

## 莫荷罗非鱼“广福1号”与其亲本间DNA甲基化的差异分析

尚慧文<sup>1,2</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 朱华平<sup>1\*</sup>, 高风英<sup>1</sup>, 可小丽<sup>1</sup>, 卢迈新<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,

农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了探讨罗非鱼杂种优势形成过程中基因组DNA甲基化模式的变化, 运用甲基化敏感扩增多态技术(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)分析橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”的皮肤、肌肉和鳃等11种组织的DNA甲基化水平差异。采用16对引物进行选择性地扩增, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳带型分析结果显示: 莫荷罗非鱼“广福1号”及其亲本在不同组织间的甲基化水平存在组织特异性, 相同组织不同亲、子代罗非鱼间的甲基化程度亦不同; 橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼以及“广福1号”各组织平均总甲基化水平分别为32.21%、38.03%和29.77%, 莫荷罗非鱼“广福1号”的甲基化水平低于双亲; 与亲本相比, 莫荷罗非鱼“广福1号”的甲基化模式除了大多数保持稳定遗传(A、B、C类型分别为19.67%、29.99%、25.42%)之外, 24.92%胞嘧啶位点发生去甲基化和超甲基化, 且去甲基化位点(E类型, 15.73%)多于超甲基化位点(D类型, 9.19%)。研究表明, 莫荷罗非鱼“广福1号”基因组DNA的低甲基化特征和甲基化模式的重调可能与耐盐杂种优势有关。

**关键词:** 莫荷罗非鱼; 杂交亲本; 杂种优势; DNA甲基化; 甲基化敏感扩增多态技术

**中图分类号:** Q 321; S 965

**文献标志码:** A

罗非鱼是热带、亚热带暖水性鱼类, 隶属于鲈形目(Perciformes), 丽鱼科(Cichlidae), 共3个属100多个种, 具有繁殖力强、生长速度快、抗逆性强等优点, 已成为世界性的养殖鱼类之一<sup>[1]</sup>。中国水产科学研究院珠江水产研究所在2000年首次引进了橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)和荷那龙罗非鱼(*Oreochromis hornorum*)。以经过连续8代选育的橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼作为亲本, 种间杂交产生的F<sub>1</sub>——莫荷罗非鱼“广福1号”在2015年已通过国家水产新品种的审定(登记号GS-02-002-2015), 适宜在盐度0~30的水域养殖, 且雄性率达95%以上。急性耐盐实验结果表明, 莫荷罗非鱼“广福1号”幼鱼的96 h半致死盐度为33.74±0.94, 经过慢性盐度

驯化后其96 h半致死盐度可提升至112.93±4.87, 显著高于母本橙色莫桑比克罗非鱼和父本荷那龙罗非鱼幼鱼的96 h半致死盐度(24和21.56)<sup>[2]</sup>, 因此, 莫荷罗非鱼“广福1号”幼鱼在耐盐胁迫方面较亲本具有明显的杂种优势。由于“广福1号”雄性率高, 生长速度快, 养殖性能好, 已作为新型优良的罗非鱼耐盐品种, 在广东、广西、海南和天津等地进行推广养殖<sup>[3]</sup>。

杂种优势是指杂交后代在生长、繁殖、适应性和抗逆性等性状优于双亲的现象<sup>[4]</sup>。关于杂种优势的假说有很多, 其中最为经典的就是“显性假说”<sup>[5]</sup>、“超显性假说”<sup>[6]</sup>和“上位互补假说”<sup>[7]</sup>。由于这三种假说注重性状的表现, 而忽略杂种优势的形成过程, 所以并不能够全面解释杂种优

收稿日期: 2016-10-30 修回日期: 2017-03-21

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZC0401); 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 国家科技支撑计划子课题(2012BAD26B03)

通信作者: 朱华平, E-mail: zhhp2000@163.com

势。近年有研究表明,杂种优势所形成的等位基因变异有可能来自于表观基因组,表观遗传修饰能产生很多表观等位基因,这些表观等位基因在遗传背景相近的双亲中对基因表达有着不同的影响,从而产生杂种优势形成所需要的多种变异<sup>[8]</sup>。

表观遗传学是指不涉及自身基因组DNA序列改变的情况下,在基因或蛋白表达层面发生可稳定遗传修饰的现象,其中包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和小分子RNA干扰<sup>[9-10]</sup>等。作为重要的表观修饰之一,DNA甲基化常被作为“基因沉默”的标记<sup>[11]</sup>。并且,DNA甲基化已经证实在基因调控、基因组印记、DNA复制、染色质结构和X性染色体失活等方面扮演至关重要的角色<sup>[12-14]</sup>。DNA甲基化特别是胞嘧啶的甲基化,在真核生物中既可以保持整个基因组DNA稳定,又可以调控特定组织基因的表达<sup>[15]</sup>。对杂种优势而言,本质上就是不同基因差异表达的结果<sup>[16]</sup>。Cedar<sup>[17]</sup>研究表明,基因组DNA甲基化水平及分布与基因表达率显著相关。因此,杂种优势的形成与基因组DNA甲基化水平存在一定的内在联系。

本实验应用甲基化敏感扩增多态技术(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)对橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”各组织的甲基化水平进行检测分析,比较亲、子代罗非鱼各组织基因组DNA甲基化水平的差异及甲基化模式的变化,探讨DNA胞嘧啶甲基化与耐盐性状杂种优势的关系,为杂种优势机理的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用3种罗非鱼均由中国水产科学研究院珠江水产研究所高要水产种质工程基地提供,橙色莫桑比克罗非鱼[(39.05±7.94)g]、荷那龙罗非鱼[(47.2±5.38)g]和全雄性杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”[橙色莫桑比克罗非鱼♀×荷那龙罗非鱼♂,(3.55±0.52)g]各4尾,其中父、母本雌雄各2尾。实验鱼均取自于相同的淡水养殖水体中,统一管理。取鳃、肾脏、肠、皮肤、肌肉、尾鳍、脑、肝脏、心脏、脾脏和胃组织,置于无水乙醇中,-80℃保存备用。

### 1.2 基因组提取

基因组DNA提取采用天根生物有限公司的海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(TIANamp Marine Animals DNA Kit),具体操作步骤参照试剂盒说明书。1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性,紫外分光光度计检测DNA的浓度和纯度。DNA样品于-20℃保存备用。

### 1.3 甲基化扩增敏感多态性(MSAP)分析

参照Xiong<sup>[18]</sup>的方法,针对实验所用罗非鱼样品优化实验条件和程序,优化MSAP实验条件。

**双酶切和连接体系** 对各组织基因组DNA分别进行限制性内切酶(*Eco* R I /*Hpa* II 和 *Eco* R I /*Msp* I)双酶切反应:酶切体系为15.0 μL,包含500 ng基因组DNA, *Eco* R I、*Hpa* II 和 *Msp* I (Fermentas)各3U,1.5 μL 10×Tango缓冲液,剩余体积由ddH<sub>2</sub>O补齐。37℃水浴酶切6h。酶切结束后,在酶切产物中加入相应的*Eco* R I 接头引物50 pmol、*Hpa* II 或*Msp* I 接头引物5 pmol、T4 DNA连接酶(Fermentas)1.5 U、2.0 μL T4 DNA连接酶缓冲液,补双蒸水至20.0 μL,16℃连接过夜。连接产物稀释10倍后用于预扩增反应。接头引物序列见表1。

**预扩增反应** 1.0 μL连接产物稀释液为模板,10 pmol E和HM预扩增引物(序列见表1),0.5 U Taq DNA聚合酶(TaKaRa),20 pmol dNTPs,2.0 μL 10×PCR缓冲液,补双蒸水至20.0 μL。预扩增程序是94℃预变性5 min,94℃变性30 s,56℃退火1 min,72℃延伸1 min,共30个循环,72℃延伸5 min。预扩增PCR反应产物稀释20倍用于选择性扩增反应。

**选择性扩增反应** 1.0 μL预扩增产物稀释液为模板,10 pmol E和HM选择性扩增引物(序列见表1),10.0 μL 2×Easy PCR Supermix for PAGE (Transgen),补双蒸水至20.0 μL。选扩程序是94℃预变性5 min,第一轮扩增为94℃30 s,65℃(每个循环下降0.7℃)30 s,72℃1 min,共10个循环,第二轮扩增为94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,共25个循环,72℃延伸5 min。

**PAGE电泳** 取3.0 μL选择性PCR扩增产物,进行8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,160 V预电泳20 min,150 V电泳3.5 h后进行银染显色。

**MSAP数据统计与分析** 同一个组织

表 1 MSAP体系中接头和引物序列

Tab. 1 Sequence of adapters and primers used for the whole MSAP analysis

引物 primers	<i>EcoR</i> I (5'-3')	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (5'-3')
接头 adapters	EA <sub>1</sub> : CTCGTAGACTGCGTACC	HM <sub>1</sub> : GATCATGAGTCCTGCT
	EA <sub>2</sub> : AATTGGTACGCAGTC	HM <sub>2</sub> : CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物 pre-amplification primers	E <sub>0</sub> : GACTGCGTACCAATTCA	HM <sub>0</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGT
选择性扩增引物 selective amplification primers	E <sub>1</sub> : GACTGCGTACCAATTCAAC	HM <sub>1</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
	E <sub>2</sub> : GACTGCGTACCAATTCAAG	HM <sub>2</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
	E <sub>3</sub> : GACTGCGTACCAATTCAAT	HM <sub>3</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG
	E <sub>4</sub> : GACTGCGTACCAATTCACA	HM <sub>4</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCA
	E <sub>5</sub> : GACTGCGTACCAATTCACC	HM <sub>5</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
	E <sub>6</sub> : GACTGCGTACCAATTCAGA	HM <sub>6</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
	E <sub>7</sub> : GACTGCGTACCAATTCAGC	HM <sub>7</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
	E <sub>8</sub> : GACTGCGTACCAATTCATA	HM <sub>8</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA

DNA样品分别用内切酶*EcoR* I/*Hpa* II和*EcoR* I/*Msp* I酶切后选扩,选扩产物分为E/H、E/M两组进行PAGE电泳,有条带出现的计为“1”,无条带出现计为“0”。根据条带的有无可以分为4种条带类型:带型 I指E/H和E/M泳道均出现相同大小的条带(11),表示CCGG位点无甲基化位点或该位点存在单链DNA内侧胞嘧啶甲基化(C<sup>m</sup>CGG/GGCC);带型 II指仅在E/H泳道出现扩增条带(10),说明存在单链DNA外侧胞嘧啶甲基化位点(<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGG/GGCC或<sup>m</sup>CCGG/GGCC)即半甲基化位点;带型 III指仅在E/M泳道出现扩增条带(01),可认为在该酶切位点为双链DNA内侧胞嘧啶甲基化(C<sup>m</sup>CGG/GG<sup>m</sup>CC)也称全甲基化位点;带型 IV指E/H和E/M泳道均无条带,但在其他样品相同位置处出现条带,即为全甲基化位点(<sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGG/GG<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C))<sup>[19]</sup>。统计在50~1000 bp之间清晰可辨的条带,分析3种罗非鱼各组织的半甲基化水平、全甲基化水平及总甲基化水平,并利用SPSS 17.0进行方差分析和多重比较( $P=0.05$ )。其中,全甲基化位点数=带型 III+IV;总甲基化位点数=带型 II+III+IV;DNA甲基化水平(%)=总甲基化位点数/(带型 I, II, III, IV总和)<sup>[20]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 MSAP带型分析

从64对选择性扩增引物中优选出16对重复

性好、条带清晰的引物组合(E1-HM1、E1-HM8、E2-HM4、E2-HM6、E3-HM2、E3-HM3、E4-HM2、E4-HM5、E5-HM4、E5-HM5、E6-HM1、E6-HM6、E7-HM3、E7-HM8、E8-HM5、E8-HM6)用于选择性扩增,选扩产物通过PAGE电泳后获得清晰的扩增条带(图1)。MSAP扩增片段长度多在50~1000 bp,大部分集中在50~500 bp,大于500 bp条带很少,在本实验统计数据时不计在内。

### 2.2 不同组织间DNA甲基化水平差异分析

对母本橙色莫桑比克罗非鱼、父本荷那龙罗非鱼及其杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”3种鱼各组织基因组DNA进行MSAP分析,亲、子代罗非鱼不同组织间DNA甲基化水平分布见表2。总甲基化率经反正弦转换后再进行单因素方差分析,方差分析结果亦见表2。亲、子代罗非鱼各组织的甲基化水平统计分析显示,非甲基化位点占据大部分比例,各组织甲基化位点存在方式均以全甲基化方式为主,半甲基化位点为辅。在父本荷那龙罗非鱼11种组织中,肾脏基因组DNA的甲基化水平最高(42.47%),且肾脏和脾脏的甲基化水平显著高于肌肉(35.88%)、皮肤(35.61%)和胃组织(34.59%)( $P<0.05$ ),与其他各组织的甲基化水平差异不显著( $P>0.05$ );母本橙色莫桑比克罗非鱼中,DNA甲基化水平最高的是肝组织(35.04%),与脑组织和胃组织之间无显著

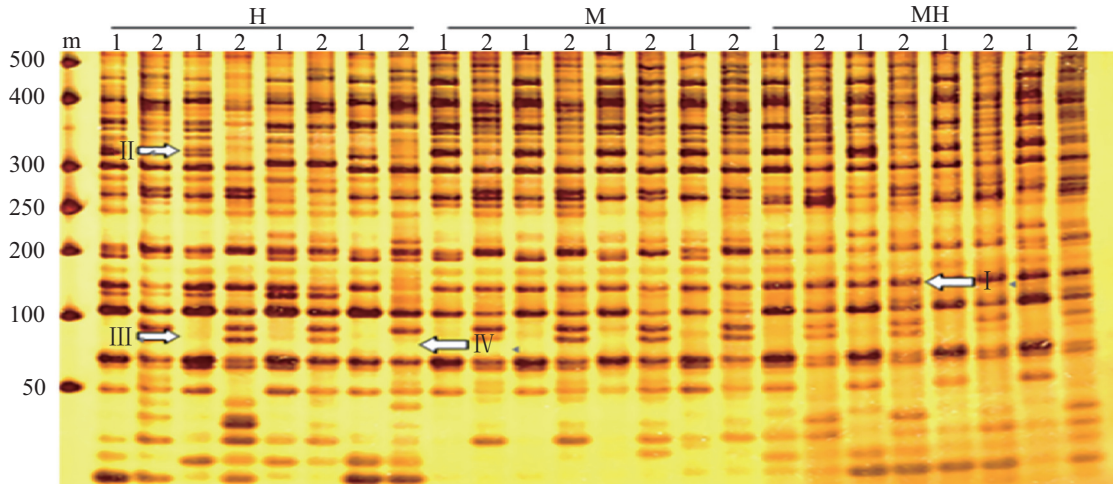


图1 莫荷罗非鱼“广福1号”及其亲本肝组织基因组DNA甲基化MSAP图谱(E4-HM5)

m: DNA分子量标准; 1: *EcoR* I /*Hpa* II 双酶切样品(EH); 2: *EcoR* I /*Msp* I 双酶切样品(EM); H: 荷那龙罗非鱼; M: 橙色莫桑比克罗非鱼; MH: 莫荷罗非鱼; Type I: 无甲基化位点或单链DNA内侧胞嘧啶甲基化; Type II: 单链DNA外侧胞嘧啶甲基化位点(半甲基化位点); Type III: 双链DNA内侧胞嘧啶甲基化(全甲基化位点); Type IV: 全甲基化位点

Fig. 1 Genomic DNA methylation MSAP patterns of “Mohe” hybrid tilapia and its parents in liver (E4-HM5)

m: the DNA molecular weight marker; 1: *EcoR* I /*Hpa* II double digestion; 2: *EcoR* I /*Msp* I double digestion; H: *Oreochromis hornorum*; M: *Oreochromis mossambicus*; MH: *O. mossambicus* (♀) × *O. hornorum* (♂); Type I: no methylation or inner methylation of single-stranded DNA locus; Type II: outer methylation of single-stranded DNA locus (hemi-methylation loci); Type III: inner methylation of double-stranded DNA locus (fully methylation loci); Type IV: fully methylation loci

表2 莫荷罗非鱼“广福1号”及其亲本各组织间的甲基化水平差异

Tab. 2 Methylation levels of “Mohe” hybrid tilapia and its

parents in different tissues

mean±SD, %

甲基化类型 methylation type	皮肤 skin	肌肉 muscle	尾鳍 tail	鳃 gill	肠 intestine	脑 brain	肝脏 liver	心脏 heart	脾脏 spleen	肾脏 kidney	胃 stomach
II											
H	13.03±1.69	13.81±1.52	14.42±1.47	13.17±1.11	13.96±1.58	12.00±1.49	12.04±0.96	13.02±2.46	17.98±1.02	16.78±0.55	10.81±0.33
M	11.56±0.17	11.40±1.10	10.81±0.40	10.54±0.45	11.25±0.94	10.18±0.37	11.63±0.54	10.85±0.62	13.11±1.23	11.03±0.56	11.36±0.41
MH	9.38±0.48	8.73±0.23	9.93±0.58	10.21±0.17	8.87±0.63	8.55±0.21	8.43±0.20	10.78±0.20	11.57±0.50	10.92±0.30	11.01±0.47
III+IV											
H	22.58±0.30	22.08±0.30	24.39±0.44	23.54±0.86	26.01±0.34	26.12±1.28	25.28±0.83	23.85±0.74	23.99±0.41	25.69±0.84	23.78±0.81
M	19.07±0.29	19.47±2.09	20.07±0.27	20.39±0.17	21.04±0.56	22.95±0.93	23.41±0.88	20.98±0.36	20.64±0.56	21.04±0.34	21.53±0.34
MH	19.96±0.57	18.19±0.74	21.95±0.91	19.80±0.36	23.17±0.92	20.57±0.77	21.67±0.64	15.92±0.54	18.25±0.39	21.09±1.05	18.55±0.93
II+III+IV											
H	35.61±1.95 <sup>b</sup>	35.88±1.64 <sup>b</sup>	38.82±1.32 <sup>ab</sup>	36.71±1.62 <sup>ab</sup>	39.97±1.63 <sup>ab</sup>	38.11±2.46 <sup>ab</sup>	37.31±1.39 <sup>ab</sup>	36.87±3.01 <sup>ab</sup>	41.97±1.01 <sup>a</sup>	42.47±1.26 <sup>a</sup>	34.59±0.85 <sup>b</sup>
M	30.63±0.18 <sup>c</sup>	30.87±1.13 <sup>c</sup>	30.88±0.44 <sup>c</sup>	30.93±0.45 <sup>c</sup>	32.28±0.62 <sup>bc</sup>	33.12±0.72 <sup>abc</sup>	35.04±0.77 <sup>a</sup>	31.83±0.65 <sup>bc</sup>	33.75±1.29 <sup>ab</sup>	32.07±0.85 <sup>bc</sup>	32.90±0.68 <sup>abc</sup>
MH	29.35±0.80 <sup>abcd</sup>	26.92±0.84 <sup>cd</sup>	31.88±1.22 <sup>ab</sup>	30.00±0.52 <sup>ab</sup>	32.04±1.05 <sup>a</sup>	29.12±1.05 <sup>bcd</sup>	30.11±0.68 <sup>ab</sup>	26.70±0.58 <sup>d</sup>	29.83±0.16 <sup>ab</sup>	32.01±0.86 <sup>a</sup>	29.55±1.14 <sup>abc</sup>

注: H: 荷那龙罗非鱼; M: 橙色莫桑比克罗非鱼; MH: 莫荷罗非鱼“广福1号”; 相同小写字母表示数值之间无显著差异(P>0.05), 不同小写字母则表示数值之间存在显著差异(P<0.05); 下表同。II%= Type II /Type ( I + II +III+IV)表示半甲基化水平; (III+IV)%= Type (III+IV)/Type ( I + II +III+IV)表示全甲基化水平; (II+III+IV)%= Type (II+III+IV)/Type ( I + II +III+IV)表示总甲基化水平

Note: H: *Oreochromis hornorum*; M: *Oreochromis mossambicus*; MH: *O. mossambicus* (♀) × *O. hornorum* (♂); same lowercase letters mean no significant difference between the numbers (P>0.05), different lowercase letters mean significant difference between the numbers (P<0.05); the following tables are the same. II%=Hemi-methylation level; (III+IV)%=fully methylation level; (II+III+IV)%=total methylation level



差异, 但显著高于其他各组织( $P<0.05$ ), 皮肤、肌肉、尾鳍和鳃组织之间的甲基化程度差异不显著( $P>0.05$ ); 肠(32.04%)和肾脏(32.01%)的甲基化水平在莫荷罗非鱼“广福1号”中相近, 且都显著高于肌肉(26.92%)和心脏组织(26.70%)( $P<0.05$ ), 其余各组织间的甲基化水平差异不显著( $P>0.05$ )。

### 2.3 亲、子代罗非鱼相同组织间DNA甲基化水平差异分析

在各组织总甲基化水平上, 杂交种莫荷罗非鱼的甲基化比率均低于双亲(尾鳍除外), 且均接近于母本橙色莫桑比克罗非鱼的甲基化水平(表3)。皮肤、肌肉、鳃、肠和肾脏组织中, 莫荷罗非鱼“广福1号”的甲基化比率低于母本莫桑比克罗非鱼, 但两者之间并无显著差异( $P>0.05$ ), 母本和杂交种的甲基化水平均显著低于父本荷那龙罗非鱼的甲基化水平( $P<0.05$ ); 脑与心脏组织中, 莫桑比克罗非鱼的甲基化程度居于荷那龙和莫荷罗非鱼“广福1号”的中间水平且与二者无显著差异( $P>0.05$ ), 但在该两种组织中, 荷那龙罗非鱼和“广福1号”之间的甲基化水平存在显著差异( $P<0.05$ ); 肝脏和胃中, 母本橙色莫桑比克罗非鱼和父本荷那龙罗非鱼之间的甲基化水平无显著差异, 但均显著( $P<0.05$ )高于莫荷罗非鱼“广福1号”的甲基化水平; 脾脏组织中父母本和“广福1号”罗非鱼的甲基化水平之间

均存在显著差异( $P<0.05$ ), 荷那龙罗非鱼脾脏的甲基化比率最高, 莫荷罗非鱼最低; 在尾鳍组织中, 杂交种莫荷罗非鱼的平均甲基化水平略高于母本但差异不显著, 较父本而言呈现显著降低的现象( $P<0.05$ )。橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼以及莫荷罗非鱼“广福1号”各组织平均总甲基化水平分别为32.21%、38.03%和29.77%, 杂交种的甲基化水平低于双亲, 且显著低于父本荷那龙罗非鱼( $P<0.05$ )。

### 2.4 亲、子代甲基化模式的变化

基于DNA甲基化模式改变的角度, 进一步比较杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”和其亲本间扩增条带类型的差异, 可将这些差异带型主要分为5类(表4)。A类型: 杂交种和两亲本都观察到相同的甲基化位点, 即完全继承双亲的甲基化类型, 占19.67%。B类型: “广福1号”与母本橙色莫桑比克罗非鱼甲基化条带类型一致, 占29.99%。C类型: 莫荷罗非鱼“广福1号”与父本荷那龙罗非鱼的甲基化条带相同的比例为25.42%。A、B、C 3种类型共75.08%的甲基化类型来源于亲本, 均属于遗传类型, 符合孟德尔遗传定律。D类型: 杂交种与相应亲本相比甲基化位点增加(超甲基化位点)。E类型: 杂交种与相应亲本相比甲基化位点减少(去甲基化位点)。D类型和E类型在总甲基化位点中所占比例较低, 分别

表3 亲、子代罗非鱼各组织间甲基化水平差异

Tab. 3 Methylation levels in different tissues of “Mohe” hybrid tilapia and its parents

组织 tissue	橙色莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	荷那龙罗非鱼 <i>O. hornorum</i>	莫荷罗非鱼“广福1号” <i>O. mossambicus</i> (♀) × <i>O. hornorum</i> (♂)
皮肤 skin	30.63±0.18 <sup>b</sup>	35.61±1.95 <sup>a</sup>	29.35±0.80 <sup>b</sup>
肌肉 muscle	30.87±1.13 <sup>b</sup>	35.88±1.64 <sup>a</sup>	26.92±0.84 <sup>b</sup>
尾鳍 tail	30.88±0.44 <sup>b</sup>	38.82±1.32 <sup>a</sup>	31.88±1.22 <sup>b</sup>
鳃 gill	30.93±0.45 <sup>b</sup>	36.71±1.62 <sup>a</sup>	30.00±0.52 <sup>b</sup>
肠 intestine	32.28±0.62 <sup>b</sup>	39.97±1.63 <sup>a</sup>	32.04±1.05 <sup>b</sup>
脑 brain	33.12±0.72 <sup>ab</sup>	38.11±2.46 <sup>a</sup>	29.12±1.05 <sup>b</sup>
肝脏 liver	35.04±0.77 <sup>a</sup>	37.31±1.39 <sup>a</sup>	30.11±0.68 <sup>b</sup>
心脏 heart	31.83±0.65 <sup>ab</sup>	36.87±3.01 <sup>a</sup>	26.70±0.58 <sup>b</sup>
脾脏 spleen	33.75±1.29 <sup>b</sup>	41.97±1.01 <sup>a</sup>	29.83±0.16 <sup>c</sup>
肾脏 kidney	32.07±0.85 <sup>b</sup>	42.47±1.26 <sup>a</sup>	32.01±0.86 <sup>b</sup>
胃 stomach	32.90±0.68 <sup>a</sup>	34.59±0.85 <sup>a</sup>	29.55±1.14 <sup>b</sup>
平均值 average value	32.21±0.42 <sup>b</sup>	38.03±0.77 <sup>a</sup>	29.77±0.55 <sup>b</sup>

表 4 莫荷罗非鱼“广福1号”与亲本间的甲基化类型差异

Tab. 4 Methylation types differences of “Mohe” hybrid tilapia and its parents

模式 patterns	橙色莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>		荷那龙罗非鱼 <i>O. hornorum</i>		“广福1号” <i>O. mossambicus</i> (♀) × <i>O. hornorum</i> (♂)		位点数 number of sites
	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	
A	1	1	1	1	1	1	350
	1	0	1	0	1	0	19
	0	1	0	1	0	1	31
总计 total							400(19.67%)
B	0	1	0	0	0	1	154
	1	1	0	1	1	1	144
	1	0	1	1	1	0	109
	0	1	1	1	0	1	112
	1	0	0	1	1	0	91
总计 total							610(29.99%)
C	0	0	0	1	0	1	96
	0	1	1	1	1	1	102
	1	1	0	1	0	1	87
	1	0	0	1	0	1	79
	1	0	1	1	1	1	153
总计 total							517(25.42%)
D	0	1	0	0	0	0	52
	0	0	0	1	0	0	56
	0	1	0	1	0	0	79
总计 total							187(9.19%)
E	0	1	0	0	1	1	136
	0	0	0	1	1	1	184
总计 total							320(15.73%)

注：1代表该位点有条带，0代表该位点没有条带

Notes: 1 indicates that a band was found at the site; 0 indicates that no band was found at the site

为9.19%和15.73%，呈现超甲基化位点低于去甲基化位点的现象。

在莫荷罗非鱼“广福1号”中，与双亲甲基化类型一致的数量(A类型)相比于与亲本其中一方类型甲基化模式相同的数量(B、C类型)要少很多，是因为不同种双亲间部分CCGG位点的甲基化模式本身具有差异性。D类型甲基化水平升高的比例相比E类型甲基化水平降低的比例要低。说明与亲本相比，在杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”形成过程中，除了继承双亲可稳定遗传的甲

基化类型外，还在此基础上经历去甲基化和超甲基化两种甲基化模式的变化，并以去甲基化模式为主，超甲基化模式为辅，较亲本整体表现为甲基化水平降低的现象。

### 3 讨论

本研究以橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”为研究对象，采用MSAP技术对11种组织进行基因组DNA甲基化水平分析。在MASP分析中，根据同

裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对 CCGG 序列中胞嘧啶甲基化修饰的敏感程度不同, 导致基因组经过 *Eco*R I/*Hpa* II 和 *Eco*R I/*Msp* I 两种双酶切扩增后出现条带多态性, 然后通过 PAGE 电泳判断出 CCGG 位点的甲基化水平。 *Hpa* II 和 *Msp* I 均可以识别并切割非甲基化 CCGG 序列, 除此之外, *Hpa* II 可以识别并切割单链甲基化序列 ( $^m$ C $^m$ CGG/GGCC 或  $^m$ CCGG/GGCC), 即半甲基化序列, 而 *Msp* I 不能切割半甲基化序列, 但可以识别并切割双链内侧胞嘧啶甲基化序列 (C $^m$ CGG/GG $^m$ CC)<sup>[21]</sup>。虽然 MSAP 技术仅限于识别 5'-CCGG-3' 位点<sup>[22]</sup>, 从而导致基因组实际的甲基化水平被低估, 但是以上述原理为基础建立的 MSAP 技术具有操作简便、高效率 and 低成本的特点<sup>[23]</sup>, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[22]</sup>、鸡 (*Gallus gallus*)<sup>[24]</sup> 和马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*)<sup>[20]</sup> 等研究中也体现出 MSAP 技术的有效性和可靠性, 使之成为大多数实验室研究基因组甲基化分析的技术首选。瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae*)<sup>[25]</sup> 和长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[26]</sup> 均采用 MSAP 技术建立 DNA 甲基化分析体系。

基因组 DNA 甲基化水平的不同可以反应物种基因组间的差异性。本研究结果显示, 杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”各组织的总 DNA 甲基化水平为 29.77%, 与尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 23.74%<sup>[27]</sup>、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 32.79%、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 24.13%<sup>[28]</sup> 和刺参 (*Apostichopus japonicus*) 23.36%~31.07%<sup>[29]</sup> 等水产动物接近, 显著低于高等哺乳动物牛 (*Bos taurus*) 45.7%~72.7% 和猪 (*Sus scrofa*) 40.6%~44.8%<sup>[30]</sup> 以及草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 初孵幼苗 75.9%<sup>[31]</sup> 等的甲基化水平。在本实验 3 种罗非鱼个体中, 基因组 DNA 平均的全甲基化位点数均要多于半甲基化位点数, 这与在哺乳动物基因组全甲基化位点较半甲基化位点多的研究结果一致<sup>[30]</sup>。

同一物种的不同组织以及不同物种相同组织的甲基化水平存在差异。杜盈等<sup>[32]</sup> 采用 30 对引物进行选扩得到的 PAGE 带型图谱显示, 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 野生群体和选育品种“黄海1号”肌肉、鳃和血液组织基因组 DNA 甲基化水平存在差异现象。Li 等<sup>[20]</sup> 建立了一种 MSAP 技术研究马氏珠母贝早期发育阶段各组织的甲基化带谱, 闭壳肌、消化腺、斧足、心脏和鳃的甲基化水平为 11.71%~14.71%, 并观察到不同组织的甲基化水平之间存在显著差异。同一物

种表现出来的组织甲基化特异性可能是在组织分化过程中产生, 不同的甲基化水平会产生不同的基因表达, 从而行使不同的功能。本实验中, 同种罗非鱼不同组织间甲基化水平存在差异。荷那龙罗非鱼的肾脏和脾脏甲基化水平显著高于皮肤和肌肉等其他组织, 杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”肠和肾脏的甲基化程度要显著高于其他各组织。纵向比较时发现亲、子代罗非鱼在同一组织间基因组 DNA 甲基化水平亦不同。亲、子代罗非鱼脾脏之间的甲基化程度存在显著差异, 杂交种“广福1号”和其父本荷那龙罗非鱼的其他 10 种组织的 DNA 甲基化水平之间存在显著差异, 这与徐青<sup>[24]</sup> 研究白洛克肉鸡 (EE) 和来航蛋鸡 (AA) 及其杂交子代 ( $F_{1EA}$ ) 同一组织的基因组 CCGG 位点甲基化水平在不同群体是不同的实验结果一致。

研究表明, 杂交所产生的基因组重新配置包含了基因组在表观遗传水平上的重组, 从而导致基因表达的改变<sup>[33]</sup>, 故许多学者认为的杂种优势是不同基因差异表达的结果<sup>[16, 34]</sup> 实质上是基因组表观遗传调控的结果。越来越多的研究表明, DNA 甲基化可以调控基因的表达, 如 Cedar<sup>[17]</sup> 发现基因组 DNA 甲基化水平及分布与基因表达率显著相关。因此, 近年来研究学者倾向于从 DNA 甲基化的角度分析杂种和亲本之间的变化和杂种表现。栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交  $F_1$  代的甲基化水平低于双亲, DNA 甲基化率与壳长、壳高、软体重和闭壳肌等生长相关的性状成负相关<sup>[28]</sup>; 万亚琴<sup>[35]</sup> 从群体水平研究的重庆山地黄牛 (*Bos taurus*) 的  $F_1$  杂交后代群体的总甲基化水平、全甲基化水平和半甲基化水平均低于双亲, 并且甲基化率对牛的胸围、体质量等性状有显著影响。这些研究证明了杂种优势的形成和杂种基因组 DNA 甲基化水平的降低有关。近年来, 关于 DNA 甲基化对杂种优势形成的作用在植物杂交育种研究中比较多, 如具有杂种优势的落叶松 (*Larix kaempferi*) 杂种一代, 基因组 DNA 发生了去甲基化, 其甲基化水平为 26.47%, 显著低于双亲甲基化水平的均值 33.80%<sup>[36]</sup>。在拟南芥 *ddm1* (DNA methylation 1) 基因突变体的杂交种中, 当所有对生长杂种优势形成的关键位点发生甲基化改变时, 其杂种优势才会完全消失; 如只有部分位点发生甲基化改变, 则其杂种优势只有部分降低<sup>[37]</sup>。与上述结果一致, 本研

究表明莫荷罗非鱼“广福1号”的甲基化水平(29.77%)低于双亲的甲基化水平38.03%和32.21%，与母本橙色莫桑比克罗非鱼更为接近，说明莫荷罗非鱼在杂交过程中更多地受母性效应影响，这与杂交稻一致<sup>[38]</sup>。刘玉姣<sup>[39]</sup>和李茜茜<sup>[40]</sup>研究表明，莫荷罗非鱼在耐盐胁迫方面较亲本具有明显的杂种优势。结合本次的甲基化研究，推测杂交种莫荷罗非鱼“广福1号”基因组DNA甲基化水平的降低可能是其耐盐性状杂种优势形成的诸多原因之一。

杂交组合中，亲本基因组的甲基化模式会经过复杂的调整，在保持大部分模式稳定遗传给予子代外，基因组的甲基化和去甲基化水平会发生改变，在环境因子的相互作用下，最终形成一个适应生存并具有双亲性状的杂交子代。在本实验中，莫荷罗非鱼“广福1号”中75.08%甲基化类型完全继承或部分继承于亲本(A、B、C类型)，同时发生的去甲基化位点(E类型，15.73%)多于超甲基化位点(D类型，9.19%)，与亲本相比呈现出甲基化总体水平降低的现象，这与栉孔扇贝和虾夷扇贝的杂交子一代<sup>[28]</sup>、落叶松<sup>[41]</sup>杂交研究结果相似。一般地，DNA甲基化与基因表达成负相关。杂交种DNA甲基化水平降低，使得许多沉默基因被激活，基因表达活性增强<sup>[34]</sup>；杂交种中基因组甲基化模式的重排会向着更有利于杂种优势的方向进行。关于盐胁迫下有关基因的差异表达与甲基化水平之间的关系将在后续实验中进行验证分析。

本研究基于DNA甲基化水平对莫荷罗非鱼“广福1号”与亲本各组织间的甲基化差异做了初步探讨，试图从表观遗传学角度分析DNA甲基化和莫荷罗非鱼耐盐性状杂种优势之间的关系。实验结果表明相同物种不同组织间的甲基化水平存在特异性，亲、子代罗非鱼相同组织的甲基化程度亦存在差异。莫荷罗非鱼“广福1号”除尾鳍组织外，其余各组织的甲基化水平均低于双亲，推测莫荷罗非鱼的杂种优势与其基因组DNA甲基化模式发生改变和重新调整有关，但杂种优势的形成与多种因素有关，至于特异性去甲基化位点与莫荷罗非鱼“广福1号”的耐盐性状杂种优势的关系，以及这些DNA甲基化位点的遗传方式，对基因结构和功能产生影响的作用和调控机制有待进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 李家乐, 李思发. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 90-95.  
Li J L, Li S F. Introduction and research advances of *Oreochromis niloticus* in China Mainland[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(1): 90-95(in Chinese).
- [2] 刘玉姣, 朱华平, 卢迈新, 等. 莫荷罗非鱼幼鱼耐盐性能的初步研究[J]. 淡水渔业, 2015, 45(1): 109-112.  
Liu Y J, Zhu H P, Lu M X, et al. Preliminary study on salinity tolerance of the juveniles of hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus*♀×*O. hornorum*♂)[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(1): 109-112(in Chinese).
- [3] 杨淞, 汪开毓, 黄樟翰, 等. 两种罗非鱼主要生物学性状及杂交F<sub>1</sub>代生长性能的研究[J]. 四川农业大学学报, 2008, 26(1): 93-98.  
Yang S, Wang K Y, Huang Z H, et al. Studies on the Principal Biological Characteristics of *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis mossambicus* and the Growth Performance of Hybrid F<sub>1</sub>[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2008, 26(1): 93-98(in Chinese).
- [4] Crow J F. Alternative hypotheses of hybrid vigor[J]. Genetics, 1948, 33(5): 477-487.
- [5] Jones D F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis[J]. Genetics, 1917, 2(5): 466-479.
- [6] East E M. Heterosis[J]. Genetics, 1936, 21(4): 375-397.
- [7] Yu S B, Li J X, Xu C G, et al. Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(17): 9226-9231.
- [8] Groszmann M, Greaves I K, Albertyn Z I, et al. Changes in 24-nt siRNA levels in Arabidopsis hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(6): 2617-2622.
- [9] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: Regulation through Repression[J]. Science, 1999, 286(5439): 481-486.
- [10] Zhang Y Q, Zhao M, Sawalha A H, et al. Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4<sup>+</sup> T cells of systemic lupus erythematosus[J]. Journal of Autoimmunity, 2013, 41: 92-99.
- [11] Jones P A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nature Reviews



- Genetics, 2012, 13(7): 484-492.
- [12] Jablonka E, Goitein R, Marcus M, *et al.* DNA hypomethylation causes an increase in DNase-I sensitivity and an advance in the time of replication of the entire inactive X chromosome[J]. *Chromosoma*, 1985, 93(2): 152-156.
- [13] Constância M, Pickard B, Kelsey G, *et al.* Imprinting mechanisms[J]. *Genome Research*, 1998, 8(9): 881-900.
- [14] Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression[J]. *Microbiology Reviews*, 1991, 55(3): 451-458.
- [15] Cheng X D, Blumenthal R M. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective[J]. *Structure*, 2008, 16(3): 341-350.
- [16] Romagnoli S, Maddaloni M, Livini C, *et al.* Relationship between gene expression and hybrid vigor in primary root tips to young maize (*Zea mays* L.) plantlets[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80(6): 769-775.
- [17] Cedar H. DNA methylation and gene activity[J]. *Cell*, 1988, 53(1): 3-4.
- [18] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(3): 439-446.
- [19] Fulneček J, Kovařík A. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles?[J]. *BMC Genetics*, 2014, 15(1): 2.
- [20] Li Y G, Guan Y Y, Li Q, *et al.* Analysis of DNA methylation in tissues and development stages of pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Genes & Genomics*, 2014, 37(3): 263-270.
- [21] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(17): 3640-3659.
- [22] Cervera M T, Ruiz-García L, Martínez-Zapater J. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4): 543-552.
- [23] Reyna-López G E, Simpsom J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 253(6): 703-710.
- [24] 徐青. 鸡DNA甲基化组织特异性及亲本与子代甲基化差异性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- Xu Q. Differences in DNA methylation among tissues and between parents and offspring in chicken[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [25] 龚治, 周世豪, 马华博, 等. 瓜实蝇DNA甲基化的MSAP体系建立与优化[J]. *热带农业科学*, 2016, 36(5): 37-43.
- Gong Z, Zhou S H, Ma H B, *et al.* Establishment and optimization of MSAP analysis system for DNA methylation in *Bactrocera cucurbitae*[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2016, 36(5): 37-43(in Chinese).
- [26] Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al.* Inheritance and variation of genomic DNA methylation in diploid and triploid pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(1): 124-132.
- [27] 朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组DNA甲基化的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(10): 1460-1467.
- Zhu H P, Lu M X, Huang Z H, *et al.* Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1460-1467(in Chinese).
- [28] 于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的MSAP分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1335-1342.
- Yu T, Yang A G, Wu B, *et al.* Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1335-1342(in Chinese).
- [29] 左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组DNA的MSAP研究[J]. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 93-100.
- Zuo Z L, Tan J, Wu B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the Tissues of *Apostichopus japonicus* and White *A. japonicus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 93-100(in Chinese).
- [30] 唐韶青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006,

- 14(4): 507-510.
- Tang S Q, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 507-510(in Chinese).
- [31] 曹哲明, 丁炜东, 俞菊华, 等. 草鱼全同胞鱼苗不同个体甲基化位点的差异[J]. 动物学报, 2007, 53(6): 1083-1088.
- Cao Z M, Ding W D, Yu J H, *et al.* Differences in methylated loci among different grass carp individuals from one pair of parents[J]. Acta Zoologica Sinica, 2007, 53(6): 1083-1088(in Chinese).
- [32] 杜盈, 何玉英, 李健, 等. 野生和"黄海1号"中国明对虾不同组织基因组DNA的MSAP分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 536-543.
- Du Y, He Y Y, Li J, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of wild and " Huanghai No.1" *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 536-543(in Chinese).
- [33] Koroma A P, Jones R, Michalak P. Snapshot of DNA methylation changes associated with hybridization in *Xenopus*[J]. Physiological Genomics, 2011, 43(22): 1276-1280.
- [34] Tsaftaris A S, Kafka M. Mechanisms of heterosis in crop plants[J]. Journal of Crop Production, 1997, 1(1): 95-111.
- [35] 万亚琴. DNA甲基化与肉牛杂种优势关系的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- Wan Y Q. Study on the relationship between DNA methylation and heterosis in beef cattle[D]. Chongqing: Southwest University, 2008 (in Chinese).
- [36] Li A, Song W Q, Chen C B, *et al.* DNA methylation status is associated with the formation of heterosis in *Larix kaempferi* intraspecific hybrids[J]. Molecular Breeding, 2013, 31(2): 463-475.
- [37] Kawanabe T, Ishikura S, Miyaji N, *et al.* Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(43): E6704-E6711.
- [38] 彭海, 江光怀, 张静, 等. 中国杂交水稻DNA甲基化多样性与遗传稳定性[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 56(12): 1097-1106.
- Peng H, Jiang G H, Zhang J, *et al.* DNA methylation polymorphism and stability in Chinese *indica* hybrid rice[J]. Science China Life Sciences, 2013, 56(12): 1097-1106.
- [39] 刘玉姣. 橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其正反交子代耐盐相关基因的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Liu Y J. A study on salt tolerance related genes of *Oreochromis mossambicus*, *O. hornorum* and their hybrids[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [40] 李茜茜. 罗非鱼耐盐碱相关基因*AQP1*、*mTOR*克隆和表达特征分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Li Q Q. Cloning and expression characterization analysis of *AQP1* and *mTOR* genes related to salt-alkaline tolerance in tilapia[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [41] 李爱, 刘超, 韩春乐, 等. 落叶松优势杂交子代与亲本间基因组DNA甲基化变异研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2012, 45(5): 65-71.
- Li A, Liu C, Han C L, *et al.* Variation in cytosine methylation patterns between reciprocal hybrids and their parental line in *Larix*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2012, 45(5): 65-71(in Chinese).

## Analysis of DNA methylation difference between “Mohe” hybrid tilapia and its parents

SHANG Huiwen<sup>1,2</sup>, LIU Zhigang<sup>1</sup>, ZHU Huaping<sup>1\*</sup>, GAO Fengying<sup>1</sup>, KE Xiaoli<sup>1</sup>, LU Maixin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** DNA methylation difference of eleven tissues of *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis hornorum* and “Mohe” hybrid tilapia (*O. mossambicus*♀×*O. hornorum*♂), such as skin, muscle and gill etc. was analyzed to explore the change of methylation pattern during the interspecific hybridization using methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP). 16 pairs of primers were used to amplify selectively. The results of electrophoretic banding analysis showed that there were differences in the methylation levels among these different tissues of the same species and between the same tissues among “Mohe” hybrid tilapia and its parents; the average methylation level of these tissues from *O. mossambicus*, *O. hornorum* and “Mohe” hybrid progenies was 32.21%, 38.03% and 29.77%, respectively. The methylation level of hybrid progenies was lower than those of the parental progenies. Most of the methylation patterns of the hybrid progenies were similar to the parental progenies (A, B and C types, 19.67%, 29.99% and 25.42%), while 24.92% cytosine demethylation and hypermethylation were found in the genome of hybrid progenies and the number of demethylation sites (E type, 15.73%) was greater than that of hypermethylation sites (D type, 9.19%). These results suggested that the genomic DNA hypomethylation and the reshuffling of the DNA methylation pattern in the hybrid progenies might be associated with the heterosis. The present findings established epigenetic foundation to further reveal the heterosis mechanism of tilapia.

**Key words:** “Mohe” hybrid tilapia; hybrid parents; heterosis; DNA methylation; MSAP

**Corresponding author:** ZHU Huaping. E-mail: zhhiping2000@163.com

**Funding projects:** Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZC0401); China Agriculture Research System (CARS-46); National Key Technology R&D Program (2012BAD26B03)