

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180910001

http://www.yykxjz.cn/

李炎璐, 陈超, 陈建国, 翟介明. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F<sub>1</sub> 的 DNA 甲基化分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 98-104

Li YL, Chen C, Chen JG, Zhai JM. DNA methylation analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and their F<sub>1</sub> hybrid. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 98-104

# 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F<sub>1</sub> 的 DNA 甲基化分析\*

李炎璐<sup>1</sup> 陈超<sup>1①</sup> 陈建国<sup>1</sup> 翟介明<sup>2</sup>

(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  
青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 莱州明波水产有限公司 莱州 261400)

**摘要** 为探讨石斑鱼杂种优势形成过程中基因组 DNA 甲基化水平的变化, 本研究采用甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术检测云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)、鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F<sub>1</sub> 3 个群体的基因组 DNA 甲基化水平, 分析杂交 F<sub>1</sub> 与亲本基因组 DNA 甲基化水平的差异。结果显示, 云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼的基因组 DNA 属于甲基化程度较高的类群; 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及其杂交 F<sub>1</sub> 的 DNA 总甲基化率分别为 60.62%、59.38%和 55.78%, DNA 全甲基化率分别为 31.37%、30.67%和 29.27%, DNA 半甲基化率分别为 29.25%、28.71%和 26.51%; 杂交 F<sub>1</sub> 的 DNA 总甲基化率、全甲基化率和半甲基化率均低于双亲, 并存在极显著差异( $P < 0.01$ ), 3 个群体的全甲基化率均大于半甲基化率。研究表明, 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F<sub>1</sub> DNA 甲基化水平与杂种优势呈负相关, 杂交 F<sub>1</sub> DNA 甲基化水平的降低可能是形成快速生长等杂种优势的原因之一。

**关键词** 云纹石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 杂交 F<sub>1</sub>; DNA 甲基化

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)06-0098-07

杂种优势是不同基因型的亲本杂交产生的杂交子代在生长、成活、抗逆性和品质等方面均优于双亲的现象。表观遗传学是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体空间结构的调控和非编码 RNA 调控等。其中, DNA 甲基化是最重要的基因表观修饰方式之一, 尤其是胞嘧啶甲基化, 能够保持整个基因组 DNA

的稳定, 并调控特定组织基因的表达(Cheng *et al.*, 2008)。Cedar(1988)研究表明, 基因组 DNA 的甲基化水平及分布与基因表达率显著相关。

用于分析 DNA 甲基化的方法很多, 包括甲基化胞嘧啶分离分析技术、甲基化生物亲和检测技术、甲基化特异性扩增技术、甲基化测序检测分析技术、甲基化基因芯片及图谱检测技术和甲基化传感器检

\* 山东省自然科学基金(ZR2015PC015)、中华人民共和国农业农村部农业国际合作交流项目-热带国家水产养殖科技创新合作(2130114181309)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项(20603022018023)共同资助 [This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong (ZR2015PC015), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, MARA, PRC Science, Technology and Innovation in Aquaculture with Tropical Countries (2130114181309), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund of Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022018023)]. 李炎璐, E-mail: ysfriilianlu@126.com

① 通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfriichenchao@126.com

收稿日期: 2018-09-10, 收修改稿日期: 2018-10-17

测分析技术等。其中, 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术因简便、高效、可靠等特点而得到广泛应用, 可在全基因组水平检测 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化程度, 能够准确分析不同基因组 DNA 甲基化差异。目前, 该技术已应用于水稻(*Oryza sativa*) (Xiong *et al.*, 1999)、猪(*Sus domesticus*) (蒋曹德, 2004)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (曹哲明等, 2007)、湿地松(*Pinus elliottii*, ♀)×加勒比松(*Pinus caribaea*, ♂)杂交 F<sub>1</sub> (李义良等, 2018)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, ♀)×虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*, ♂)杂交 F<sub>1</sub> (于涛等, 2010)、橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*, ♀)×荷那龙罗非鱼(*Oreochromis hornorum*, ♂)杂交 F<sub>1</sub> (尚慧文等, 2017)等多种生物以及杂交 F<sub>1</sub> 与亲本间的基因组 DNA 甲基化研究中。

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)和鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)均为暖温性礁栖鱼类, 云纹石斑鱼主要分布于日本、韩国以及我国的东海和南海, 具有个体大、生长快、肉质鲜美的特性(郭明兰等, 2008; 宋振鑫等, 2012); 鞍带石斑鱼主要分布于东南亚、大洋洲海域, 在我国主要分布于南海诸岛, 数量较少, 是石斑鱼类中体型最大的种类, 具有生长速度快、抗病性强、营养价值高等优点(Heemstra *et al.*, 1993; Sadovy *et al.*, 2000)。前期研究表明, 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F<sub>1</sub> (张梦淇等, 2016)在生长、抗逆性(邵彦翔等, 2017)、营养成分(王林娜等, 2018)等方面均具有明显的杂种优势, 是值得开发的优良新品种。本研究运用 MSAP 技术检测云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F<sub>1</sub> 3 个群体的基因组 DNA 甲基化水平, 分析杂交 F<sub>1</sub> 与亲本基因组 DNA 甲基化水平的差异, 从而研究基因组 DNA 甲基化水平的变化与杂种优势的关系,

为从表观遗传学方面揭示石斑鱼杂种优势的形成机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验材料均取自山东莱州明波水产有限公司, 选取云纹石斑鱼自交子代幼鱼群体、鞍带石斑鱼自交子代幼鱼群体以及云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F<sub>1</sub> 幼鱼群体为样本, 每个群体分别随机选取 30 尾, 取尾鳍于无水乙醇中, -20℃ 保存备用。

### 1.2 DNA 提取

DNA 的提取采用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 参照试剂盒说明书进行操作。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量与浓度。

### 1.3 甲基化扩增敏感多态性(MSAP)分析

MSAP 分析参照 Xiong 等(1999)的方法, 并对实验条件进行优化。

**1.3.1 双酶切及连接反应** 对各基因组 DNA 分别用 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 进行双酶切反应。反应体系包括 200 ng 基因组 DNA、2 U *Hpa* II / *Msp* I、2 U *EcoR* I、2.5 μl 10×Buffer Tango, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl, 37℃ 水浴酶切 6 h, 再 65℃ 酶切变性 10 min。连接体系包括 5 μl 酶切产物、1 μl HM 接头、1 μl E 接头、5 U T<sub>4</sub> DNA 连接酶、4 μl 5×T<sub>4</sub> DNA 连接酶缓冲液, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μl, 16℃ 连接过夜, 产物稀释 10 倍用于预扩增。实验所用接头与引物组合序列如表 1 所示。

表 1 所用接头和引物序列  
Tab.1 Sequence of adapters and primers used for the MSAP analysis

项目 Items	<i>EcoR</i> I (5'~3')	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (5'~3')
接头	EA <sub>1</sub> : CTCGTAGACTGCGTACC	HMA <sub>1</sub> : GATCATGAGTCCTGCT
Adapters	EA <sub>2</sub> : AATTGGTACGCAGTC	HMA <sub>2</sub> : CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物	E <sub>0</sub> : GACTGCGTACCAATTCA	HM <sub>0</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGG
Pre-amplification primers		
选扩增引物	E <sub>1</sub> : GACTGCGTACCAATTCAAC	HM <sub>1</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTTCG
Selective amplification primers	E <sub>2</sub> : GACTGCGTACCAATTCAAG	HM <sub>2</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
	E <sub>3</sub> : GACTGCGTACCAATTCACA	HM <sub>3</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
	E <sub>4</sub> : GACTGCGTACCAATTCAC	HM <sub>4</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT
	E <sub>5</sub> : GACTGCGTACCAATTCAG	HM <sub>5</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC
	E <sub>6</sub> : GACTGCGTACCAATTCAGC	HM <sub>6</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
	E <sub>7</sub> : GACTGCGTACCAATTCATC	HM <sub>7</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
		HM <sub>8</sub> : ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC

**1.3.2 预扩增反应** 预扩增体系包括 2  $\mu$ l 稀释连接产物、1  $\mu$ l  $E_0$  和  $HM_0$  预扩引物、0.5  $\mu$ l *Taq* DNA Polymerase、2.5  $\mu$ l 10 $\times$ *Taq* Buffer、0.5  $\mu$ l dNTPs, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ l。预扩增程序设置为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、56 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 共进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。产物稀释 20 倍用于选择性扩增反应。

**1.3.3 选择性扩增反应** 选择扩增体系包括 2  $\mu$ l 稀释预扩增产物、1  $\mu$ l  $HM_n$  和  $En$  选扩引物、0.5  $\mu$ l *Taq* DNA Polymerase、2.5  $\mu$ l 10 $\times$ *Taq* Buffer、0.5  $\mu$ l dNTPs, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ l。选择性扩增反应设置为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 第 1 轮扩增参数为 94 $^{\circ}$ C 30 s、65 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 80 s, 之后每轮循环, 温度递减 0.7 $^{\circ}$ C, 共进行 12 个循环; 第 2 轮扩增参数为 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 80 s, 共进行 23 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.3.4 产物检测** 用 ABI Prism 377 型测序仪电泳检测片段大小, 通过 GENESCAN 软件进行数据收集和分析, 输出凝胶电泳图谱。

**1.3.5 数据统计与分析** 对同一样品 DNA 分别用 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 识别并切割 CCGG 序列, 扩增出的每条片段代表 1 个 CCGG 识别位点, 在 MSAP 图谱上, 每个样品分别对应有 H 和 M 两个泳道, 同一位点上有条带出现计为“1”, 无条带计为“0”, 根据扩增产物在 2 个泳道内有无的情况, 将甲基化模式分为 4 种类型。I 型, 2 个泳道均有带, 即“H、M”带型为“1、1”, 为去甲基化位点; II 型, H 泳道有带, M 泳道无带, 即带型为“1、0”, 为单链外甲基化, 代表半甲基化位点; III 型, H 泳道无带, M 泳道有带, 即带型为“0、1”, 为双链内甲基化, 为全甲基化位点; IV 型, H 和 M 泳道均没有带“0、0”, 为双链外甲基化的位点, IV 型位点不进行统计。统计 50~500 bp 的条带, 计算各群体的半甲基化率、全甲基化率和总甲基化率, 并利用 SPSS 19.0 进行方差分析。计算方法为: 半甲基化率(%)=半甲基化条带数(II)/总扩增条带数(I+II+III) $\times$ 100%, 全甲基化率(%)=全甲基化条带数(III)/总扩增条带数(I+II+III) $\times$ 100%, 总甲基化率(MSAP)(%)=甲基化总条带数(II+III)/总扩增条带数(I+II+III) $\times$ 100%。

## 2 结果

### 2.1 引物组合

云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和云纹石斑鱼(♀) $\times$ 鞍带石斑鱼(♂)杂交  $F_1$  的基因组 DNA 经酶切、连接和预

扩增后, 由 7 个 E 和 8 个 HM 引物组成的引物组合进行选择扩增, 根据所有扩增结果, 筛选 8 对具有多态性好、重复性好、条带清晰的选扩引物组合( $E_1HM_6$ 、 $E_3HM_5$ 、 $E_3HM_6$ 、 $E_4HM_7$ 、 $E_4HM_8$ 、 $E_5HM_4$ 、 $E_5HM_7$  和  $E_5HM_8$ )进行基因组 DNA 的 MSAP 分析。MSAP 扩增片段长度大多在 50~1000 bp, 主要集中在 50~500 bp, 大于 500 bp 条带很少, 因此, 本研究统计的数据为 50~500 bp 的条带。

### 2.2 3 个石斑鱼群体基因组 DNA 甲基化 MSAP 图谱

3 个石斑鱼群体基因组 DNA 的选扩产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 得到的扩增结果 MSAP 图谱如图 1 所示。结果显示, DNA 甲基化 MSAP 图谱形成了 3 种不同类型的条带, 包括“H、M”条带为“1、1”的 I 型、“H、M”条带为“1、0”的 II 型和“H、M”条带为“0、1”的 III 型 3 种甲基化类型。

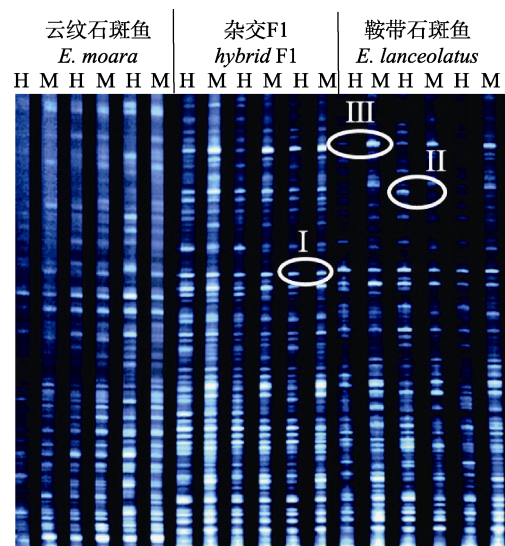


图 1 3 个石斑鱼群体基因组 DNA 甲基化 MSAP 图谱( $E_4HM_7$ )

Fig.1 Genomic DNA methylation MSAP profiles of *E.moara*, *E.lanceolatus* and the hybrid  $F_1$ ( $E_4HM_7$ )

H: *EcoR* I / *Hpa* II 双酶切; M: *EcoR* I / *Msp* I 双酶切;  
I: 去甲基化位点; II: 半甲基化位点; III: 全甲基化位点  
H: *EcoR* I / *Hpa* II double digestion;  
M: *EcoR* I / *Msp* I double digestion;  
I: Unmethylated sites; II: Hemi-methylated sites;  
III: Fully methylated sites

### 2.3 3 个石斑鱼群体间 DNA 甲基化水平差异分析

8 对引物对 3 个石斑鱼群体的扩增结果如表 2 所示。云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交  $F_1$  3 个群体扩增的总位点数分别为 5840、5781 和 6246, 其中, 总甲

甲基化位点分别为 3540、3433 和 3484。云纹石斑鱼群体的总甲基化率为 60.62%，其中，全甲基化率为 31.37%，半甲基化率为 29.25%；鞍带石斑鱼群体的总甲基化率为 59.38%，其中，全甲基化率为 30.67%，半甲基化率为 28.71%；杂交 F<sub>1</sub> 群体的总甲基化率为 55.78%，其中，全甲基化率为 29.27%，半甲基化率为 26.51%。结果显示，杂交 F<sub>1</sub> 的 DNA 总甲基化率、全甲基化率和半甲基化率均低于亲本，杂交 F<sub>1</sub> 与双亲之间的 DNA 甲基化水平均存在极显著差异 ( $P < 0.01$ )，3 个群体的全甲基化率均大于半甲基化率。

### 3 讨论

#### 3.1 DNA 甲基化水平的差异性

不同物种间甲基化水平存在一定的差异，可能是由于在真核生物的不同物种中，DNA 甲基化的调控作用所占的重要性不同而造成的，同时，不同物种相同组织以及同一物种不同组织的甲基化水平均存在差异。近年来，随着 MSAP 技术的不断发展，MSAP 在动植物研究中得到了广泛应用。研究表明，棉花

(*Gossypium* spp.) 的总甲基化水平为 20%~27.1% (赵云雷, 2007)；哺乳动物如猪不同组织的总甲基化水平为 40.6% 和 44.8%，羊 (*Caprinae*) 为 45.7% (唐韶青等, 2006)；禽类如鸡 (*Gallus domesticus*) 不同组织的总甲基化水平为 44.6% 和 47.9%，鸭为 40.7% (唐韶青等, 2006)；在水产动物中，总甲基化水平大多集中在 20%~50% 之间，如栉孔扇贝为 32.79%、虾夷扇贝为 24.13% (于涛等, 2010)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 为 26% (Jiang *et al.*, 2013)、刺参 (*Apostichopus japonicus*) 为 23.36%~56.52% (郭婷婷等, 2013; Zhao *et al.*, 2015; 左之良等, 2016)、背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 为 35.5%~56% (曹哲明等, 2009)、文蛤 (*Meretrix meretrix*) 为 26.7%~30.0% (朱东丽, 2011)、尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 为 23.74% (朱华平等, 2013)。在周莹等 (2017) 的报道中，棕点石斑鱼 (*E.fuscoguttatus*) 和鞍带石斑鱼的总甲基化率分别为 57.18% 和 63.16%。在本研究中，云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼总甲基化率分别为 60.62% 和 59.38%，与周莹等 (2017) 的研究结果较为接近，由此推测，石斑鱼群体基因组 DNA 属于甲基化程度较高的类群。

表 2 3 个石斑鱼群体间 DNA 甲基化水平比较

Tab.2 Comparison of DNA methylation levels of *E.moara*, *E.lanceolatus* and the hybrid F<sub>1</sub>

石斑鱼 Grouper	总位点 Total sites	非甲基化位点数 及百分率 Non-methylation sites and percentages	甲基化位点 Methylated sites		
			总甲基化位点及百分率 Total methylation sites and percentages	全甲基化位点及百分率 Full methylation sites and percentages	半甲基化位点及百分率 Hemi-methylation sites and percentages
云纹石斑鱼 <i>E. moara</i>	5840	2300(39.38%)	3540(60.62%)	1832(31.37%)	1708(29.25%)
鞍带石斑鱼 <i>E. lanceolatus</i>	5781	2348(40.62%)	3433(59.38%)	1773(30.67%)	1660(28.71%)
杂交 F <sub>1</sub> Hybrid F <sub>1</sub>	6246	2762(44.22%)	3484(55.78%)	1828(29.27%)	1656(26.51%)

#### 3.2 DNA 甲基化水平差异与杂种优势的相关性分析

研究表明，DNA 甲基化可以调控基因的表达 (Cedar, 1988)，在杂交组合中，亲本基因组 DNA 甲基化模式经过复杂的调整，将大部分模式稳定遗传给后代外，基因组 DNA 的甲基化和去甲基化水平均发生了改变。

近年来，学者多倾向于从基因组 DNA 甲基化的角度分析杂交后代与亲本的差异，以及这种差异与杂种优势的关系。洪舟等 (2009) 研究发现，杉木杂交 F<sub>1</sub> 的甲基化水平呈显著减少的趋势，并且与树高、胸径和材积性状的杂种优势均呈显著负相关；重庆山地黄牛 (*Bos taurus*) 杂交 F<sub>1</sub> 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，并且甲基化水平与胸围、体重等杂种优势率存在显著负相关 (万亚琴, 2008)；栉孔扇贝 (♀) × 虾夷扇贝 (♂) 杂交 F<sub>1</sub> 的总甲基化率降低，显示 DNA 甲基化率与生长相关的性状呈负相关 (吴彪等, 2012)；橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼以及杂交 F<sub>1</sub> 莫荷罗非鱼“广福 1 号”的总甲基化率分别为 32.21%、38.03% 和 29.77%，杂交 F<sub>1</sub> 的甲基化水平低于双亲，杂交 F<sub>1</sub> 幼鱼在生长速度、耐盐胁迫方面具有明显的杂种优势 (刘玉姣, 2014; 李茜茜, 2016)，研究推测，杂交 F<sub>1</sub> 基因组 DNA 甲基化水平的降低和甲基化模式的重调可能与耐盐胁迫的杂种优势有关 (尚慧文等, 2017)；棕点石斑鱼 (♀) × 鞍带石斑鱼 (♂) 杂交 F<sub>1</sub> 是具有抗病力强、生长速度快等较强杂

种优势的杂交后代, 棕点石斑鱼、鞍带石斑鱼和杂交  $F_1$  的 DNA 总甲基化率分别为 57.18%、63.16%和 54.76%, 杂交  $F_1$  的 DNA 总甲基化率低于双亲, 推测甲基化水平的降低有利于杂种优势的形成(周莹等, 2017)。

本研究中, 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交  $F_1$  的 DNA 总甲基化率(55.78%)低于云纹石斑鱼(60.62%)和鞍带石斑鱼(59.38%), 杂交  $F_1$  的 DNA 全甲基化率和半甲基化率也均显著低于双亲, 这与上述研究发现的杂交  $F_1$  的甲基化水平降低的结果相一致。3 个石斑鱼群体基因组 DNA 的全甲基化位点数均多于半甲基化位点数, 与哺乳动物基因组全甲基化位点较多、半甲基化位点较少的研究结果相一致(唐韶青等, 2006)。杂交  $F_1$  (张梦淇等, 2016)在生长、抗逆性(邵彦翔等, 2017)、营养成分(王林娜等, 2018)等方面均具有明显的杂种优势, 结合本研究, 杂交  $F_1$  的 DNA 甲基化水平与杂种优势呈负相关, 推测杂交  $F_1$  基因组 DNA 甲基化水平的降低、甲基化模式的改变和重新调整可能是形成快速生长等杂种优势的诸多原因之一。

上述动植物 DNA 甲基化水平与杂种优势均呈负相关关系, 研究证明了杂种优势的形成与杂交  $F_1$  基因组 DNA 总甲基化水平的降低有关。一般来说, DNA 甲基化与基因表达呈负相关关系, 杂交后代基因组 DNA 甲基化水平降低, 激活了许多沉默基因, 基因的表达活性增强(Tsaftaris *et al.*, 1997), 使杂交后代表现出杂种优势。关于特异基因的甲基化水平与杂种优势之间的关系, 以及这些 DNA 甲基化位点的遗传方式、对基因结构及功能的作用和调控机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Cao ZM, Ding WD, Yu JH, *et al.* Differences in methylated loci among different grass carp individuals from one pair of parents. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(6): 1083–1088 [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. *动物学报*, 2007, 53(6): 1083–1088]
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Science*, 2009, 18(6): 2011–2016 [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011–2016]
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*, 1988, 53(1): 3–4
- Cheng XD, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective. *Structure*, 2008, 16(3): 341–350
- Guo ML, Su YQ, Chen XF, *et al.* Comparative studies on morphology of *Epinephelus moara* and *E. Bruneus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(6): 106–114 [郭明兰, 苏永全, 陈晓峰, 等. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼形态比较研究. *海洋学报*, 2008, 30(6): 106–114]
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome and methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 77–82 [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 77–82]
- Heemstra PC, Randall JE. Groupers of the world. *FAO Fisheries Synopsis*, 1993, 16 (125): 130–132
- Hong Z, Shi JS, Zheng RH, *et al.* Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation in Chinese fir(*Cunninghamia lanceolata*) intraspecific hybrids. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(3): 591–598 [洪舟, 施季森, 郑仁华, 等. 杉木亲本自交系及其杂交种 DNA 甲基化和表观遗传变异. *分子植物育种*, 2009, 7(3): 591–598]
- Jiang CD. Relationship between DNA methylation and hybrid performances and pig genetic diversity analysis. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2004 [蒋曹德. 猪 DNA 甲基化与杂种表现的关系及遗传多样性分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2004]
- Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al.* Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genes and Genomics*, 2013, 35(5): 641–647
- Li QQ. Cloning and expression characterization analysis of *AQP1* and *mTOR* genes related to salt-alkaline tolerance in tilapia. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [李茜茜. 罗非鱼耐盐碱相关基因 *AQP1*、*mTOR* 克隆和表达特征分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Li YL, Zhao FC, Zhong SY, *et al.* Epigenetic analysis and DNA methylation in *Pinus elliottii*×*Pinus caribaea* and their parents. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(1): 76–81 [李义良, 赵奋成, 钟岁英, 等. 湿加松及亲本 DNA 甲基化和表观遗传分析. *分子植物育种*, 2018, 16(1): 76–81]
- Liu YJ. A study on salt tolerance related genes of *Oreochromis mossambicus*, *O. hornorum* and their hybrids. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [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. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Sadovy Y, Cornish AS. Reef fishes of Hong Kong. Hong Kong: Hong Kong University Press, 2000
- Shang HW, Liu ZG, Zhu HP, *et al.* Analysis of DNA methylation difference between “Mohe” hybrid tilapia and its parents. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(11): 1699–1709 [尚慧文, 刘志刚, 朱华平, 等. 莫荷罗非鱼“广福 1 号”与其亲本间 DNA 甲基化的差异分析. *水产学报*, 2017, 41(11): 1699–1709]
- Shao YX, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of low temperature stress

- on serum biochemical indices of the juvenile hybrid of *Epinephelus moara*(♀) × *Epinephelus lanceolatus*(♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 70–76 [邵彦翔, 陈超, 李炎璐, 等. 低温胁迫对云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 70–76]
- Song ZX, Chen C, Zhai JM, *et al.* Embryonic development and morphological characteristics of larval, juvenile and young kelp bass, *Epinephelus moara*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 26–34 [宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼胚胎发育及仔、稚、幼鱼形态观察. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 26–34]
- Sun Q, Wu L, Ni Z, *et al.* Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Science*, 2004, 166: 651–657 Tang SQ, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(4): 507–510 [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. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 507–510]
- Tsaftaris AS, Kafka M, Polidoros A, *et al.* Epigenetic changes in maize DNA and heterosis. *Cimmyt*, 1997, 112
- Wan YQ. Study on the relationship between DNA methylation and heterosis in beef cattle. Master's Thesis of Southwest University, 2008 [万亚琴. DNA 甲基化与肉牛杂种优势关系的初步研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Wang LN, Tian YS, Tang J, *et al.* Analysis and quality evaluation of nutritional components in the muscle of *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus* and hybrid “Yunlong grouper”. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(7): 1085–1093 [王林娜, 田永胜, 唐江, 等. 云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼及杂交“云龙斑”肌肉营养成分分析及品质评价. *水产学报*, 2018, 42(7): 1085–1093]
- Wu B, Yang AG, Liu ZH, *et al.* Comparison of early growth and DNA methylation between hybridized families and self-fertilize families of two scallops. *Marine Sciences*, 2012, 36(2): 1–6 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种扇贝杂交和自交家系早期生长及甲基化的比较分析. *海洋科学*, 2012, 36(2): 1–6]
- Xiong LZ, Xu CC, Saghai MA, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(3): 439–446
- Yu T, Yang AG, Wu B, *et al.* Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1335–1342 [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. *水产学报*, 2010, 34(9): 1335–1342]
- Zhang MQ, Chen C, Li YL, *et al.* Effects of salinity on the hatching of the fertilized eggs of *Epinephelus moara*(♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) and the observation of the morphological development of larvae, juvenile and young fish. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 82–89 [张梦淇, 陈超, 李炎璐, 等. 盐度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂)受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 82–89]
- Zhao Y, Chen MY, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 181: 26–32
- Zhao YL. Analysis of DNA methylation and differential gene expression between cotton hybrids and their parents. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2007 [赵云雷. 棉花杂交种与亲本间 DNA 胞嘧啶甲基化及其基因差异表达分析. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2007]
- Zhou Y, Han YL, Luo J, *et al.* Methylation-sensitive amplification polymorphism analysis of genomic DNA methylation on *Epinephelus lanceolatus*, *Epinephelus fuscoguttatus* and their hybrid generation. *Journal of Hainan University (Natural Science)*, 2017, 35(2): 145–151 [周莹, 韩玉龙, 骆剑, 等. 鞍带石斑鱼、棕点石斑鱼及其杂交子代 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *海南大学学报(自然科学版)*, 2017, 35(2): 145–151]
- Zhu DL. The analysis of molecular markers and DNA methylation in the different strains of *Meretrix meretrix*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [朱东丽. 文蛤(*Meretrix meretrix*)不同壳色花纹品系的分子标记及 DNA 甲基化分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Zhu HP, Lu MX, Huang ZH, *et al.* Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(10): 1460–1467 [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. *水产学报*, 2013, 37(10): 1460–1467]
- Zuo ZL, Tan J, Wu B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white *A. japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 93–100 [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. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 93–100]

## DNA Methylation Analysis of *Epinephelus moara*, *Epinephelus lanceolatus* and Their F<sub>1</sub> Hybrid

LI Yanlu<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>1①</sup>, CHEN Jianguo<sup>1</sup>, ZHAI Jieming<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai 261400)

**Abstract** DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications. It is vital to maintain the stability of the whole genome and regulate the expression of tissue-specific genes. Methylation level and distribution throughout genomic DNA are significantly correlated with gene expression rate. In order to investigate the changes of genomic DNA methylation level associated with heterosis of *Epinephelus* spp., we applied methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technology to detect the genomic DNA methylation levels of longtooth grouper (*E. moara*), giant grouper (*E. lanceolatus*), and their F<sub>1</sub> hybrid [*E. moara* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)], and we analyzed the difference of DNA methylation level between the F<sub>1</sub> hybrid and parents. The results showed that overall genomic DNA methylation was higher in *E. moara* and *E. lanceolatus*. The total methylation rates of *E. moara*, *E. lanceolatus*, and the F<sub>1</sub> hybrid were 60.62%, 59.38%, and 55.78%, respectively. The rates of fully methylated sites were 31.37%, 30.67%, and 29.27%, respectively, and the hemi-methylation rates were 29.25%, 28.71%, and 26.51%, respectively. The total methylation rate, the full methylation rate, and the hemi-methylation rate of DNA of the F<sub>1</sub> hybrid were all significantly lower ( $P < 0.01$ ) than that of either parent. The full methylation rates were all higher than the hemi-methylation rates of *E. moara*, *E. lanceolatus*, and the F<sub>1</sub> hybrid. The study also showed that the DNA methylation level of the F<sub>1</sub> hybrid is negatively correlated with heterosis. Moreover, reduced DNA methylation level of the F<sub>1</sub> hybrid may be one of the reasons for the heterosis phenomena such as rapid growth. In general, DNA methylation is negatively correlated with gene expression. The DNA methylation level of the hybrid was lower than either parent, allowing otherwise silenced genes to be activated, enhancing gene expression activity, and resulting in the hybrid progeny exhibiting heterosis. The relationship between methylation level of specific genes and heterosis, the genetic pattern of these DNA methylation sites, the effect on gene structure and function, and the regulatory mechanism require further study.

**Key words** *Epinephelus moara*; *Epinephelus lanceolatus*; Hybrid F<sub>1</sub>; DNA methylation

① Corresponding author: CHEN Chao, E-mail: ysfrichenchao@126.com