



虎龙杂交斑养殖群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析

梁业松¹, 张维炜¹, 宋飞彪¹, 张 娴¹, 刘伊凡¹,
刘晓春², 林浩然^{1,2}, 骆 剑^{1*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省水产种业工程研究中心,
南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南海口 570228;
2. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275)

摘要: 遗传多样性下降被认为是水产生物经济性性状降低的常见原因。虎龙杂交斑作为养殖规模最大的石斑鱼品种, 近年来病害增多。为了探究是否是由于群体遗传多样性的改变而影响虎龙杂交斑的养殖性状, 本研究选用 27 个 EST-SSRs 标记, 对苗种主产区 6 个虎龙杂交斑群体进行了遗传多样性和群体遗传结构分析。结果显示, 6 个群体其平均等位基因数 (N_a) 为 6.666 7~8.555 6, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 3.511 6~3.959 0, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.764 6~0.794 3, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.709 1~0.750 4, 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.662 2~0.706 4。分子方差分析 (AMOVA) 结果显示, 5.70% 的遗传变异来自群体间, 0.00% 来自群体内个体间, 94.3% 来自所有个体间。主坐标分析 (PCoA) 也显示差异主要来源于个体。群体间遗传分化指数 (F_{st})、遗传距离及聚类分析结果显示, HB 和 XC 群体先聚为一支, 再与翁田 (WT) 群体聚为一支, 感城 (GC) 和桥头 (QT) 群体聚为一支, 冯坡 (FP) 群体为独立一支。遗传结构分析显示, 所有样本被分为 5 ($K=5$) 个理论群体, 会文博鳌 (HB) 群体由 FP、WT、新村 (XC) 和 GC 群体集合而成。研究表明, 杂交石斑鱼群体仍具有较高的遗传多样性, 具有清晰的分群, 杂交品种受亲本近交影响而出现衰退的可能性不高; 病原生物的变异和养殖管理不规范可能是导致病害频发的原因。本研究为石斑鱼种质管理和病害防控提供了理论依据。

关键词: 虎龙杂交斑; EST-SSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q 348; S 965.334

文献标志码: A

遗传多样性是物种生存和进化的基石, 物种遗传多样性越高, 对环境变化的适应能力就越强^[1]。对于多数水产动物而言, 具备较高的遗传多样性是种群生活力的保障。对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[2]、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)^[3]、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[4]、点带石斑鱼 (*E. malabaricus*)^[5]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[6] 的研究均表明, 杂合度下降, 会导致生长

性状、繁殖力、抗病性、抗逆性等性状的降低。杂交育种利用了这一理论, 在杂交石斑鱼 [*E. moar* (♀) × *E. lanceolaus* (♂)]^[7]、杂交黄颡鱼 [*Pelteobagrus fulvidraco* (♀) × *P. vachelli* (♂)]^[8]、杂交扇贝 [*Chlamys farreri* (♀) × *Patinopecten yesoensis* (♂)]^[9] 等组合中, 获得了杂种优势, 杂交子一代的生活力和养殖性状均显著提高。

石斑鱼杂交优良新品种——虎龙杂交斑 (GS-

收稿日期: 2021-02-02 修回日期: 2021-03-10

资助项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2019045); 海南省重大科研项目 (ZDKJ2019011); 海南省林浩然院士团队创新中心项目; 现代农业产业技术体系专项 (CARS-47)

第一作者: 梁业松 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: 912006100@qq.com

通信作者: 骆剑, 从事鱼类生殖与遗传研究, E-mail: luojian@hainanu.edu.cn



02-005-2016)[*E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)], 综合了种间的遗传多样性, 获得了多方面的杂种优势^[10], 目前占据石斑鱼养殖产量的 80%, 是市场占有率最高的品种^[11]。然而, 自 2016 年审定推广以来, 该品种却普遍出现生活力降低的问题, 特别是苗种培育阶段“黑身”率、死亡率大大提高。为探究是否由于群体遗传多样性的降低而导致虎龙杂交斑养殖性状的下降, 本研究采用前期开发自杂交母本棕点石斑鱼 (*E. fuscoguttatus*) 的 EST-SSR 标记^[12], 对采自繁殖产区 5 个地区的 6 个虎龙杂交斑养殖群体进行遗传多样性和遗传结构分析, 探讨杂交石斑鱼病害严重的原因, 为

进一步开展石斑鱼遗传育种和病害防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

实验材料为虎龙杂交斑, 取自海南岛 5 个县市共 6 个养殖群体。所取样品皆为幼鱼, 其中冯坡 (FP) 群体 29 尾, 翁田 (WT) 群体 21 尾, 会文博鳌 (HB) 群体 29 尾 (同一公司来源), 新村 (XC) 群体 33 尾, 感城 (GC) 群体 33 尾, 桥头 (QT) 群体 22 尾, 共计 167 尾。每个群体的采样位置见图 1, 详细采集地点和数量见表 1。

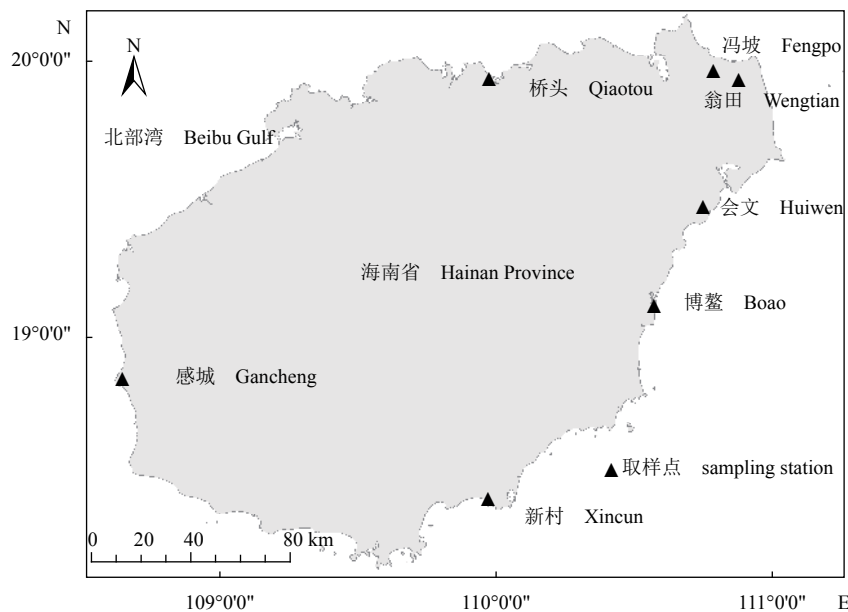


图 1 海南省 6 个虎龙杂交斑养殖群体的采样点

Fig. 1 Sampling sites of 6 cultured groups of hybrid grouper in Hainan Province

表 1 6 个养殖虎龙杂交斑群体的采样信息

Tab. 1 Sample information of 6 hybrid grouper cultured populations

种群代号 population code	位置 locations	取样时间 time	经度 longitude	纬度 latitude	样本数/尾 number of sample
冯坡 Fengpo, FP	文昌市冯坡镇 Fengpo Town, Wenchang City	2018-07-16	110°47'2"E	19°57'53"N	28
翁田 Wengtian, WT	文昌市翁田镇 Wengtian Town, Wenchang City	2018-07-16	110°52'33"E	19°56'1"N	20
会文 Huiwen, HW	文昌市会文镇 Huiwen Town, Wenchang City	2018-07-17	110°44'48"E	19°28'28"N	17
博鳌 Boao, BA	琼海市博鳌镇 Boao Town, Qionghai City	2018-07-23	110°34'10"E	19°6'57"N	11
新村 Xincun, XC	陵水县新村镇 Xincun Town, Lingshui City	2018-07-24	109°58'2"E	18°24'51"N	32
感城 Gancheng, GC	东方市感城镇 Gancheng Town, Dongfang City	2018-07-27	108°38'40"E	18°51'6"N	32
桥头 Qiaotou, QT	临高县桥头镇 Qiaotou Town, Lingao City	2018-07-28	109°58'17"E	19°56'9"N	27

剪取鳍条保存于 95% 乙醇中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。参照天根海洋动物组织 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 使用超微量紫外可见分光光度计 (ThermoFisher Nanodrop 2000C) 检测 DNA 浓度和纯度。DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 多态性 EST-SSR 筛选、扩增和分型检测

所选用的 30 对棕点石斑鱼 EST-SSR 引物由本课题组自主研发, PCR 反应体系和条件参照文献^[12], 引物由武汉天一辉远生物科技有限公司进行合成。具体的引物信息见表 2。从 6 个虎龙杂斑养殖群体中随机选择 1 个样本, 对 30 对引物进行通用性检验, 剔除多态性低的引物。

1.3 数据分析

根据各个群体在不同位点的基因型, 使用 POPGENE 3.2^[13] 软件计算各微卫星位点的等位基因数 (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)、Nei 氏标准遗传距离; Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数 (D)= $(H_o-H_e)/H_e$; 使用 Cervus 3.0.7 软件^[14] 计算多态性信息含量 (PIC); 使用 Arlequin version 3.5.2.2 软件^[15] 基于 Pairwise differences 方法计算各群体的遗传分化指数 (F_{st}) 并进行分子方差分析 (AMOVA); 使用 Excel 插件 GenAlEx 6.5 进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验、基于群体和个体间两两遗传距离进行主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 分析^[16];

表 2 27 对 EST-SSR 的引物信息
Tab. 2 27 pairs of EST-SSR primer information

位点 locus	正向引物序列 forward primer sequence	反向引物序列 reverse primer sequence	重复单元 repeat unit	条带大小/kb size range	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
P02	GACTGTGAAGCATTTGTTTAGC	AAAATTCAGTACCTTGCTGCCA	TG(2*21)	145~183	58
P03	AAAAACCTAAGATGCATGCC	GCAAGGGATTAGTTAGTTGCCT	TG(2*25)	124~152	60
P04	GTGATTCATGTCTCTGCTGTTG	ACTGAGAGCACGAACAATCACTC	TG(2*21)	171~179	60
P05	GGCAAAAACACATGTCAAAGTTCT	TCTCCTTCTCCACTGTTACATTCA	GT(2*22)	152~180	60
P06	GAGGGGCTCAGATGTAACAGAC	CTCAACCCTGCCTTTGTTAATG	CA(2*20)	153~169	60
P09	ATGGTGAACATTAACAGAGGCAC	CCAGATCCCATACTAAACGTCTG	CA(2*20)	137~149	60
P14	ACACATTTCCATCGCTGCTT	TCTGTGCCACGAAAACCTAC	CA(2*19)	165~183	60
P15	ATTGATGGTTTTGGCCTTTTTAT	GGCAAACCTTGATTTGTAAGA	GT(2*19)	158~170	60
P17	ATAAAGTTTCTGCAGGACGACAA	TTTGTGATCTATCAGCAGAGGG	GT(2*19)	171~177	61
P18	ATTGAATGACACCAACGTTCTTC	CAGTCCAGTAGGATCCTCTCCTT	TG(2*18)	119~149	60
P20	CCTGACCCTTAACACACCTGAC	GCAAACCTTGAATTGTATCTGTGG	AC(2*21)	141~167	60
P22	TCCAAGATCATGTCAACACACTG	GCTGTACTTGAAGACAACCTTGC	GA(2*17)	137~153	60
P23	CTCTATCAGCTGGTCTTGTGTTGT	GTCTGTCTGATGTCATGTCCA	AGAC(4*8)	150~174	60
P25	ACTTCTGTAGGTGGAGAGGAAGG	GTTGTCTCAGAGCAATCGTCC	AC(2*23)	156~172	60
P29	GTTTCATGATGGCTACAGAGTCTT	CACGTAACCTGACTGTTTGACAG	CTG(3*13)	149~177	59
P32	TGCTGACTGTAAGTTAGGAGCAA	GGTCTGTACAACCAAGGAGAG	AC(2*16)	174~200	60
P33	AAGATGGAAGTTAAAGTCGCTCA	GCATGTGACAGCATGTAGAAGAA	TG(2*21)	146~178	61
P35	ATAACAGTTGAGACAAGCCAGG	TCATAGACTTTGTTATCAGGGCA	AC(2*20)	145~183	60
P38	CATCGTCAAAGTCTGGAAGTGA	CTGTCTCAATCCATCACAGATCA	CA(2*21)	129~161	62
P39	CATACATGTCCTTTGGGAATCAT	TGTGTAATTGGCTGCATAAGAGA	CA(2*38)	121~145	60
P44	TAGGGTTAACCTGAACTCCTCGT	GGTCTGAGTGTGTTGCCATCAGT	TG(2*19)	161~185	60
P45	TCCACCAAGTGGCACTAGAGTAT	GTCTCTGGAGTGAAAGGAGCA	GT(2*39)	135~175	60
P49	TTGGATGTAAAGCACTGATTCAA	CAATACAGACAGCAGTGAGACGA	ATG(3*13)	151~199	60
P50	GTACAGACAACCTCTGTGCTGGT	ATGTCCCTATTTCAAAGGCCTAA	GT(2*23)	157~177	60
P51	TGATACAGTCACTGACAAGG	TGTCTGACAAGTACATACGCACA	TG(2*16)	139~167	59
P56	AACAATGAGCCACAATCTTCAAT	GATCCCATACTAAACGTCTGTGC	CA(2*20)	155~167	60
P59	GAGTGTGTATCTGACACCACGAG	CGTCTACAAGTGCCAATGAG	CA(2*16)	134~150	60

基于 Nei 氏遗传距离, 使用 MEGA-X version 10.1.8 软件^[17] 构建群体间的 UPGMA^[18] 进化树。

使用软件 Structure Selector^[19] 基于 Mean ln P(K)^[20]、 ΔK ^[21] 2 个指标分析群体遗传结构并得到最合适 K 值, 并根据集成的 CLUMPAK 程序生成结果图。

2 结果

2.1 位点多态性和群体遗传多样性

30 对棕点石斑鱼 EST-SSR 引物中有 27 对在虎龙杂交斑中扩增效果良好, 通用率为 90%。采用筛选出的 27 对微卫星引物对 6 个虎龙杂交斑群体的遗传多样性进行分析, FP、WT、HB、XC、GC 和 QT 群体分别得到 228、180、188、162、212、231 和 217 个等位基因。 N_a 分别为 8.444 4、6.666 7、8.740 7、7.851 9、8.555 6 和 8.037 0 (表 3), N_e 分别为 3.959 0、3.511 6、4.416 0、3.684 4、3.901 5 和 3.818 8。检测的 162 个数据中 (6 个群

体×27 个 EST-SSR), 共 7 个数据表现为等位基因数缺失 ($N_a < 4$), 其中 WT 群体 1 个 (P23)、HB 群体 4 个 (P09、P23、P33、P56)、XC 群体 2 个 (P23、P33)。 H_o 分别为 0.777 8、0.777 3、0.789 2、0.779 8、0.764 6 和 0.794 3, H_e 分别为 0.725 8、0.709 1、0.750 4、0.709 1、0.728 5 和 0.717 1。 PIC 分别为 0.684 1、0.653 8、0.706 4、0.662 2、0.686 4 和 0.672 4, 检测的 162 个数据中, 有 151 个数据具有高多态性 ($PIC > 0.5$), 11 个数据具有中等多态性 ($0.5 > PIC > 0.25$)。Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验结果显示, 在检测的 162 个数据中, 有 50 个表现为极显著的遗传连锁不平衡 ($P_{HWE} < 0.01$), 13 个表现为显著的遗传不平衡 ($P_{HWE} < 0.05$) (表 4)。FP、WT、HB、XC 和 GC、QT 群体各位点的 Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数 (D) 分别为 0.071 6、0.096 2、0.069 0、0.099 7、0.049 6 和 0.107 7, 种群平均遗传偏离指数均为正值, 表明此种群有较丰富的杂合子。

表 3 虎龙杂交斑群体的遗传多样性指数和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数

Tab. 3 Genetic diversity indices and Hardy-Weinberg genetic deviation indices in groups of hybrid grouper

群体 group	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	D
冯坡 Fengpo	4~12 (8.444 4)	1.544 5~6.480 9 (3.959 0)	0.000 0~1.000 0 (0.777 8)	0.359 2~0.861 6 (0.725 8)	0.335 0~0.829 0 (0.684 1)	-1.000 0~-0.487 4 (0.071 6)
翁田 Wengtian	2~10 (6.666 7)	1.994 5~6.016 7 (3.511 6)	0.000 0~1.000 0 (0.777 3)	0.512 1~0.856 3 (0.709 1)	0.374 0~0.815 0 (0.653 8)	-1.000 0~-0.569 1 (0.096 2)
会文、博鳌 Huiwen & Boao	5~13 (8.740 7)	2.048 5~9.135 1 (4.416 0)	0.154 0~1.000 0 (0.759 3)	0.522 0~0.908 0 (0.750 4)	0.443 0~0.881 0 (0.706 4)	-0.816 4~-0.522 1 (0.069 0)
新村 Xincun	2~12 (7.851 9)	1.811 5~6.537 4 (3.684 4)	0.129 0~1.000 0 (0.779 8)	0.455 3~0.860 9 (0.709 1)	0.348 0~0.829 0 (0.662 2)	-0.822 6~-0.522 5 (0.099 7)
感城 Gancheng	4~15 (8.555 6)	2.152 3~6.537 4 (3.901 5)	0.032 3~1.000 0 (0.764 6)	0.544 2~0.860 9 (0.728 5)	0.494 0~0.831 0 (0.686 4)	-0.940 6~-0.512 9 (0.049 6)
桥头 Qiaotou	4~13 (8.037 0)	1.644 8~6.500 0 (3.818 8)	0.307 7~1.000 0 (0.794 3)	0.399 7~0.862 7 (0.717 1)	0.373 0~0.829 0 (0.672 4)	-0.628 1~-0.603 3 (0.107 7)

注: N_a 等位基因数, N_e 有效等位基因数, H_o 观测杂合度, H_e 期望杂合度, PIC 多态性信息含量, D 遗传偏离指数, 括号内为平均值
Notes: N_a number of alleles, N_e number of effective alleles, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity, PIC polymorphism information content, D Hardy-Weinberg genetic deviation indices, average value in brackets

2.2 虎龙杂交斑群体遗传分化关系

对 6 个虎龙杂交斑群体分子进行方差分析 (AMOVA), 结果显示 5.70% 的遗传变异来自群体间, 0.00% 来自群体内个体间, 94.30% 来自所有个体间, 表明群体间的遗传变异来自所有个体间 (表 5)。FP、WT、HB、XC、GC 和 QT 群体间的 Nei 氏遗传标准距离 (D_s) 为 0.140 9~0.312 8, 属于种间遗传^[22] ($0.1 < D_s < 2.0$)。遗传分化指数 (F_{st}) 为 0.731 4~0.868 6, 所有群体均处于中等程度分化 ($0.05 < F_{st} < 0.15$) (表 6)。

2.3 遗传结构聚类分析

本研究基于 PCoA 法和结构法获得虎龙杂交斑群体结构的信息。基于群体间遗传距离的主坐标分析 (PCoA) 散点图显示群体的差异性 (图 2-a)。WT 群体为一类, FP 群体为一类, HB 群体为一类, XC 和 QT 群体聚为一类, GC 群体单独为一类且与 QT 和 XC 群体较近。基于个体间遗传距离的主坐标分析 (PCoA) 结果显示, 6 个虎龙杂交斑养殖群体内的个体间遗传差异较小 (图 2-b)。依据 Nei 氏遗传距离的 UPGMA 聚类树 (图 3), HB

表 4 虎龙杂交斑群体的 Hardy-Weinberg 平衡卡方检验

Tab. 4 Hardy-Weinberg equilibrium chi-square test in groups of hybrid grouper

位点 locus	群体 groups					
	冯坡 Fengpo	翁田 Wengtian	会文、博鳌 Huiwen & Boao	新村 Xincun	感城 Gancheng	桥头 Qiaotou
P02	0.775 4	0.999 0	1.000 0	0.020 9*	0.118 2	0.000 2**
P03	0.827 4	0.697 9	0.999 8	1.000 0	0.986 1	1.000 0
P04	0.392 2	0.434 2	0.011 2*	0.241 5	0.645 9	0.593 1
P05	0.999 9	0.870 8	0.730 9	0.646 3	0.999 6	0.950 7
P06	0.002 6**	0.002 9**	0.004 5**	0.005 0**	0.184 8	0.344 0
P09	0.329 2	0.004 2**	0.013 7*	0.136 1	0.026 8*	0.100 4
P14	0.992 2	0.223 0	0.551 7	0.931 6	0.993 5	0.911 6
P15	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**
P17	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**
P18	0.964 0	0.337 3	0.578 6	0.000 1**	0.000 9**	0.000 3**
P20	0.756 5	1.000 0	0.997 9	0.993 1	0.999 8	1.000 0
P22	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**
P23	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.008 1**	0.000 0**	0.000 1**
P25	0.011 5*	0.000 3**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**	0.000 0**
P29	0.518 2	0.040 3*	0.038 0*	0.000 6**	0.317 1	0.038 0*
P32	0.478 4	0.991 1	0.315 0	0.924 3	0.764 6	0.122 5
P33	0.241 3	0.881 8	0.568 6	0.004 3**	0.020 9**	0.063 5
P35	1.000 0	0.999 9	1.000 0	0.917 5	0.999 3	0.939 6
P38	0.020 6*	0.154 5	0.074 5	0.000 1**	0.208 2	0.251 0
P39	0.987 2	0.913 0	0.181 2	0.863 0	0.695 1	0.977 3
P44	0.994 3	0.802 9	0.000 3**	0.588 7	0.072 3	0.792 8
P45	0.985 3	0.898 1	0.170 4	0.367 2	0.000 3**	0.988 8
P49	0.697 7	0.838 4	0.805 3	0.049 8*	0.207 0	0.987 5
P50	0.860 9	0.926 1	0.755 1	0.504 9	0.073 7	0.663 6
P51	0.890 5	0.040 3*	0.890 5	0.008 8**	0.705 2	0.890 5
P56	0.005 0**	0.000 0**	0.002 7**	0.008 3**	0.000 0**	0.038 0*
P59	0.049 4*	0.436 0	0.061 2	0.870 3	0.494 6	0.999 9

注: *表示显著偏离Hardy-Weinberg平衡($P<0.05$), **表示极显著偏离Hardy-Weinberg平衡($P<0.01$)

Notes: * indicates a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$), ** indicates very significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.01$)

表 5 基于 27 个微卫星标记分子方差分析结果

Tab. 5 Result of AMOVA based on 27 microsatellite markers

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差组分 variance components	方差比例/% percentage of variance
群体间 among populations	5	213.988 6	0.636 3	5.70
群体内个体间 among individual within populations	154	1 388.170 7	0.000 0	0.00
个体间 between individuals	160	1 683.000 0.00	10.518 8	94.30
总数 total	319	3 285.159 4	11.155 1	100.00

和 XC 群体聚为一支, 再与 WT 群体聚为一支, GC 和 QT 群体聚为一支, FP 群体为一支, 与遗传距离、 F_{st} 和主坐标分析 PCoA 结果基本一致。

在虎龙杂交斑群体遗传结构分析中, Mean $\ln P(K)$ 、 ΔK 随着亚群数 K 的增加而变动, $K=5$ 时, Mean $\ln P(K)$ 出现最大拐点和 ΔK 最大值

表 6 虎龙杂交斑群体间的遗传分化指数 F_{st} 和 Nei 氏遗传距离

Tab. 6 Matrix of pair-wise F_{st} values (above diagonal) and Nei's genetic distance (below diagonal) between groups of hybrid grouper

群体 groups	冯坡 Fengpo	翁田 Wengtian	会文、博鳌 Huiwen & Boao	新村 Xincun	感城 Gancheng	桥头 Qiaotou
冯坡 Fengpo		0.740 0	0.839 6	0.775 2	0.777 3	0.737 5
翁田 Wengtian	0.301 1		0.849 4	0.781 0	0.761 4	0.731 4
会文、博鳌 Huiwen & Boao	0.174 8	0.163 2		0.868 6	0.832 3	0.779 9
新村 Xincun	0.254 6	0.247 2	0.140 9		0.787 7	0.823 1
感城 Gancheng	0.251 9	0.272 6	0.183 5	0.238 6		0.805 4
桥头 Qiaotou	0.304 5	0.312 8	0.248 5	0.194 6	0.216 5	

注：对角线以上为遗传分化指数 F_{st} ；对角线以下为 Nei 氏遗传距离
 Notes: above diagonal, genetic differentiation index F_{st} ; below diagonal, Nei's genetic distance

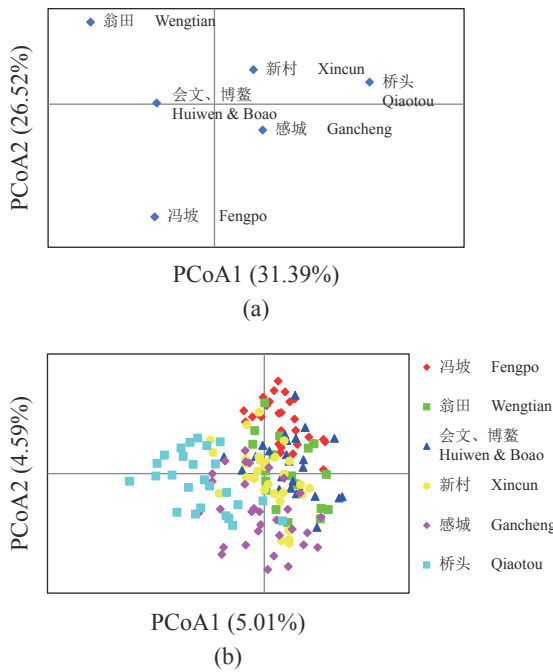


图 2 虎龙杂交斑群体和个体基于遗传距离的主坐标分析图

(a) 虎龙杂交斑群体基于遗传距离的主坐标分析图，第一和第二主坐标分别占总方差的 31.39% 和 26.52%。(b) 虎龙杂交斑个体基于遗传距离的主坐标分析图，第一和第二主坐标分别占总方差的 5.01% 和 4.59%

Fig. 2 Principal coordinates analysis results based on Nei's genetic distance among groups and individuals of hybrid grouper

(a) principal coordinates analysis results based on genetic distance among groupers, the first and second principal coordinates account for 31.39% and 26.52% of the total variance. (b) principal coordinates analysis results based on genetic distance among grouper individuals, the first and second principal coordinates account for 5.01% and 4.59% of the total variance

(图 4-a), 因此认为 K=5 是最可能的模型, 推测 6 个种群可以分为 5 个亚群, 即 FP、WT、XC、

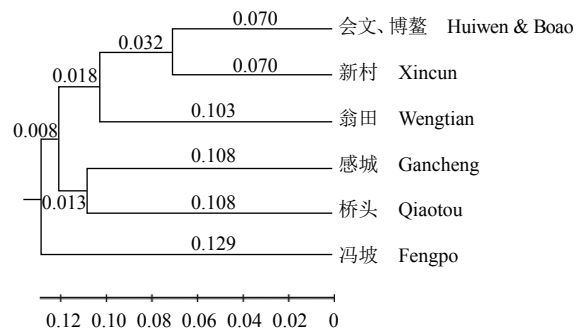


图 3 虎龙杂交斑群体基于 Nei 氏遗传距离构建的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance among the groups of hybrid grouper

GC 和 QT。其中, HB 群体由 FP、WT、XC 和 GC 群体集合而成 (图 4-b)。

3 讨论

3.1 虎龙杂交斑遗传多样性分析

物种间亲缘关系越近, EST-SSR 跨种通用性越高^[23]。本研究采用前期人工雌核生殖棕点石斑鱼开发的 30 对 EST-SSR 引物在虎龙杂交斑上进行了检测, 结果显示 27 对多态 EST-SSR 引物扩增性良好, 通用率为 90%, 高多态性位点 ($PIC > 0.5$) 比率为 93.21% (表 2), 说明这些微卫星位点适用于虎龙杂交斑群体遗传学研究。

N_a 、 H_o 、 H_e 和 PIC 越大, 说明种群内等位基因越丰富, 遗传变异越大。通常有效等位基因越接近观测到的等位基因的绝对值, 说明等位基因在群体中的分布越均匀^[24], 在本研究中, N_a 为 2~15 (平均 8.049 4), N_e 为 1.544 5~ 6.537 4 (平均 3.805 7), 说明所检测到的等位基因在虎龙杂交斑群体中分布不均。在虎龙杂交斑群体中, H_o 为 0.000 0~1.000 0 (平均 0.778 6), H_e 为 0.359 2~

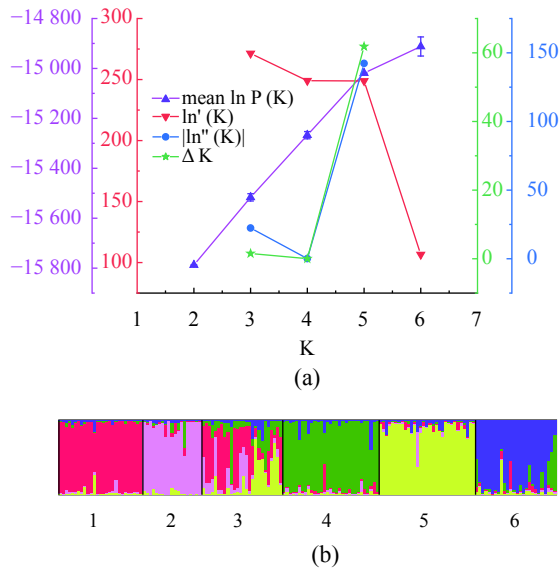


图 4 在不同 K 假设下, 6 个虎龙杂交斑群体中个体的遗传结构分析

(a) $\ln P(K)$ 和 ΔK 的曲线变化, ΔK 达到最大值时或似然值 $\ln P(K)$ 达到最大值时对应的 K 值分别为 5, 暗示着虎龙杂交斑群体存在 5 个亚群, (b) 每个竖条代表一个个体, 不同的颜色代表每个 K 基因进化簇对每个个体基因型的贡献, 1. 冯坡, 2. 翁田, 3. 会文、博鳌, 4. 新村, 5. 感城, 6. 桥头

Fig. 4 STRUCTURE analysis of individuals from the groups of hybrid grouper under different K

(a) the changing curve for $\ln P(K)$ and ΔK over the prior group numbers (K). ΔK and $\ln P(K)$ are maximum when K is five. (b) this trend indicates that hybrid grouper groups will be divided into 5 homogeneous subsets Each vertical bar represents a single individual and different colors represent the contribution of each K genetic cluster to each specimen's genotype, 1. Fengpo, 2. Wengtian, 3. Huiwen & Boao, 4. Xincun, 5. Gancheng, 6. Qiaotou

0.862 7 (平均 0.716 4), 高于黄业胜^[25]利用微卫星标记技术对虎龙杂交斑群体遗传多样性研究的结果 (平均 H_o 为 0.470, 平均 H_e 为 0.385), 平均观测杂合度低于周翰林等^[26]利用微卫星标记技术研究子一代虎龙杂交斑的结果 (平均 H_o 为 0.9400), 也可能是所用 EST-SSR 位点多态性较低所致; 而平均 H_e 为 0.716 4, 高于周翰林等^[26]研究中的 0.6297, 说明本研究中的虎龙杂交斑群体的遗传多样性仍然较为丰富。Botstein 等^[27]将 PIC 分为低度多态性、中度多态性和高度多态性位点, 本研究中, PIC 为 0.335 0~0.881 0 (平均为 0.677 6), 除了 P33 位点呈中度多态性 ($0.5 > PIC > 0.25$), 其他位点均表现为高度多态性 ($PIC > 0.5$), 均大于黄业胜^[25]和周翰林等^[26]在虎龙杂交斑中开发的微卫星位点的 PIC (平均 PIC 分别为 0.360 0 和 0.542 6)。Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验结果显示, 在检

测的 189 个数据中, 有 50 个表现为极显著的遗传连锁不平衡 ($P_{HWE} < 0.01$), 13 个表现为显著的遗传连锁不平衡 ($P_{HWE} < 0.05$), 其 Hardy-Weinberg 平衡偏离常数发生较多偏离, 可能是由于虎龙杂交斑是采用人工交配的杂交后代所致。

3.2 虎龙杂交斑群体遗传结构分析

本研究主坐标分析与 Nei 氏遗传距离的 UPGMA 聚类树分析中表现出较强的一致性。利用 Structure 软件^[21]对虎龙杂交斑群体的种群遗传结构进行检测, 采用 ΔK 方法推测 $K=5$ 是可能的模型, 即 6 个虎龙杂交斑种群可以分为 5 个亚群, 说明养殖幼鱼群体来源较多。其中 HB 群体由 FP 群体、WT 群体、XC 群体和 GC 群体集合而成, 反映出这些虎龙杂交斑几乎都来自不同的亲本群体。

3.3 杂交石斑鱼性状退化原因分析

遗传多样性高被认为是维持水产生物经济性能的保障。石斑鱼养殖性能降低、病害频发被怀疑是遗传多样性降低而导致。然而, 本研究的结果表明, 虎龙杂交斑各个群体在保持较高的遗传多样性的同时, 其亲本来源也较多样。虎龙杂交斑作为优良新品种, 其杂种优势显著, 但由于不同繁育公司制种亲本来源的多样和差异, 使得其子代杂种优势的程度参差不齐。本研究的数据和微卫星工具能够为加强杂交父母本群体、杂种子代的种质评价和管理提供分析方法。

目前病害神经坏死病毒在石斑鱼苗种阶段频繁暴发, 已成为石斑鱼育苗产业的主要病害之一^[28-30]。优良品种虎龙杂交斑由于生长、耐高温、抗病、抗逆能力强, 从而得到广泛的养殖应用, 但近年来, 神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 导致的幼鱼死亡可达 90% 以上^[31], 且具有明显的季节性^[32]。神经坏死病毒为 RNA 病毒^[33], 具有多种基因型和亚型^[34-35], 变异丰富。由于石斑鱼开放的养殖环境, 与病毒有长期接触, 可能导致新的高致病性毒株。石斑鱼神经坏死病的重新流行也提示需要针对流行病学开展系统调查研究。同时, 应加强无毒亲本筛选、养殖水体和病鱼的管理, 切断病毒的垂直传播和水平传播途径, 才能实现有效的病害防控。

梁业松与张维炜为共同第一作者。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 刘阳. 中华鳖形态、遗传与生长分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Liu Y. Morphological, genetic and growth analysis of *Trionyx sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012(in Chinese).
- [2] 曹婷婷, 白俊杰, 王解香, 等. 草鱼遗传结构和遗传多样性的研究概况[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(5): 76-80.
Cao T T, Bai J J, Wang X X, *et al.* The progress of genetic structure and genetic diversity of grass carp[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(5): 76-80 (in Chinese).
- [3] 宋宗诚, 蒋丽, 王丽娟, 等. 近交对大菱鲆体尺性状生长的遗传影响[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2019, 37(6): 135-142.
Song Z C, Jiang L, Wang L J, *et al.* Genetic effect of inbreeding on traits of morphological traits in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2019, 37(6): 135-142 (in Chinese).
- [4] 陈省平. 赤点石斑鱼种群遗传多样性研究 [D]. 山东: 中国海洋大学, 2007.
Chen X P. Population genetic analysis of red spotted grouper *Epinephelus akaara*[D]. Shandong: Ocean University of China, 2007(in Chinese).
- [5] 尹绍武, 雷从改, 黄海, 等. 点带石斑鱼遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2007(1): 76-80.
Yin S W, Lei C G, Huang H, *et al.* Population genetic diversity of *Epinephelus malabaricus* with RAPD markers[J]. *Journal of Natural Science of Human Normal University*, 2007(1): 76-80 (in Chinese).
- [6] 马春艳, 马洪雨, 马凌波, 等. 凡纳滨对虾引进群体和 2 个养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 1-8.
Ma C Y, Ma H Y, Ma L B, *et al.* Microsatellite analysis on genetic variation of imported *Litopenaeus vannamei* population and cultured stocks[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(1): 1-8 (in Chinese).
- [7] 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[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(5): 819-829.
Tang J, Tian Y S, Li Z T, *et al.* Analysis of Genetic Characters in *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus* and Their Hybrids[J]. *Chinese journal of agricultural biotechnology*, 2018, 26(5): 819-829 (in Chinese).
- [8] 张佳佳, 李杰, 张国松, 等. 杂交黄颡鱼 (黄颡鱼♀×瓦氏黄颡鱼♂) 及其双亲遗传多样性的微卫星分析 [J]. *水产科学*, 2018, 37(5): 612-621.
Zhang J J, Li J, Zhang G S, *et al.* Microsatellite-based analysis of genetic diversity of parent and hybrid of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (♀) × *p. vachelli* (♂) (in Chinese).
- [9] 于涛. 栉孔扇贝 (♀)×虾夷扇贝 (♂) 杂种优势遗传机理的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
Yu T. Studies on the heterosis mechanism of scallop *Chlamys farreri* (♀) × *Patinopecten yesoensis* (♂) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011(in Chinese).
- [10] Ng C L C, Senoo S. Egg and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*×giant grouper *E. lanceolatus*[J]. *Japanese Society for Aquaculture Science*, 2008, 56(4): 505-512.
- [11] 丁少雄, 刘巧红, 吴昊昊, 等. 石斑鱼生物学及人工繁育研究进展[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(4): 737-752.
Ding S X, Liu Q H, Wu H H, *et al.* A review of research advances on the biology and artificial breeding of groupers[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 737-752 (in Chinese).
- [12] 张维炜, 梁业松, 何靖, 等. 雌核发育棕点石斑鱼 EST-SSR 的开发验证[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2019, 37(2): 140-147.
Zhang W W, Liang Y S, He J, *et al.* Development and verification of EST SSRs based on transcriptome of the gynogenetic *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2019, 37(2): 140-147 (in Chinese).
- [13] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. *Belgian Journal of Botany*, 1997, 129(2): 157.
- [14] STEVEN T K, MARK L T, TRISTAN C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [15] Laurent E, HEIDI E L 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.
- [16] Peter E S, Michael R W, Rod P. An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation[J]. *Molecular ecology resources*, 2015, 15(6): 1375-1384.
- [17] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular

- evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular biology and evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [18] Sneath P H A. The principles and practice of numerical classification[J]. *Numerical Taxonomy*, 1973: 573.
- [19] Yu L L, Jin X L. StructureSelector: a web - based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. 2018, 18(1): 176-177.
- [20] Pritchard J K, Stephens M J, Donnelly P J. Inference of population structure using multi-locus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [21] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUC-TURE: a simulation study[J]. *Molecular ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [22] Thorpe J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics [J]. *Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics*, 1982, 13: 139-168.
- [23] 孙波, 鲍毅新, 张龙龙, 等. 大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增[J]. *动物学杂志*, 2009, 44(6): 145-150.
- Sun B, Bao Y X, Zhang L L, *et al.* Cross-species amplification of rat and mouse microsatellite DNA loci in the *Niviventer confucianus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(6): 145-150 (in Chinese).
- [24] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds: proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production[Z]. *Genet Appl Livest Prod*, 1994, 21: 501-508.
- [25] 黄业胜. 珍珠龙胆石斑鱼微卫星的开发及其养殖群体遗传多样性的研究 [D]. 福建: 集美大学, 2016.
- Huang Y S. Development of novel microsatellite markers and genetic diversity of cultured populations of pearl gentian grouper[D]. Fujian: Jimei University, 2016(in Chinese).
- [26] 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[J]. *水产学报*, 2012, 36(2): 161-169.
- Zhou H L, Zhang Y, Qing X, *et al.* SSR analysis of the heterosis in the two grouper hybrids[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(2): 161-169 (in Chinese).
- [27] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American journal of human genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [28] Chi S C, Lo B J, Lin S C. Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001, 24(1): 3-13.
- [29] 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究[J]. *福建水产*, 2011, 33(5): 15-19.
- Lin K B, Fang Q S, Wu J S, *et al.* Preliminary study on blocking transmission of NNV in *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2011, 33(5): 15-19 (in Chinese).
- [30] 沈海洋, 卢志杰, 秦真东, 等. 谷氨酰胺对斜带石斑鱼 GF-1 细胞中 C-Myc 蛋白的表达与神经坏死病毒复制的影响[J]. *水产学报*, 2020, 44(9): 1385-1396.
- Shen H Y, Lu Z J, Qin Z D, *et al.* Relationship between the expression of C-Myc protein and the replication of nervous necrosis virus in GF-1 cells treated with glutamine[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(9): 1385-1396 (in Chinese).
- [31] 朱松. 抗鱼类神经坏死病毒纳米靶向给药系统研究 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2020.
- Zhu S. Study on the nano targeted drug delivery system against nervous necrosis virus [D]. Shanxi: Northwest A & F University, 2020(in Chinese).
- [32] 马荣荣. 利用鱼类细胞系筛选抗神经坏死病毒 (NNV) 中草药的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Ma R R. Screening Chinese herbs for anti nervous necrosis virus (NNV) by using fish cell lines [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011(in Chinese).
- [33] Aspehaug V, Devold M, Nylund A. The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 1999, 19(5): 196-202.
- [34] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, *et al.* Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1633-6.
- [35] Chérif N, Gagné N, Groman D, *et al.* Complete sequencing of Tunisian redspotted grouper nervous necrosis virus betanodavirus capsid gene and RNA - dependent RNA polymerase gene[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(3): 231-240.

Genetic diversity and genetic structure analysis of aquaculture groups of hybrid grouper [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)] using microsatellite markers

LIANG Yesong¹, ZHANG Weiwei¹, SONG Feibiao¹, ZHANG Xian¹, LIU Yifan¹,
LIU Xiaochun², LIN Haoran^{1,2}, LUO Jian^{1*}

(1. State Key Laboratory of Marine Resources Utilization in South China Sea, Hainan Aquaculture Breeding Engineering Research Center, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Genetic diversity is the cornerstone of species survival and evolution. For most aquatic animals, keeping the high genetic diversity is the guarantee of population life ability. Groupers are important economic fishes for mariculture due to delicious taste and rich nutrition. With the rapid development of grouper breeding technology, the artificial culture of grouper has become the second marine fish industry of China in 2019. The hybrid grouper [*Epinephelus fuscoguttatus*(♀)× *E. lanceolatus*(♂)] is the maximum yield aquaculture grouper with heterosis of growth and disease resistance. In recent years, more and more culture groups showed growth phenotypes variation and frequent diseases. The decline of genetic diversity and inbreeding depression are considered to be the common reasons for the decline of aquaculture bio-economic traits. In order to explore whether the decrease of population genetic diversity leads to the decrease of breeding traits of hybrid grouper, in this study, 27 EST-SSRs markers were used to analyze the genetic diversity and population genetic structure of 6 groups of the hybrid grouper in the main seed production area. The results showed that, the average number of alleles (N_a) ranged from 6.666 7 to 8.555 6, the average number of effective alleles (N_e) from 3.511 6 to 3.959 0, and the average observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.764 6 to 0.794 3, the average expected heterozygosity (H_e) from 0.709 1 to 0.750 4, average polymorphism information content (PIC) ranged from 0.662 2 to 0.706 4. The results of molecular analysis of variance (AMOVA) showed that the variances among the groups, individuals within the group, and all individuals of the cultured groups of hybrid grouper were all at a significant level ($P < 0.01$), and principal coordinate analysis (PCoA) showed the difference mainly came from the individual. F_{st} between groups, genetic distance and cluster analysis showed that the HB and XC groups first clustered together, then clustered together with WT and HW groups, GC and QT groups first clustered together, FP groups were independent. Genetic structure analysis showed that all samples were divided into 5 theoretical groups ($K=5$). HB group was composed of FP, WT, XC and GC groups. The results of this study showed that the hybrid grouper population still had high genetic diversity, with clear grouping. The possibility of decline of hybrid varieties affected by parental inbreeding was not high. The variation of pathogenic organisms and irregular breeding management may be the causes of frequent diseases. Therefore, it is necessary to strengthen the management of non-toxic parent screening, aquaculture water and diseased fish, and cut off the vertical and horizontal transmission of viruses to achieve effective disease prevention and control. This study provides a theoretical basis for further genetic breeding and disease control of grouper.

Key words: hybrid grouper [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)]; EST-SSR; genetic diversity; genetic structure

Corresponding author: LUO Jian. E-mail: luojian@hainanu.edu.cn

Funding projects: Key R & D Projects in Hainan Province (ZDYF2019045); Major Scientific Research Projects in Hainan Province (ZDKJ2019011); Hainan Academician Lin Haoran Team Innovation Center Project; Special Funding for Modern Agricultural Technology System (CARS-47)