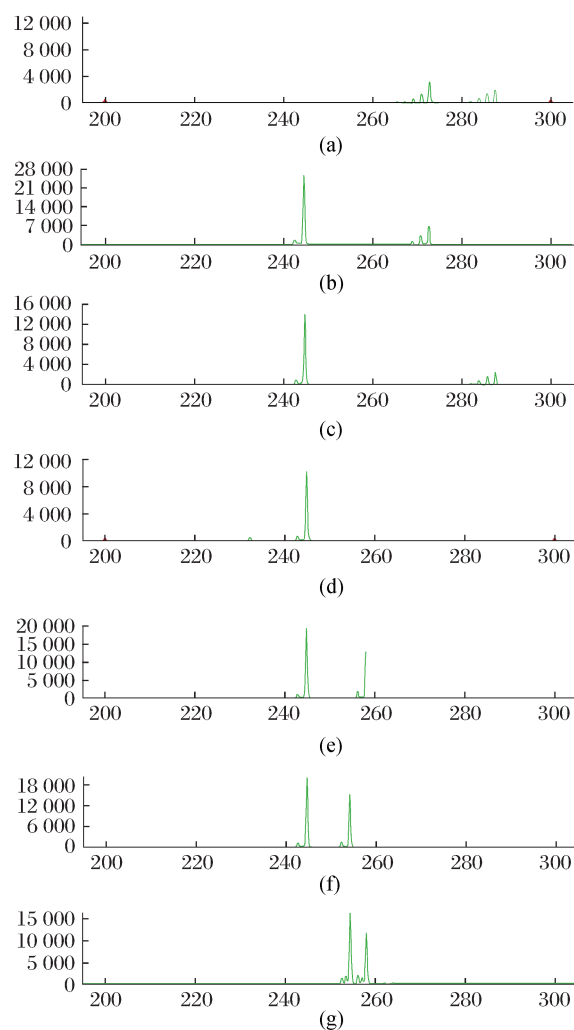


图 1 引物 CA-2 的毛细管电泳峰值图

(a) 为棕点石斑鱼个体, 条带大小为 273 和 287 bp; (b), (c) 为虎龙斑个体, 条带大小分别为 245 和 273 bp, 245 和 287 bp; (d) 为鞍带石斑鱼个体, 条带大小为 245 bp; (e), (f) 为青龙斑个体, 条带大小分别为 245 和 255 bp, 245 和 259 bp; (g) 为斜带石斑鱼个体, 条带大小为 255 和 259 bp。

Fig. 1 Representative chromatogram microsatellites obtained using primer CA-2

(a) referred as *E. fuscoguttatus* [allele sizes = 273 and 287 bp]; (b) and (c) referred as Hulong grouper [(b): 245, 273 bp, (c): 245, 287 bp]; (d) referred as *E. lanceolatus* (245 bp); (e) and (f) referred as Qinglong grouper [(e): 245, 255 bp, (f): 245, 259 bp]; (g) referred as *E. coioides* (255, 259 bp).

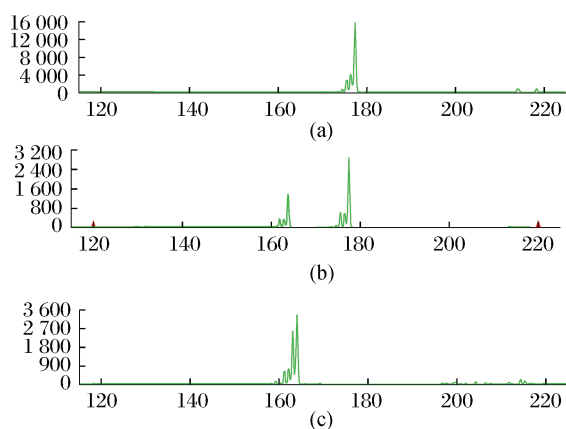


图2 引物 Ec₁₂₂ 的毛细管电泳峰值图

(a)为鞍带石斑鱼个体,条带大小为164 bp; (b)为青龙斑个体,条带大小为164和178 bp; (c)为斜带石斑鱼个体,条带大小为178 bp。

Fig.2 Representative chromatogram microsatellites obtained using primer Ec₁₂₂

(a) referred as *E. lanceolatus* (allele size = 164 bp); (b) referred as Qinglong grouper(164,178 bp); (c) referred as *E. coioides*(178 bp).

2.2 有效等位基因数、基因杂合度和多态信息含量

在5种石斑鱼中,棕点石斑鱼的平均有效等

位基因数最大(6.849 3),最小的是鞍带石斑鱼(2.608 6)。平均观测杂合度最高的是杂交子代虎龙斑和青龙斑(0.940 0),鞍带石斑鱼最低(0.508 3)。根据 Botstein 等^[11]提出的衡量标准,当 $PIC < 0.25$ 时,为低度多态性位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态性位点; $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态性位点。从位点来看,多态信息含量最高的为棕点石斑鱼的 CA-2 位点(0.917 2),最低的为鞍带石斑鱼的 CA-2 位点(0);从群体来看,5个群体的平均 PIC 为 0.613 3,其中棕点石斑鱼平均 PIC 为 0.751 3,杂交子代青龙斑平均 PIC 为 0.664 0,斜带石斑鱼平均 PIC 为 0.666 7,各位点均为高度多态性位点;杂交子代虎龙斑平均 PIC 为 0.542 6,高度多态性位点占总位点的 80.0%,中度多态性位点占总位点的 20.0%;鞍带石斑鱼平均 PIC 为 0.441 9,高度多态性位点占总位点的 50.0%,中度多态性位点占总位点的 33.3%,低度多态性位点占总位点的 16.7%。上述结果表明,本研究所选的 6 个微卫星位点的多态性丰富,可作为斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑的有效分子标记,用来分析 5 种石斑鱼群体的遗传多样性(表 4)。

表2 斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑的 4 个微卫星位点及等位基因频率统计

Tab.2 Allele frequencies of 4 microsatellite loci in *E. coioides*, *E. fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* and their hybridization

位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL	青龙斑 CL	斜带 石斑鱼 EC	位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL	青龙斑 CL	斜带 石斑鱼 EC
CA-6						CA-2					
280			0.700 0	0.100 0		245		0.500 0	1.000 0	0.450 0	
282		0.500 0	0.275 0	0.475 0		251					0.225 0
284					0.050 0	253	0.025 0				
286				0.025 0	0.150 0	255				0.275 0	0.100 0
288			0.025 0			257	0.075 0			0.050 0	0.250 0
292					0.100 0	259	0.075 0			0.225 0	0.425 0
294	0.075 0			0.200 0	0.100 0	263	0.075 0	0.025 0			
296	0.025 0			0.150 0	0.125 0	265	0.025 0	0.025 0			
298	0.175 0				0.450 0	267	0.100 0				
300	0.075 0				0.025 0	269	0.075 0				
302	0.050 0					271	0.125 0				
304	0.075 0	0.325 0		0.050 0		273	0.100 0	0.125 0			
306	0.100 0	0.025 0				275	0.025 0				
308	0.150 0	0.125 0				277	0.050 0				
310	0.075 0					279	0.050 0				
312	0.025 0					281	0.100 0				
314	0.025 0	0.025 0				285	0.025 0	0.025 0			

续表 2

位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL	青龙斑 CL	斜带 石斑鱼 EC	位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL	青龙斑 CL	斜带 石斑鱼 EC
316	0.050 0					287	0.025 0	0.150 0			
318	0.025 0					291		0.125 0			
322	0.025 0					293	0.025 0	0.025 0			
324	0.025 0					295	0.025 0				
334	0.025 0					RH_GATA_003					
GAA-1						186	0.125 0	0.050 0			
207	0.050 0					190	0.175 0	0.300 0			
210	0.450 0	0.500 0				194	0.250 0				
213	0.300 0					198	0.100 0				
216	0.175 0			0.275 0	0.475 0	202			0.050 0	0.375 0	
219				0.300 0	0.300 0	206	0.150 0				
222	0.025 0			0.075 0	0.225 0	210	0.200 0		0.425 0	0.375 0	
234			0.100 0	0.125 0		214			0.075 0	0.050 0	
237			0.300 0	0.075 0		218			0.075 0	0.075 0	
240			0.100 0			222					0.025 0
243		0.175 0	0.300 0	0.050 0		226		0.175 0			
249		0.325 0		0.100 0		230		0.200 0			0.100 0
276			0.200 0			234		0.250 0	0.075 0		
						238		0.500 0	0.175 0	0.050 0	
						242			0.125 0		
						250		0.150 0	0.175 0	0.125 0	
						254		0.025 0			

注:EF:棕点石斑鱼;FL:虎龙斑;EL:鞍带石斑鱼;CL:青龙斑;EC:斜带石斑鱼。以下各表注同。

Notes:EF:*E. fuscoguttatus*; FL:Hulong grouper; EL:*E. lanceolatus*; CL:Qinglong grouper; EC: *E. coioides*. The same as the following.

表 3 斜带石斑鱼、鞍带石斑鱼和青龙斑,棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和虎龙斑的各 1 个微卫星位点及等位基因频率统计

Tab. 3 Allele frequencies of Pm02 microsatellite loci in *E. fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* and Hulong grouper and Ec_122 microsatellite loci in *E. coioides*, *E. lanceolatus* and Qinglong grouper

位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL	位点/ 等位基因 loci/allele	棕点 石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带 石斑鱼 EL
Pm02				Ec_122			
155	0.025 0			162			0.325 0
157	0.075 0			164		0.350 0	0.525 0
159	0.100 0			166		0.100 0	0.050 0
161	0.650 0	0.500 0	0.025 0	168			0.100 0
163	0.075 0			174	0.050 0	0.150 0	
165	0.050 0			176	0.375 0	0.200 0	
167	0.025 0	0.500 0	0.975 0	178	0.075 0	0.150 0	
				182	0.025 0		
				184	0.050 0		
				186	0.050 0	0.050 0	
				188	0.025 0		
				192	0.050 0		
				198	0.100 0		
				200	0.200 0		

表 4 斜带石斑鱼、棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼以及杂交子代青龙斑与虎龙斑的 5 个群体的遗传变异参数
 Tab.4 Parameters of genetic variation for the 5 populations of *E. coioides*,
E. fuscoguttatus, *E. lanceolatus* and their hybridization

位点 loci	参数 parameter	棕点石斑鱼 EF	虎龙斑 FL	鞍带石斑鱼 EL	青龙斑 CL	斜带石斑鱼 EC
CA-2	A_o	17.000 0	8.000 0	1.000 0	4.000 0	4.000 0
	A_e	12.903 2	3.265 3	1.000 0	3.018 9	3.292 2
	H_o	1.000 0	1.000 0	0.000 0	1.000 0	0.650 0
	H_e	0.946 2	0.711 5	0.000 0	0.685 9	0.714 1
	PIC	0.917 2	0.663 5	0.000 0	0.608 3	0.643 2
CA-6	A_o	16.000 0	5.000 0	3.000 0	6.000 0	7.000 0
	A_e	10.526 3	2.684 6	1.766 0	3.319 5	3.791 5
	H_o	1.000 0	1.000 0	0.500 0	0.800 0	0.500 0
	H_e	0.928 2	0.643 6	0.444 9	0.716 7	0.755 1
	PIC	0.897 7	0.562 6	0.358 9	0.661 1	0.708 6
GAA-1	A_o	5.000 0	3.000 0	5.000 0	7.000 0	3.000 0
	A_e	3.065 1	2.589 0	4.166 7	4.878 0	2.730 4
	H_o	0.600 0	1.000 0	0.900 0	0.900 0	0.550 0
	H_e	0.691 0	0.629 5	0.779 5	0.815 4	0.650 0
	PIC	0.617 4	0.539 2	0.720 4	0.767 2	0.561 2
RH_GATA_003	A_o	6.000 0	4.000 0	6.000 0	8.000 0	6.000 0
	A_e	5.517 2	2.739 7	5.128 2	4.278 1	3.333 3
	H_o	0.900 0	0.700 0	0.800 0	1.000 0	0.700 0
	H_e	0.839 7	0.651 3	0.825 6	0.785 9	0.717 9
	PIC	0.793 2	0.572 9	0.775 3	0.744 8	0.649 7
Pm02	A_o	7.000 0	2.000 0	2.000 0		
	A_e	2.234 6	2.000 0	1.051 2		
	H_o	0.500 0	1.000 0	0.050 0		
	H_e	0.566 7	0.512 8	0.050 0		
	PIC	0.530 9	0.375 0	0.047 6		
Ec_122	A_o			4.000 0	6.000 0	10.000 0
	A_e			2.539 7	4.545 5	4.819 3
	H_o			0.800 0	1.000 0	1.000 0
	H_e			0.621 8	0.800 0	0.812 8
	PIC			0.749 3	0.538 4	0.771 0
平均 average	A_o	10.200 0	4.400 0	3.500 0	6.200 0	6.000 0
	A_e	6.849 3	2.655 7	2.608 6	4.008 0	3.593 3
	H_o	0.800 0	0.940 0	0.508 3	0.940 0	0.680 0
	H_e	0.794 4	0.629 7	0.453 6	0.760 8	0.730 0
	PIC	0.751 3	0.542 6	0.441 9	0.664 0	0.666 7

2.3 遗传距离和遗传相似指数以及聚类分析

鞍带石斑鱼与杂交子代遗传相似率最高(0.547 6),其次为斜带石斑鱼和杂交子代(0.530 6),而斜带石斑鱼和鞍带石斑鱼相似率最低(0.011 0)、遗传距离最大(表 5)。根据遗传距离,采用 UPGMA 法构建它们之间的聚类分析图(图 3),由图中可知,鞍带石斑鱼和杂交子代先聚为一支,斜带石斑鱼位于最外支。由此可见,杂交

子代青龙斑和父本鞍带石斑鱼的亲缘关系较近。

棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代虎龙斑之间的遗传距离和遗传相似率见表 6,鞍带石斑鱼与杂交子代遗传相似率最高(0.554 2),其次为棕点石斑鱼和杂交子代(0.481 4),而棕点石斑鱼和鞍带石斑鱼相似率最低(0.022 9)、遗传距离最大。根据遗传距离,采用 UPGMA 法构建它们之间的聚类分析图(图 4),由图中可知,鞍带石斑鱼

和杂交子代先聚为一支,棕点石斑鱼位于最外支。由此可见,杂交子代虎龙斑和父本鞍带石斑鱼的亲缘关系较近。

表 5 斜带石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代青龙斑之间的遗传距离和遗传相似指数

Tab.5 Genetic distances and genetic similarity among *E. coioides*, *E. lanceolatus* and Qinglong grouper

	EC	EL	CL
EC		0.011 0	0.530 6
EL	4.508 7		0.547 6
CL	0.633 7	0.602 3	

表 6 棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代虎龙斑之间的遗传距离和遗传相似指数

Tab.6 Genetic distances and genetic similarity among *E. fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* and Hulong grouper

	EF	EL	FL
EF		0.022 9	0.481 4
EL	3.778 1		0.554 2
FL	0.731 1	0.590 3	

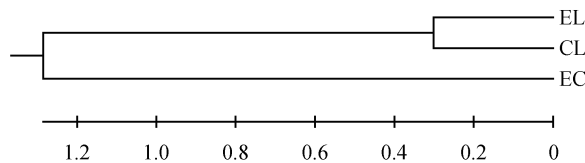


图 3 斜带石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代青龙斑的 UPGMA 聚类分析图

Fig.3 UPGMA molecular trees based on genetic distance of *E. coioides*, *E. lanceolatus* and Qinglong grouper

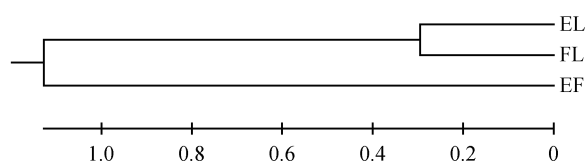


图 4 棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交子代虎龙斑的 UPGMA 聚类分析图

Fig.4 UPGMA molecular trees based on genetic distance of *E. fuscoguttatus*, *E. lanceolatus* and Hulong grouper

3 讨论

鱼类远缘杂交是鱼类遗传改良的重要方法之一。鱼类远缘杂交子代的遗传方式常见的主要有两种,一种是发生真正的精卵结合,如翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*) (♀) × 团头鲂

(*Megalobrama amblycephala*) (♂)^[14], 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (♀) × 山女鳟(*Oncorhynchus masou*) (♂)^[15], 另一种是未发生精卵的结合,即雌核/雄核发育,王晓清等^[16]研究表明大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (♀) 与鲢(*Miichthys miiuy*) (♂) 杂交子代属异精雌核发育个体。许多鱼类远缘杂交组合使得亲本优良性状得以结合,产生具有杂种优势的子代^[17]。

微卫星标记因多态性丰富、信息含量丰富、杂合度高、共显性遗传、数量多而分布广以及检测快速方便等优点而倍受推崇^[7]。在鱼类远缘杂交育种上,微卫星标记可以用于分析亲本与杂交子代的遗传关系,由于微卫星标记是一种共显性的分子标记,遵循孟德尔的分离规律,真正的杂交子代遗传物质一方来自于父本而另一方来自于母本,因而微卫星标记能分析杂交子代遗传特性。例如,王晓清等^[16]对大黄鱼(♀)、鲢(♂)以及杂交子代进行了微卫星和 AFLP 标记的比较分析,结果均表明杂交子代与母本大黄鱼之间具有极高的遗传同质性,属异精雌核发育个体;张玉勇等^[15]对虹鳟、山女鳟及其杂交子代(虹鳟♀ × 山女鳟♂)进行微卫星分析,结果表明虹鳟和山女鳟存在杂交现象,虹鳟和山女鳟杂交子代的遗传符合孟德尔遗传规律,属两性融合生殖,是真正意义上的杂交种。微卫星标记还广泛用于杂交育种上探测杂种优势,例如尹绍武等^[18]利用 12 对微卫星引物对红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*) (♀)、千年笛鲷(*Lutjanus sebae*) (♂) 及其红鳍笛鲷(♀) × 千年笛鲷(♂) 子一代(F₁) 3 个群体进行分析,结果表明多态信息含量、有效等位基因数、杂合度、群体遗传距离等均显示 F₁ 代有杂种优势。

本研究中使用 6 对微卫星标记研究结果表明,所检测的杂交子代青龙斑和虎龙斑群体的等位基因基本上分别来自父母本群体,虽然在杂交子代中出现一些新的等位基因、一些亲本基因的缺失以及基因频率产生差异,但总体上遵循孟德尔的分离规律,即杂交子代遗传物质一方来自于父本,一方来自于母本,可以确定是真正意义上的杂交子代。

有效等位基因数可表明群体中等位基因间的相互影响,是分析群体遗传变异的指标之一。Hearne 等^[19]研究表明在群体中等位基因分布越

均匀,有效等位基因数就越接近测得的等位基因数。由于检测位点的等位基因分布不均,常常测得的等位基因数大于有效等位基因数^[20],本研究结果亦如此。从表4可见,杂交子代虎龙斑的有效等位基因数,大于父本鞍带石斑鱼而小于母本棕点石斑鱼,说明虎龙斑的基因杂合性有所增强,而杂交子代青龙斑大于父本鞍带石斑鱼和母本斜带石斑鱼,可见青龙斑和虎龙斑的基因杂合性得到明显增强,这是形成杂种优势的重要遗传物质基础之一。

基因杂合度是评估群体遗传变异的最适指标之一^[21],杂合度能表示群体内个体遗传变异的程度,数值高说明变异大。本研究中,杂交子代虎龙斑和青龙斑的观测杂合度(皆为0.9400)均高于亲本棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和斜带石斑鱼(分别为0.8000、0.5083和0.6800),可见远缘杂交能有效地增加群体遗传结构变异,提高群体的遗传多样性。多态信息含量是度量等位基因多态性的一个理想指标,多态信息含量值越大,就表明群体杂合个体的比例越大,就能显示更多的遗传信息^[11]。本研究中各微卫星位点具有较高的多态信息含量,杂交子代虎龙斑和青龙斑的平均多态信息含量均大于父本鞍带石斑鱼而分别小于母本棕点石斑鱼和斜带石斑鱼。进一步说明杂交子代在遗传多样性和遗传信息等方面有所增高。

杂种优势是指两个或几个遗传物质不同的亲本通过杂交产生的杂交后代在抗逆性、生长和品质等方面优于其亲本的现象。在形成杂种优势的研究中发现,亲本之间的异质性越大,杂合位点数目越多,杂交后代就越可能获得杂种优势。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,遗传距离越大,杂交后代的杂种优势就越强^[22]。本研究中,杂交组合斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)中父母本间的遗传距离为4.5087,明显大于棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)组合中父母本间的遗传距离(3.7781),因而青龙斑比虎龙斑更具有杂种优势。

参考文献:

- [1] Heemstra P C, Randall J E. Groupers of the world [J]. FAO Fisheries Synopsis, 1993, 16 (125): 130-132.
- [2] Sadovy Y, Cornish A S. Reef fishes of Hong Kong [M]. Hong Kong: Hong Kong University

Press, 2000.

- [3] 张海发,王云新,刘付永忠,等. 鞍带石斑鱼人工繁育及胚胎发育研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4): 36-40.
- [4] 龚孟忠,陈慧,范希军. 龙胆石斑鱼引种及人工育苗技术的初步研究[J]. 福建水产, 2004, 3(1): 47-50.
- [5] 成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [6] 广东大亚湾水产试验中心. 广东培育出石斑鱼杂交苗种[J]. 水产科学, 2010, 2(21): 45.
- [7] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7(3): 331-363.
- [8] Zhu Z Y, Lo L C, Lin G, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from red coral grouper (*Plectropomus maculatus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5(3): 579-581.
- [9] Rivera M A J, Graham G C, Roderick G K. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian grouper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(2): 126-129.
- [10] Ramirez M A, Patricia A J, Planas S, et al. New microsatellite resources for groupers (Serranidae) [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(3): 813-817.
- [11] 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.
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596.
- [13] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973, 70(12): 3321.
- [14] 顾志敏,贾永义,叶金云,等. 翘嘴红鲌(♀)×团头鲂(♂)杂种F₁的形态特征及遗传分析[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 533-544.
- [15] 张玉勇,白庆利,贾智英,等. 虹鳟,山女鳟及其杂交子代(虹鳟♀×山女鳟♂)的微卫星分析[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 188-195.
- [16] 王晓清,王志勇,谢中国,等. 大黄鱼(♀)与鲩(♂)杂交的遗传分析[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 51-57.

- [17] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [18] 尹绍武,廖经球,陈国华,等. 红鳍笛鲷(♀)×千年笛鲷(♂)子一代杂种优势的微卫星标记分析[J]. 水产科学,2008,27(6):271-275.
- [19] Hearne C M, Ghosh S, Todd J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits[J]. Trends Genet, 1992,8(8):288-294.
- [20] 李腾云,李思发. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼回交子代遗传变异的微卫星分析[J]. 上海水产大学学报,2008,17(4):6.
- [21] Ott J. Analysis of human genetic linkage[M]. Johns Hopkins University Press,1999.
- [22] Dong Z, Zhou E. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L [J]. Aquaculture Research,1998,29(8):595-600.

SSR analysis of the heterosis in the two grouper hybrids

ZHOU Han-lin¹, ZHANG Yong¹, QI Xin¹, ZHANG Hai-fa², ZHANG Lei², WANG Le¹,
MENG Zi-ning¹, LIU Xiao-chun¹, LIN Hao-ran^{1,3*}

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals,
School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Daya Bay Fisheries Development Center, Huizhou 516081, China;

3. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The marine grouper species are considered high value food fish in Southeast Asia. Aimed to get some new types of grouper, we have successfully cross-bred three species of grouper. The hybrid grouper was produced by fertilising the eggs of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), tiger grouper (*Epinephelus lanceolatus*) with the sperm of the giant grouper (*E. lanceolatus*) through the *in vitro* fertilisation technique. The hybrids combine morphological features of the two parent species. And they are healthy and growing well in sea cages and the finding will be good news for the aquaculture industry. The genetic diversity among orange-spotted grouper, tiger grouper, giant grouper and their hybrid F₁ generation population (Qinglong grouper and Hulong grouper) were tested by 6 microsatellite loci. The gene frequency, effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), polymorphism information contents (PIC), genetic similarity and Nei's genetic distances (D) were studied. The results showed that, the *E. fuscoguttatus* showed the most alleles (6.849 3), while the *E. lanceolatus* showed the least (2.608 6). Rich polymorphism was observed by the six primers, and the PIC values in the five populations were 0.666 7, 0.751 3, 0.441 9, 0.664 0, 0.542 6, respectively. And the F₁ generations showed the highest observed heterozygosity (H_o) of 0.940 0, while the *E. lanceolatus* showed the lowest value of 0.508 3. The results of genetic distances and genetic similarity showed that both F₁ generations had a close relationship with the male parent *E. lanceolatus*. The alleles of F₁ generations were mostly generated from both of their parents, which mean that the genetic materials were inherited from parents. And the higher genetic diversity that existed in the two hybrids indicated potential heterosis.

Key words: *Epinephelus coioides*; *Epinephelus lanceolatus*; *Epinephelus fuscoguttatus*; hybrid; SSR

Corresponding author: LIN Hao-ran. E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn