

doi: 10.7541/2024.2023.0207

棕点石斑鱼(♀) × 清水石斑鱼(♂) 杂交子代与亲本表型比较及遗传特征分析

王同¹ 方明宇¹ 杨扬¹ 宋乐玲¹ 蔡春有² 蒙子宁^{1,3} 刘晓春^{1,3}

(1. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510006; 2. 海南晨海水产有限公司, 三亚 572000; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海), 珠海 519080)

摘要: 以棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)为母本、清水石斑鱼(*E. polyphekadion*)为父本, 开展了杂交育种试验, 成功获得杂交子一代。由于棕点石斑鱼与清水石斑鱼外型相似, 其杂交子代也与亲本难以区分, 为探究双亲本与杂交子代表型差异和遗传差异, 研究利用外部形态数据及外型框架参数进行比较分析, 同时使用微卫星标记对双亲本及杂交子代的遗传特征进行分析。在外部形态结构的探究中, 杂交子代可量性状及外形框架更偏向于母本棕点石斑鱼。在遗传特征的分析中, 采用ddRAD-seq技术在棕点石斑鱼上获得6266个微卫星标记, 筛选出7对可以在双亲本及杂交子代中稳定扩增且遗传多样性较高的微卫星引物, 其中, 6对引物可以在部分群体中扩增出特异性条带以区分3个群体。通过分析, 7个微卫星标记位点在杂交子代群体中的平均观测杂合度(H_o)为0.891, 平均期望杂合度(H_e)为0.768, 平均多态信息含量(PIC)为0.717, 三者均高于双亲本, 表明杂交子代在遗传信息的多样性方面有一定的提高。研究结果可为棕点石斑鱼、清水石斑鱼及两者杂交子代的鉴别提供方法, 并为杂交石斑鱼的培育提供一定的理论基础。

关键词: 杂交育种; 表型; 微卫星标记; 棕点石斑鱼; 清水石斑鱼

中图分类号: S961.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2024)03-0444-10



杂交育种可以将亲本的优势性状结合到一起, 从而获得性状优良的杂交新品种^[1]。杂交育种技术已经在家禽^[2]、家畜^[3]及粮食作物^[4]、蔬菜^[5]等众多经济物种中得到良好应用。从20世纪50年代末至今, 我国共有一百多种鱼类进行过杂交育种试验, 并获得多个优良杂交品种^[6, 7]。根据中华人民共和国农业农村部历年公告, 截至2023年, 经我国农业部水产原良种审定委员会审定通过的142个鱼类新品种中, 杂交种共有48个, 占比33.8%。因此, 杂交育种作为行之有效的育种手段之一, 已经广泛应用于农业生产系统。

外部形态结构特征不同物种遗传特性最为直观的外在表现, 进行亲本及杂交子代的表型差异

对比可以最直观地分析群体之间存在的差异。在外部形态结构的对比研究中, 可量性状与可数性状在水产领域中应用较多。为了更好地进行品系鉴定, Strauss等^[8]提出鱼体框架分析法, 选取一定的框架坐标点, 对点之间的距离进行测量, 并采取多种分析方法对鱼的外部形态差异进行探究。在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)杂交子代与其亲本形态特征比较中, 对正反交后代两种杂交子代的外部形态结构数据进行聚类分析及主成分分析, 发现杂交子代均与大鳞副泥鳅更相似^[9], 王燕等^[10]结合普通性状测定与框架分析, 对5种石斑鱼的相关性状并进行了统计分析。冉光鑫等^[11]对180条四川裂腹鱼(*Schi-*

收稿日期: 2023-06-30; 修订日期: 2023-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(U22A20531和32273132); 现代农业产业技术体系(CARS47); 国家重点研发计划(2018YFD0900203); 海南省院士团队创新中心(YSPTZX202122)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (U22A20531 and 32273132); China Agriculture Research System (CARS47); National Key Research and Development Program (2018YFD0900203); Project of Hainan Academician Team Innovation Center (YSPTZX202122)]

作者简介: 王同(1997—), 男, 在读博士研究生; 研究方向为鱼类分子育种。E-mail: sysuwangtong@163.com

通信作者: 刘晓春(1968—), 男, 博士; 研究方向为鱼类生殖生理学、分子内分泌学以及遗传育种学。E-mail: lsslc@mail.sysu.edu.cn

zthorax kozlovi)和180条光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatu*s)的25个比例性状进行了统计, 并进行了判别分析和主成分分析, 探究两种鱼的外部形态差异, 鉴别外部相关特征。对种间外部形态结构特征的比较分析, 可以为品种鉴定及分类提供参考资料, 具有重要的指导意义。

在杂交组合的亲本中, 控制优势性状的遗传位点在杂合状态时大多表现出不完全显性, 通过杂交育种则可以产生全新的基因型组合, 从而在杂交子代实现优势性状的理想搭配^[12]。通过杂交育种, 杂交子代可以形成更高的遗传多样性, 而遗传多样性的评价可以为动植物育种和遗传改良奠定基础^[13]。对亲本及杂交子代分子遗传指标的比对可以为杂交育种性状的进一步筛选提供理论依据。此外, 在微卫星的筛选过程中, 可以发现种间存在的特异性条带, 对种间鉴定起到一定作用。

微卫星标记因其基团重复数目变化大、多态性丰富、扩增稳定、位点数量众多并广泛分布于基因组等特点^[14], 在鉴定物种的种间差异性和种内遗传多样性上具有很大的优势, 并且可以在杂交育种中用于分析亲本与杂交子代的遗传关系、探究杂种优势、分析种群的遗传变异等^[15]。在常见作物的杂交育种中, 如水稻(*Oryza sativa*)^[16]、小麦(*Triticum aestivum*)^[17]、玉米(*Zea mays*)^[18]等, 微卫星标记对杂交种的性状探究及亲本的选配都起到了重要的指导作用。在水产生物中, 微卫星分子标记也在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[19]、对虾(*Penaeus*)^[20]、鲍(*Haliotis*)^[21]、牡蛎(*Ostreidae*)^[22]、红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)^[23]、海鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[24]等物种中进行了遗传结构及遗传多样性的分析, 为后续的选育及杂交提供了理论基础。

石斑鱼隶属鲈形目(Perciformes), 石斑鱼科(Epinephelidae), 共有16个属, 160多个种, 其中, 在中国海域内约有60种, 国内有养殖记录的共40多种^[25]。石斑鱼具有丰富的种质资源, 为开展杂交育种提供了非常有利的基础。迄今为止, 通过杂交育种已经获得了虎龙杂交斑和云龙石斑鱼两个水产新品种, 极大的推动了石斑鱼养殖产业的发展。因此, 我们团队开展了大量石斑鱼杂交育种组合试验, 并获得了多个有潜在开发前景的杂交后代。其中, 以棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)为母本、清水石斑鱼(*E. polyphkadion*)为父本的杂交组合, 其子代在生产上体现出诸如抗逆性等优势性状, 经培育有望成为新品种。本文利用微卫星分子标记, 对棕点石斑鱼、清水石斑鱼及杂交子代3个群体的外部形态结构及外型框架参数进行探究, 同时使用

微卫星标记对双亲本及杂交子代的遗传特征进行分析, 以期为石斑鱼的种间鉴定及杂交新品种的培育提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼与样品采集

本实验所用的棕点石斑鱼、清水石斑鱼及杂交子代来自于海南晨海水产有限公司, 个体均为1.5—2.5龄群体, 所有个体体型大小相近。测量及取样前, 3个群体在水泥池中暂养1周, 饲养温度26—30℃, 溶解氧为5—6 mg/L。对3个群体, 每个群体随机挑选的30尾石斑鱼进行外部形态的测定并剪取尾鳍条保存于95%酒精中。

1.2 实验方法

杂交子代及其亲本外部形态结构数据的测定与统计分析 对12个可量性状进行精准的测定, 测定范围见图1。框架系统测定D1—2、D1—3等21项框架性状参数, 具体参照位点可见图2。比值处理可量性状, 减少不同鱼体大小对实验结果造成的影响, 最终得到11个比值数据, 通过公式1计算杂交指数(HI)。分别将这11个可量性状比值与21个框架性状参数数据总计32个数据使用SPSS统计软件进行聚类分析和主成分因子分析。

$$\text{杂交指数(HI)} = \frac{100 \times (\text{杂交子代平均值} - \text{母本平均值})}{(\text{父本平均值} - \text{母本平均值})} \quad (1)$$

DNA提取 使用海洋动物组织基因组DNA

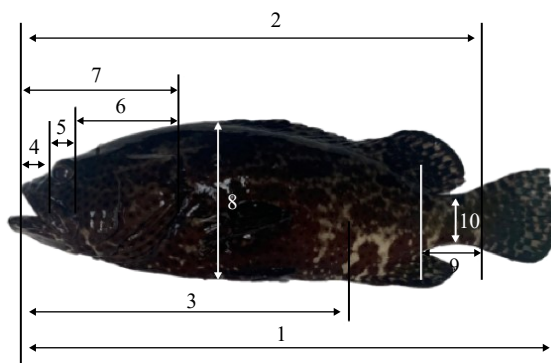


图1 石斑鱼形态学长度测定范围

Fig. 1 The measuring range of morphological length of grouper

1. 全长; 2. 体长; 3. 肛前体长; 4. 吻长; 5. 眼径; 6. 眼后头长; 7. 头长; 8. 体高; 9. 尾柄长; 10. 尾柄高

1. total length, TL; 2. standard length, SL; 3. length before anus, LBA; 4. snout length, SL; 5. eye diameter, ED; 6. head length after eye, HLAE; 7. head length, HL; 8. body depth, BD; 9. caudal peduncle length, CPL; 10. caudal peduncle depth, CPD

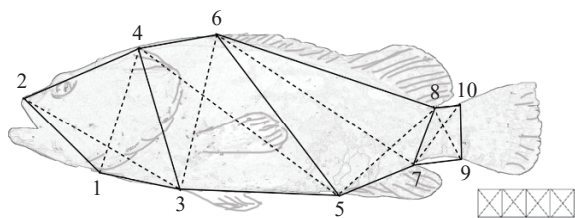


图2 石斑鱼框架测量图

Fig. 2 The truss network of grouper

划分得到1—10十个坐标点,其中D1—2表示坐标点1与2之间的距离,以此类推。1. 鳃盖下末端;2. 吻端;3. 腹鳍前端;4. 鳃盖的上末端;5. 臀鳍前端;6. 背鳍前端;7. 臀鳍下末端;8. 背鳍末端;9. 尾鳍下前端;10. 尾鳍上前端

Coordinate points are divided into 1—10; D1—2 represents the distance between coordinate point 1 and coordinate point 2, and so on. 1. the lower end of the gill cover; 2. the upper front of snout; 3. the front end of the ventral fin; 4. the upper end of the gill cover; 5. the front end of the gluteal fin; 6. the front end of the dorsal fin; 7. the rear end of the gluteal fin; 8. the rear end of the dorsal fin; 9. the lower front end of the caudal fin; 10. the upper front end of the caudal fin

提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京;DP324)对取样的90尾石斑鱼的尾鳍条提取DNA,提取后的DNA用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop分光光度计检测浓度和质量。

微卫星分子标记的筛选 微卫星分子标记筛选的过程利用ddRAD-seq (Double digest restriction-site associated DNA sequencing)技术,将提取后的一个棕点石斑鱼DNA样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司构建RAD文库,使用6碱基酶EcoRI进行RAD酶切建库,在片段两端加上相应接头,扩增后构建测序文库。使用Paired-End100策略上机(Illumina HiSeq2000)进行高通量测序,测序所得数据进行RAD tag (标签)的聚类,产生组装 apirend read (read 2),通过contig检测和组装得到长度约300 bp的酶切相关 contig,用以开发SSR标记。根据测序结果,使用MISA软件初步筛选SSR标记,MISA参数设置为二核苷酸重复6次以上,三核苷酸重复5次以上,四核苷酸重复5次以上,五核苷酸重复5次,六核苷酸重复5次以上,两个SSR之间的间隔为100 bp以上。然后进行初筛,随机挑选80个重复数在10至25之间的二核苷酸重复、重复数在6至20之间的三核苷酸重复进行引物合成。而后进行PCR扩增,实验设置平行对照,每一对微卫星引物用8个DNA模板进行扩增。PCR反应总体积为10 μ L,其中,加入2 $\times$ Taq PCR StarMix 5 μ L, ddH₂O 3.2 μ L, 3'及5'端微卫星引物各0.4 μ L, DNA模板1 μ L。PCR程序设定为: 95 $^{\circ}$ C预变性5min;接着在95 $^{\circ}$ C、68 $^{\circ}$ C和

72 $^{\circ}$ C各反应30s,共10个循环,每个循环降低1 $^{\circ}$ C;然后95 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C和72 $^{\circ}$ C各反应30s,共25个循环,最后,72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,在120 V电压下电泳16min,并观察条带。保留琼脂糖凝胶电泳中具有单一亮条带的微卫星标记,确认引物可用。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),PCR产物在8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,每泳道上样PCR产物3 μ L, DNA Marker (10 bp DNA Ladder) 为3 μ L,电泳缓冲液为0.5 $\times$ TBE,电压600 V下电泳1h。在电泳完成后,进行硝酸银染色,最后将胶片平铺并拍照分析,再进行微卫星位点的多态性筛选。根据电泳显示的结果,挑选等位基因数大于等于3且没有非特异性扩增的微卫星位点,再进行群体扩增。

群体扩增与毛细管电泳 每个微卫星位点的正向引物5'端用荧光染料标记。PCR程序设定为: 95 $^{\circ}$ C预变性5min; 95 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C各反应30s,共38个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR产物进行毛细管电泳短片重复序列(Short tandem repeat, STR)分型检测,使用ABI 3730 Analyzer进行检测后,利用Genemapper 4.0软件分析,所用内标为LIZ500,可检测FAM、HEX和ROX三种荧光。根据所得到的峰值判断微卫星分子位点在3个群体中的多态性程度,从而对微卫星分子位点进行更为精确的筛选。

数据处理 根据上述结果计算等位基因数 (Alleles number, A)、等位基因频率 (Allele frequency), 并利用Cervus软件运算观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e) 和多态信息含量 (Polymorphic information content, PIC)^[26, 27]。

2 结果

2.1 杂交子代与亲本可量性状数据比较分析

根据SPSS分析结果表明(表1),棕点石斑鱼与清水石斑鱼有5个可量性状比值呈现显著性差异,占全部可量性状比值的45.45%;杂交子代与两个亲本相比,有8个可量性状比值均呈现出了显著性差异,占全部可量性状比值的72.73%。

由表1可以看出,在11个可量性状比值中,体长/体高、体长/体宽、体长/头长、体长/尾柄长、尾柄长/尾柄高、头长/吻长、头长/眼间距、头长/眼后头长表现为超亲偏离;全长/体长表现为偏父本;头长/眼径表现为偏母本;杂交指数(HI)均值为49.76,结果表现出杂交子代可量性状的比值接近于中心数值。

表 1 杂交斑及亲本可量性状比较

Tab. 1 Comparison of measurable characters between hybrid grouper and its parents

项目 Item	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	清水石斑鱼 <i>E. polyphkadion</i>	杂交子代 Hybrid grouper	杂交指数 Hybrid index (HI)
全长/体长 TL/SL	1.17±0.01 ^a	1.14±0.01 ^a	1.15±0.01 ^a	66.67
体长/体高 SL/BD	2.84±0.02 ^a	2.90±0.02 ^a	3.01±0.04 ^b	283.33
体长/体宽 SL/BW	5.43±0.02 ^a	4.95±0.07 ^b	5.81±0.07 ^c	-79.17
体长/头长 SL/HL	2.73±0.04 ^a	3.14±0.02 ^b	2.54±0.03 ^c	-46.34
体长/尾柄长 SL/CPL	7.14±0.03 ^a	7.23±0.12 ^a	7.53±0.07 ^b	433.33
体长/肛前体长 SL/LBA	1.45±0.02 ^a	1.41±0.02 ^a	1.45±0.02 ^a	0
尾柄长/尾柄高 CPL/CPD	1.20±0.01 ^a	1.18±0.02 ^a	1.25±0.03 ^b	-250.00
头长/吻长 HL/SL	5.73±0.06 ^a	5.44±0.07 ^a	5.33±0.06 ^b	137.93
头长/眼径 HL/ED	7.96±0.15 ^a	5.98±0.05 ^b	7.42±0.07 ^c	27.27
头长/眼间距 HL/IW	4.79±0.02 ^a	4.50±0.05 ^b	5.26±0.05 ^c	-162.07
头长/眼后头长 HL/HLAE	1.44±0.01 ^a	1.55±0.02 ^b	1.59±0.03 ^b	136.36
平均值Mean				49.76

注: 样品数为30 ($n=30$); 数据右上不同英文字母表示显著性差异($P<0.05$), 统计学分析采用单因素方差分析和Duncan检验

Note: The number of samples is 30 ($n=30$). Different super-scripts at the top right of the values indicate significantly different ($P<0.05$), as determined by One-way ANOVA followed by the Duncan test

2.2 杂交子代与亲本外型框架比较分析

杂交子代与其亲本的外形框架呈现出一定的差异(图 3)。棕点石斑鱼头部较大, 背部稍有隆起, 背腹侧扩张明显, 后部有明显收缩, 尾部偏向矩形; 清水石斑鱼下颌至腹部呈现平滑连接, 头上部至背部也向后平滑舒展, 没有明显隆起, 躯干前后部拉伸明显, 尾部偏向梯形; 杂交子代吻前端至头背部末端呈现较长的拉伸, 背部微微隆起, 整体躯干延展距与母本接近, 偏向棕点石斑鱼。尾部性形状近父本。

2.3 杂交子代与亲本测量数据聚类分析及主成分分析

根据测量数据所计算出的杂交子代与棕点石斑鱼的欧氏距离为1.756, 与清水石斑鱼的欧氏距离为2.532, 由图 4的树状图可以看出, 杂交子代先与棕点石斑鱼聚成一支后, 两者再与清水石斑鱼聚成一支, 说明了杂交子代在形态上与母本棕点石斑鱼更为相似。

根据主成分分析结果, 提取出前4个主成分, 由表 2可以反映出32个参数对4个主成分的贡献率情

况。第一个主成分PC1贡献率为70.161%、D7—10、D9—10、D7—8、D5—6、D6—7、D7—9等载荷系数较大, 均在0.90以上, 可以得出PC1主要反映了石斑鱼臀鳍、尾鳍的位置信息, 说明杂交斑及其亲本的形态学上的差异变化主要发生在鱼体尾部。第二个主成分贡献率为12.217%, 头长/眼径, D1—3, 头长/吻长、头长/眼后头长等载荷系数较大, 均在0.60以上, 由此可见PC2主要反映了石斑鱼的头部结构数据对变异的贡献。四个主成分呈现的91.674%的累积贡献率具有代表性, 可以选择用这4个独立的主成分因子概括鱼体外形性状。使用主成分1和主成分2的相关数值绘制棕点石斑鱼、清水石斑鱼、杂交子代的主成分散布图(图 5), 结果显示, 棕点石斑鱼、清水石斑鱼及杂交子代形态特点分布各异, 形成3个不同的类群, 相互形态特点

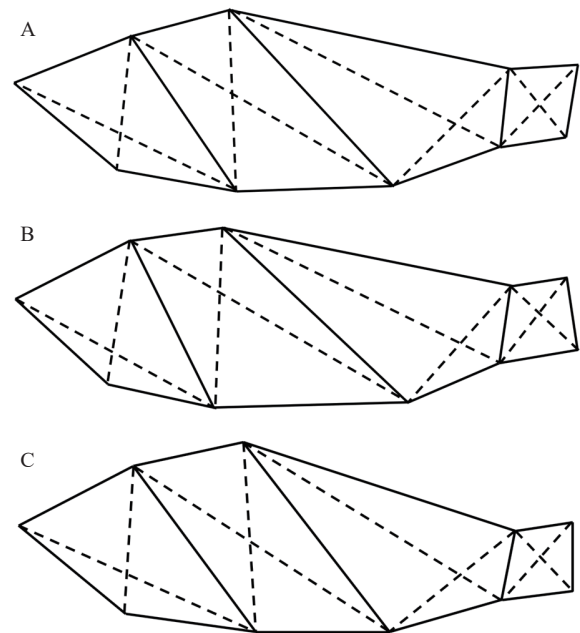


图 3 杂交子代及其亲本外形框架图

Fig. 3 Body shape truss network of Hybrid grouper and its parents

A. 棕点石斑鱼; B. 清水石斑鱼; C. 杂交子代

A. *E. fuscoguttatus*; B. *E. polyphkadion*; C. hybrid grouper

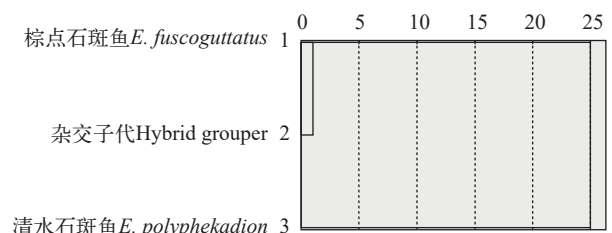


图 4 杂交斑及其亲本的聚类分析树状图

Fig. 4 Hierarchical dendrogram of hybrid grouper and its parents

不同, 杂交子代有其特有的形态特点。

2.4 微卫星分子标记的筛选

对棕点石斑鱼进行简化基因组测序, 所测得有效序列信息占原始测序数据99.70%, 过滤后的有效数据量(Clean bases)共6171561900 bp, 过滤后Q20为95.87%, Q30为89.75%, GC含量为41.04%, 测序数据可以进行后续分析。经过MISA软件筛选得到SSR位点6266个, 其中二核苷酸2751个(占比43.90%),

表 2 杂交子代及其亲本的32个性状对4个主成分的特征向量及主成分的贡献率

Tab. 2 Eigenvectors and cumulative contribution rates of four principal components from the thirty-two traits of hybrid grouper and its parents

形态比例参数 Morphological ratio parameter	主成分 Principal components			
	PC1	PC2	PC3	PC4
全长/体长TL/SL	-0.015	0.607	0.13	0.643
体长/体高SL/BD	-0.407	0.013	-0.8	-0.102
体长/体宽SL/HL	-0.763	0.33	-0.407	-0.296
体长/头长SL/HL	0.724	-0.498	0.396	-0.159
体长/尾柄长SL/CPL	-0.657	-0.297	0.392	0.227
体长/肛前体长SL/LBA	-0.252	0.118	-0.134	-0.881
尾柄长/尾柄高CPL/CPD	-0.527	-0.033	-0.546	-0.184
头长/吻长HL/SL	0.337	0.667	0.253	-0.447
头长/眼径HL/ED	-0.31	0.824	-0.407	0.039
头长/眼间距HL/IW	-0.946	0.008	-0.251	-0.008
头长/眼后头长HL/HLAE	-0.375	-0.766	-0.18	0.229
D1—2	0.965	0.131	0.175	0.054
D1—3	0.265	0.785	-0.113	0.147
D1—4	0.979	0.005	0.151	0.076
D2—3	0.925	0.325	0.141	0.072
D2—4	0.93	0.188	-0.157	0.167
D3—4	0.935	0.064	0.295	0.106
D3—5	0.946	-0.074	0.29	0.011
D3—6	0.941	0.053	0.326	0.003
D4—5	0.863	-0.027	0.389	-0.06
D4—6	0.866	-0.003	0.443	0.016
D5—6	0.952	0.095	0.266	0.083
D5—7	0.768	-0.239	0.519	0.047
D5—8	0.924	-0.11	0.353	0.027
D6—7	0.938	0.143	0.293	0.057
D6—8	0.935	0.199	0.261	0.064
D7—8	0.962	0.072	0.249	0.001
D7—9	0.911	0.264	-0.033	-0.027
D7—10	0.968	0.107	0.165	-0.021
D8—9	0.934	0.24	0.192	0.085
D8—10	0.889	0.334	0.185	0.029
D9—10	0.963	0.078	0.217	0.094
各主成分贡献率(%)	70.161	12.217	5.486	3.810

三核苷酸2380个(占比37.98%), 四核苷酸884个(占比14.11%), 五核苷酸和六核苷酸分别为206个(占比3.29%)和45个(占比0.72%)。

根据随机选取的80个SSR位点设计引物, 设计引物由广州擎科生物技术有限公司合成, 对合成的引物进行PCR扩增, 然后进行琼脂糖凝胶电泳来特异性筛选, 符合要求的PCR产物再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 部分电泳结果如图 6。每一个微卫星位点均用8个不同个体进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果可见, ae27和ac34两个微卫星位点主带明显, 每一个个体在目的区间最多只有2个等位基因, 并且同一引物不同DNA模板扩增的条带片段有3个以上的等位基因, 可以保留作进一步筛选。

2.5 群体扩增及毛细管电泳

根据毛细管电泳结果, 最终筛选出7个特异性

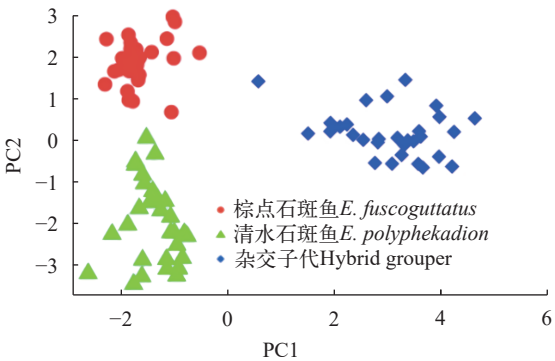


图 5 杂交子代及其亲本主成分1和主成分2的散点图

Fig. 5 Scatter diagram for PC1 and PC2 of hybrid grouper and its parents

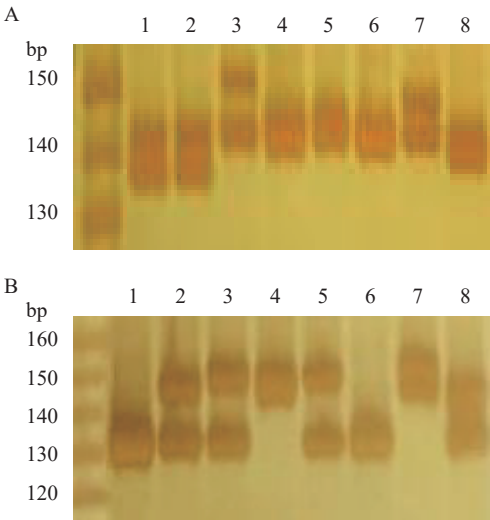


图 6 微卫星位点ae27多态性筛选结果(A)和微卫星位点ac34多态性筛选结果(B)

Fig. 6 Results of microsatellite loci ae27 diversity screening (A) and loci ac34 diversity screening (B)

强且在棕点石斑鱼、清水石斑鱼和杂交子代3个群体中均有较高多态性的微卫星分子位点(表 3), 对每个群体的30个个体分别进行毛细管电泳STR分型, 根据峰值得到微卫星分子标记准确的PCR产物长度, 进行后续操作。

由表 4可知, 除引物ab42外, 其他6对引物均可在部分群体中扩增出特异性条带, 如引物对ad30, 在棕点石斑鱼可以扩增出长度为145和151 bp的特异性条带, 在杂交子代中可以扩增出长度为154 bp的特异性条带, 由此可以区分3个群体。

2.6 等位基因数、基因杂合度和多态信息含量分析

由表 5可见, 在3种石斑鱼的等位基因数平均值中, 最大的是棕点石斑鱼, 数值为10.000, 最小的是杂交子代, 数值为8.000。杂交子代的观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)均为3种石斑鱼中最大, 数值分别为0.891和0.768, 最小的均为清水石斑鱼。

Botstein提出多态信息含量(PIC)大于0.5时为高度多态位点。清水石斑鱼的ad19位点PIC最高, 数值为0.869; 杂交子代ac34位点的PIC最低, 数值为0.441。3个群体的平均PIC为0.674, 为高度多态位点。具体观察3种鱼每个群体, 可以发现, 对于棕点石斑鱼而言, 其平均PIC为0.699, 7个位点均为高度多态性位点。对于清水石斑鱼而言, 平均PIC为

0.606, 其中ae26、ad19、ad25和ae27为高度多态性位点。对于杂交子代而言, 平均PIC为0.717, 其中ad30、ae26、ab42、ad19、ad25和ae27为高度多态性位点。

综上所述, 本实验选取的7个微卫星位点ad30、ae26、ab42、ad19、ad25、ae27和ac34多态性较高, 可用于遗传结构和遗传多样性分析。

3 讨论

3.1 杂交子代及其亲本外部形态结构数据的测定与统计分析

在不同鱼类进行杂交时, 杂交性状通常处于两亲本的中间状况^[28]。本文为了判断杂交子代的育种前景, 从外部形态结构方面进行了分析。通过测定杂交子代和亲本的外部形态可量数据, 并进行相关分析, 从而呈现三者之间的异同。

在可量性状方面, 通过计算出全长/体长(TL/SL)、体长/体高(SL/BD)等11个可量性状比值, 得出杂交子代的平均杂交指数(HI)为49.76, 接近于中心数值。其中, 杂交子代与棕点石斑鱼在全长/体长(TL/SL)、体长/肛前体长(SL/LBA)上无显著性差异, 与父本清水石斑鱼在头长/眼后头长(HL/HLAE)上也无显著性差异, 可以推测杂交子代在继承双亲性状时具有一定的选择性。在外形框架方面测定了D1—2、D1—3等21个框架性状参数, 在杂交子代及亲本外形框架的比较中, 杂交子代头部及躯干部位偏向棕点石斑鱼, 尾部偏向于清水石斑鱼。

在外部形态特征分析时, 常进行聚类分析及主成分分析对杂交子代与亲本之间的差异和联系进行探究。聚类分析是利用多个参数对不同群体进行分类, 比较对象之间的相似程度及关联, 该方法已广泛运用于水生生物的差异分析领域。王成辉^[29]分析了4种中国红鲤(*Cyprinus carpio* L.)的38个表型性状, 发现荷包红鲤(*C. c. var. wuyuanensis*)与其他3种红鲤的形态差异十分显著; 马爱军等^[30]利用聚类分析研究了四个国家的大菱鲂形态特征, 探究不同群体间的外部形态结构差异大小。主成分分析将相互独立的因子作为主成分去鉴定分析鱼类的外观形态性状, 并得出不同主成分上载荷较大的相关参数^[31]。宋文等^[32]在4种鲂属鱼类形态结构的主成分分析中得到的前三个主成分可以将4个群体分开。张红艳^[33]对以框架测量法对近海的3个地方的中国鳊(*Sillago sinica*)群体测定了18个框架数据, 并基于多变量分析法对测量数据进行了统计分析, 进而将3个群体区分开。本实验利用11个可量性状比值和21个框架性状参数总计32个数值对棕点石

表 3 七个SSR位点的引物序列及退火温度等相关信息

Tab. 3 Primer sequences and annealing temperature of seven SSRs loci

位点 Loci	引物序列 Primer sequence (5'—3')	荧光 Dye	重复 片段 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (°C)
ad30	TTGAAGATGCTTGTTCT GTATTGA CTGCTTGCAACTAAC ATACAGCA	HEX	(TGA) ₉	60
ae26	AGTTAACAGCAGCAC TTTGGTGT CAGACATAGCAGTGT TTTTGCAG	HEX	(GCA) ₉	60
ab42	CTTTGTCATTGTTGTT GGAGTGA GAAACACAAACCCAG TGAACC	ROX	(GAG) ₁₀	60
ad19	TTGAACTGGTGATT TACACCCT TTTTATGGACCAGAA TAACACG	HEX	(ACA) ₁₀	60
ad25	GTACTTTCGGCCAAT AATGACAC TGTTTTGCTGCTCTTA TGTTGTT	FAM	(TAA) ₉	60
ae27	TTCGTTTCATCTATAG GTTTGGG TATGACCCTGGAGGA GCTATACA	HEX	(CTC) ₉	59
ac34	TGGAGATTAGAAAAT AAAACCAACA GAGTCAGATGTGACG TGTGAAGA	FAM	(ATG) ₁₁	60

斑鱼、清水石斑鱼和杂交子代进行聚类分析及主成分分析。聚类分析结果显示, 杂交子代先与母本聚合, 两者再与父本聚合, 说明杂交子代在形态特征方面偏向于棕点石斑鱼。主成分分析所得到的前4个主成分的贡献率分别为70.161%、12.217%、5.486%和3.810%, 其中PC1和PC2的散点图显示出3种石斑鱼构成不同类群, 说明三者有着各自的形

态特点, 杂交子代也有其独特外形特征。

3.2 杂交子代及其亲本SSR分子标记筛选及遗传特征分析

以往的短片段文库法SSR分子标记开发, 需要先制备基因组DNA片段, 筛选较小DNA片段, 连接载体并转化大肠杆菌, 构建基因组文库, 整体较为复杂^[34]。而本文在SSR位点的获得上采用ddRAD-

表 4 棕点石斑鱼、清水石斑鱼和杂交子代7个SSR位点及等位基因频率统计

Tab. 4 Allele frequencies of seven SSRs loci in *E. fuscoguttatus*, *E. polyphkadion* and the hybrid grouper

位点Loci/ 等位基因 Allele	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	清水石斑鱼 <i>E. polyphkadion</i>	杂交子代 The hybrid grouper	位点Loci/ 等位基因 Allele	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	清水石斑鱼 <i>E. polyphkadion</i>	杂交子代 The hybrid grouper
ad30				ad19			
136		0.4500	0.3333	142		0.0333	
139	0.0333	0.5000	0.1667	148		0.3000	
142	0.3667		0.1667	151	0.0167	0.2334	
145	0.0333			154	0.1000	0.1666	0.0333
148	0.4833	0.0500	0.3000	157	0.1333	0.0667	0.1000
151	0.0833			160	0.3167	0.0333	0.2833
154			0.0333	163	0.1667		0.0667
ae26				166	0.0667	0.0333	
141		0.0833	0.0167	169	0.0333	0.0834	0.2167
144		0.0167	0.0334	172	0.1000	0.0500	0.0500
147		0.0667		175	0.0333		
150	0.0833	0.1833		178	0.0167		
153	0.2667	0.0667	0.1500	181	0.0167		0.2500
156	0.4167	0.2500	0.1000	ad25			
159	0.1000	0.1833	0.0500	147	0.0167		
162	0.0500	0.0500	0.0167	156	0.0167	0.0667	0.2500
165	0.0167	0.0500	0.4333	159	0.1500	0.0167	0.1000
168	0.0501	0.0500		162	0.3833	0.0500	0.1000
171			0.0500	165	0.3000	0.0500	0.2500
177	0.0167			168	0.0833	0.0667	0.1000
ae27				171		0.7333	0.2000
144	0.1501	0.9167	0.5000	174	0.0167	0.0167	
147	0.1500		0.0500	177	0.0333		
150	0.6167	0.0667	0.3667	ab42			
153	0.0500		0.0834	130	0.0333	0.0833	0.0666
156	0.0167	0.0167		133	0.0833	0.7167	0.4500
159	0.0167			136		0.1167	0.0333
ac34				139	0.0833	0.0333	0.2666
131	0.3667	0.0333	0.0500	142	0.4000	0.0167	0.1667
134	0.0333			145	0.3833	0.0167	0.0167
140	0.0667			148	0.0167	0.0167	
143	0.0500	0.2833					
146	0.0167	0.6000	0.5000				
149	0.3000	0.0333	0.4500				
152	0.1500	0.0500					
155	0.0167						

表 5 棕点石斑鱼、清水石斑鱼和杂交子代的遗传变异参数

Tab. 5 Parameters of genetic variation of *E. fuscoguttatus*, *E. polyphkadion* and the hybrid grouper

位点 Loci	参数 Arguments	棕点石斑鱼 <i>E. fuscoguttatus</i>	清水石斑鱼 <i>E. polyphkadion</i>	杂交子代 The hybrid grouper
ad30	<i>A</i>	6.000	4.000	6.000
	H_o	0.733	0.033	1.000
	H_e	0.664	0.555	0.773
	PIC	0.591	0.444	0.721
ae26	<i>A</i>	13.000	12.000	11.000
	H_o	0.800	0.633	0.800
	H_e	0.824	0.893	0.761
	PIC	0.787	0.866	0.722
ab42	<i>A</i>	7.000	8.000	10.000
	H_o	0.500	0.333	0.500
	H_e	0.702	0.475	0.824
	PIC	0.638	0.447	0.785
ad19	<i>A</i>	15.000	13.000	8.000
	H_o	0.867	0.967	0.967
	H_e	0.860	0.895	0.823
	PIC	0.832	0.869	0.784
ad25	<i>A</i>	9.000	10.000	10.000
	H_o	0.867	0.400	1.000
	H_e	0.754	0.636	0.859
	PIC	0.703	0.601	0.827
ae27	<i>A</i>	12.000	5.000	8.000
	H_o	0.600	0.100	0.967
	H_e	0.672	0.600	0.783
	PIC	0.637	0.523	0.736
ac34	<i>A</i>	8.000	5.000	3.000
	H_o	0.800	0.600	1.000
	H_e	0.757	0.564	0.554
	PIC	0.706	0.493	0.441
Mean	<i>A</i>	10.000	8.143	8.000
	H_o	0.738	0.438	0.891
	H_e	0.748	0.660	0.768
	PIC	0.699	0.606	0.717

seq技术是随着高通量测序的出现应运而生的一种技术。Baird等^[35]第一次报道了ddRAD-seq技术后,此技术被广泛应用到了多态性分子标记的开发中。由酶切产生的RAD-tag进行高通量测序,覆盖基因组范围较广且准确度高,能够开发大量的SNP和SSR标记,较于传统的SSR标记开发具有成本低、准确率高、不受参考基因组序列限制等优点^[36],因此在鱼类开发SSR标记中也被大量运用。本实验所得到的7个SSR标记,在扩增中发现其中6对引物不仅具有较高的多态性,还可以在部分群

体中扩增出特异性条带,可以用于区分3个群体。

基因杂合度(H)与群体遗传多样性密切相关,是评估每个群体在不同位点上的遗传变异重要指标之一,其数值越高则说明变异越大。在本实验中,杂交子代的观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)与遗传多样性均最高。由此可见,杂交育种得出的新品种石斑鱼在遗传多样性得到了丰富和提高。多态信息含量(PIC)与一个群体中杂合个体所占有的比例成正比。杂合个体越多,遗传多样性便越丰富,有效群体较大,种群结构稳定。本次实验中杂交子代的PIC为0.717,高于棕点石斑鱼和清水石斑鱼,表明其在遗传信息的多样性方面有着一定的提高。根据本实验结果可以说明,对于双亲,棕点石斑鱼和清水石斑鱼的遗传多样性较高,有利于种质资源的保存,但在选育上,双亲仍有待进一步选育后再进行杂交育种得到性状更为优良和稳定的子代。

参考文献:

- [1] Baranwal V K, Mikkilineni V, Zehr U B, *et al.* Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(18): 6309-6314.
- [2] Nie C, Almeida P, Jia Y, *et al.* Genome-wide single-nucleotide polymorphism data unveil admixture of Chinese indigenous chicken breeds with commercial breeds [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, **11**(7): 1847-1856.
- [3] Buckley F, Lopez-Villalobos N, Heins B J. Crossbreeding: implications for dairy cow fertility and survival [J]. *Animal*, 2014(8): 122-133.
- [4] Huang X, Yang S, Gong J, *et al.* Genomic architecture of heterosis for yield traits in rice [J]. *Nature*, 2016, **537**(7622): 629-633.
- [5] Bachem C W B, van Eck H J, de Vries M E. Understanding genetic load in potato for hybrid diploid breeding [J]. *Molecular Plant*, 2019, **12**(7): 896-898.
- [6] Zheng G D, Zhang Q Q, Li F G, *et al.* Genetic characteristics and growth performance of different *Megalobrama amblycephala* (♀) × *Erythroculter ilishaeformis* (♂) hybrids [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, **22**(3): 402-409. [郑国栋, 张倩倩, 李福贵, 等. 团头鲂(♀) × 翘嘴鲌(♂) 杂交后代的遗传特征及生长差异 [J]. 中国水产科学, 2015, **22**(3): 402-409.]
- [7] Wang S, Tang C C, Tao M, *et al.* Establishment and application of distant hybridization breeding technology for fish [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2018, **48**(12): 1310-1329. [王石, 汤陈宸, 陶敏, 等. 鱼类远缘杂交育种技术的建立及应用 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, **48**(12): 1310-1329.]
- [8] Strauss R E, Bookstein F L. The Truss: Body Form Reconstructions in Morphometrics [J]. *Systematic Zoo-*

- logy, 1982, **31**(2): 113.
- [9] Ma L Y, Zhong J, Wang W M. Comparison of morphological characteristics between *Paramisgurnus dabryanus* × *Misgurnus anguillicaudatus* hybrids and their parents [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, **38**(5): 35-42. [马来艳, 仲嘉, 王卫民. 泥鳅和大鳞副泥鳅杂交子代与其亲本形态特征比较 [J]. 华中农业大学学报, 2019, **38**(5): 35-42.]
- [10] Wang Y, Zhang Y, Zhang H F, *et al.* Comparison of morphology between two kinds of hybrid groupers and their parents [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(06): 778-785. [王燕, 张勇, 张海发, 等. 两种杂交石斑鱼及其亲本的形态差异分析 [J]. 水产学报, 2014, **38**(06): 778-785.]
- [11] Ran G, Dai Y, Yue X. Morphological characteristics and differences analysis of *Schizothorax kozlovi* and *Schizothorax lissolabiatu*s in karst area [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, **39**(5): 490-494. [冉光鑫, 代应贵, 岳晓炯. 喀斯特地区四川裂腹鱼和光唇裂腹鱼的外形特征及差异性分析 [J]. 江苏农业科学, 2011, **39**(5): 490-494.]
- [12] Yu D, Gu X, Zhang S, *et al.* Molecular basis of heterosis and related breeding strategies reveal its importance in vegetable breeding [J]. *Horticulture Research*, 2021, **8**(1): 120.
- [13] Acquaaah G. Principles of Plant Genetics and Breeding [M]. Wiley Online Books, 2012: 3-21.
- [14] Grover A, Sharma P C. Development and use of molecular markers: past and present [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, **36**(2): 290-302.
- [15] Su Y, Mao J, Ma Z, *et al.* Genetic diversity of different apple varieties was analyzed based on SSR technology [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(22): 7450-7457.
- [16] Dubina E, Kostylev P, Ruban M, *et al.* Rice breeding in Russia using genetic markers [J]. *Plants*, 2020, **9**(11): 1580.
- [17] Hou L, Chen X, Wang M, *et al.* Mapping a large number of QTL for durable resistance to stripe rust in winter wheat druchamp using SSR and SNP markers [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(5): e126794.
- [18] Xu S X, Liu J, Liu G S. The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize [J]. *Hereditas*, 2005, **141**(3): 207-215.
- [19] Coughlan J, McCarthy E, McGregor D, *et al.* Four polymorphic microsatellites in turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Animal Genetics*, 1996, **27**(6): 441.
- [20] Xu Z K, Primavera J H, de la Pena L D, *et al.* Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the philippines using microsatellites [J]. *Aquaculture*, 2001, **199**(1/2): 13-40.
- [21] Wang M, Bao Z, Zhan A, *et al.* Eighteen polymorphic microsatellite markers in the Xishi abalone, *Haliotis gigantea* [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2011, **3**(4): 669-671.
- [22] Yu Z, Guo X. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *The Biological Bulletin*, 2003, **204**(3): 327-338.
- [23] Lundrigan T A, Reist J D, Ferguson M M. Microsatellite genetic variation within and among arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America [J]. *Aquaculture*, 2005, **244**(1/2/3/4): 63-75.
- [24] Chistiakov D A, Hellemans B, Tsigenopoulos C S, *et al.* Development and linkage relationships for new microsatellite markers of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Animal Genetics*, 2004, **35**(1): 53-57.
- [25] Qu M, Tang W, Liu Q, *et al.* Genetic diversity within grouper species and a method for interspecific hybrid identification using DNA barcoding and RYR3 marker [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018(121): 46-51.
- [26] Zhang Z C, Hou X. Strategies for development of SSR molecular markers [J]. *Hereditas*, 2004(5), 26: 763-768. [张增翠, 侯喜林. SSR分子标记开发策略及评价 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 763-768.]
- [27] 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): 1596-1599.
- [28] Li Y L, Chen C, Zhai J M, *et al.* Fish hybridization and its application in grouper [J]. *Marine Fisheries*, 2012, **34**(1): 102-109. [李炎璐, 陈超, 翟介明, 等. 鱼类杂交育种技术及其在石斑鱼类中的应用 [J]. 海洋渔业, 2012, **34**(1): 102-109.]
- [29] Wang C H. Study on genetic diversity of red common carps in China [D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2002: 41-53. [王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2002: 41-53.]
- [30] Ma A J, Wang X A, Lei J L, *et al.* Statistic morphology difference among four turbot (*Scophthalmus maximus*) populations [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008(1): 24-29. [马爱军, 王新安, 雷霖霖, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 四个不同地理群体数量形态特征比较 [J]. 海洋与湖沼, 2008(1): 24-29.]
- [31] Cadrin S X. Advances in morphometric identification of fishery stocks [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2000, **10**(1): 91-112.
- [32] Song W, Wang Y Z, Zhu D M, *et al.* Morphological variations among the genus *Megalobrama* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, **43**(3): 21-27. [宋文, 王艺舟, 祝东梅, 等. 鲴属鱼类形态差异分析 [J]. 淡水渔业, 2013, **43**(3): 21-27.]
- [33] Zhang H Y. Study on morphology and genetics of *Sillago sinica* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 33-37. [张红艳. 中国鳊 (*Sillago sinica*) 群体形态学及遗传学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 33-37.]

- [34] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, **70**(12): 3321-3323.
- [35] Nathan A B, Paul D E, Tressa S A, *et al.* Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers [J]. *PLoS One*, 2008, **3**(10): e3376.
- [36] Wang Y K, Hu Y, Zhang T Z. Current status and perspective of RAD-seq in genomic research [J]. *Hereditas*, 2014, **36**(1): 41-49. [王洋坤, 胡艳, 张天真. RAD-seq技术在基因组研究中的现状及展望 [J]. 遗传, 2014, **36**(1): 41-49.]

COMPARISON OF PHENOTYPES AND GENETIC CHARACTERISTICS BETWEEN HYBRIDS AND PARENTAL GENERATION OF *EPINEPHELUS FUSCOGUTTATUS* (♀) × *EPINEPHELUS POLYPHEKADION* (♂)

WANG Tong¹, FANG Ming-Yu¹, YANG Yang¹, SONG Le-Ling¹, CAI Chun-You²,
MENG Zi-Ning^{1,3} and LIU Xiao-Chun^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Biocontrol and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Hainan Chenhai Aquatic Co., Ltd., Sanya 572000, China; 3. Southern Ocean Science and Engineering of Guangdong Province Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519080, China)

Abstract: In both plants and animals, distant hybridization often gives rise to offspring exhibiting hybrid vigor, and this approach has shown significant potential in aquaculture. Grouper, an economically important marine species, has experienced rapid industry development. To cultivate new grouper varieties of high economic value, a crossbreeding experiment involving *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) and *Epinephelus polyphekadion* (♂) was carried out, resulting in the successful production of hybrid offspring. External morphological analysis is the most straightforward indicator, influenced by genetics and the environment, playing a pivotal role in subsequent fish breeding. Investigating population morphological differences holds practical significance for understanding population structure composition and environmental effects, as well as providing guidance for fisheries resource management. Due to the similar physical appearance of *E. fuscoguttatus* and *E. polyphekadion*, distinguishing the hybrid grouper from its parents species proves to be challenging. In order to explore both phenotypic and genetic differences between parents and the hybrid, we utilized the external morphological and frame parameters for comparative analysis. In the exploration of external morphological structures, the results of cluster analysis and principal component analysis both indicate that the quantitative traits and external framework of the hybrid offspring tend to resemble those of the maternal *E. fuscoguttatus*. During hybridization processes, especially in cases of distant hybridization, each parent contributes one gamete, and these gametes undergo meiosis during formation. Allelic genes on homologous chromosomes segregate from each other, while non-allelic genes on non-homologous chromosomes freely recombine. Consequently, genetic loci controlling dominant traits often display incomplete dominance during the hybridization process, giving rise to new genotypes that combine and express dominant traits in the hybrid offspring. Distant hybridization frequently results in offspring with increased genetic diversity, which can establish the foundation for breeding and genetic improvement in both animals and plants when evaluated. Therefore, we used simple sequence repeat (SSR) analysis to assess the genetic characteristics of both parental and hybrid offspring. A total of 6266 SSRs were identified via ddRAD-seq for *E. fuscoguttatus*, among them, seven pairs of SSRs were screened, which could be stably amplified in parental and hybrid population and had high genetic diversity. The observed heterozygosity (*H*_o), the expected heterozygosity (*H*_e) and the polymorphic information content (PIC) of the seven SSRs in the hybrid population were 0.891, 0.768 and 0.717, respectively. These values were notably higher than those observed within their respective parental populations, indicating that the hybrid offspring exhibit an enhanced genetic diversity in terms of genetic information. The research findings can provide methods for distinguishing between *E. fuscoguttatus* and *E. polyphekadion* and their hybrid offspring, as well as offering a theoretical foundation for the cultivation of hybrid groupers.

Key words: Crossbreeding; Phenotype; Microsatellite marker; *Epinephelus fuscoguttatus*; *Epinephelus polyphekadion*