

應用微衛星基因座探討澎湖海域產野生與人工繁殖豹鱸之遺傳歧異度與分化

陳高松^{1,2*} · 蕭聖代³ · 溫國彰⁴ · 謝恆毅⁵ · 顏綵葭¹ · 王永松² · 陳昭倫⁶

¹ 行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

² 國立臺灣大學漁業科學研究所

³ 行政院農業委員會水產試驗所海洋漁業組

⁴ 東海大學生命科學系

⁵ 行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

⁶ 中央研究院生物多樣性研究中心

摘要

豹鱸 (*Plectropomus leopardus*) 為高經濟價值的石斑魚種，行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心已建立其人工繁殖技術。為評估本所種原庫中豹鱸種魚與 F1 人工繁殖個體的遺傳歧異度現況，本研究選擇微衛星基因座作為遺傳標誌進行分析。針對本所種原庫種魚 (n = 60)、F1 人工繁殖個體 (n = 34) 及澎湖海域之野生個體 (n = 33)，以 8 組高遺傳歧異性的微衛星基因座進行豹鱸遺傳歧異度及族群遺傳結構分析。結果顯示對偶基因數介於 3 - 20 個，異型合子觀察值 (Ho) 介於 0.18 - 0.81，異型合子期望值 (He) 介於 0.21 - 0.88；族群遺傳分化指數 (F_{st}) 介於 0.021 - 0.087。人工繁殖個體的遺傳歧異度相較於野生或種魚群無明顯的減少。然而，不管是野生個體、種原庫種魚或 F1 人工繁殖個體間，兩兩族群間皆具有顯著的遺傳差異 ($p < 0.05$)。遺傳結構分析結果顯示種原庫種魚、F1 人工繁殖及野生族群已呈現明顯的遺傳結構 (k = 3 時具有最高的 likelihood 值)。據此我們可以推論不同族群間可能具有遺傳分化狀況，且蓄養的種原庫種魚與 F1 人工繁殖個體亦可能產生人為選汰的效應。本研究的結果將有助於豹鱸種魚群的管理與野生族群的保育。

關鍵詞：豹鱸、微衛星基因座、遺傳歧異度、族群遺傳結構

前言

石斑魚廣泛的分布於全世界熱帶至溫帶海域，為珊瑚礁生態系是否健全的重要指標生物之一，更是重要的沿岸漁業資源 (Heemstra and Randall, 1993)，其漁獲量雖然只佔全世界海洋漁業總漁獲量的少數，但在許多熱帶與亞熱帶國家的沿岸漁業中是非常重要的漁獲對象，例如菲律賓、印尼、馬來西亞與馬爾地夫，每年均出口大量的石斑魚至全球的華人市場，其中又以豹鱸 (coral trout, *Plectropomus leopardus*) 等刺鰓屬

(*Plectropomus*) 種類為大宗 (Richard *et al.*, 2006; Sattar *et al.*, 2012; Khasanah *et al.*, 2020)。由於石斑魚的高經濟價值與日益增加的市場需求，導致石斑魚漁業資源遭受極大的採捕壓力。石斑魚因具有較長的生活史、產卵群的聚集及先雌，後雄的雌雄同體等特性，導致石斑魚很容易過度捕撈且難以恢復原有資源量 (Sadovy *et al.*, 2005, 2013)。

豹鱸又稱為花斑刺鰓、七星斑或東星斑，為中大型體型且具高市場經濟價值的石斑魚。在分類上屬於鱸形目 (Perciformes)、石斑魚科 (Epinephelidae)、刺鰓屬 (Craig *et al.*, 2011)。生殖腺發育為先雌後雄模式 (monandric protogyny) (Ferreira, 1995)。卵屬浮游性並具有約 30 天的浮游仔稚魚期 (Heemstra and Randall, 1993)。在仔稚魚發育至底棲階段時，喜好棲息於砂礁交界的環境，

*通訊作者 / 202 基隆市中正區和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101 ext. 2519; Fax: (02) 2462-4627; E-mail: kschen@mail.tfrin.gov.tw

別於成魚偏好桌狀軸孔珊瑚的環境 (Wen *et al.*, 2013)。在固定繁殖季節，成熟個體會聚集至特定產卵場，形成個體數目約百餘尾的生殖產卵群 (Samoilys and Squire, 1994; Zeller, 1998)。此繁殖特性使得漁撈行為可以大量捕撈繁殖中的成熟個體，導致豹鱸面臨極大漁獲壓力，澳洲與菲律賓等地均已漁獲量下降與漁獲體型變小的趨勢發生 (Williamson *et al.*, 2004; Mclean *et al.*, 2011)。

目前市場上豹鱸的漁獲供應多仰賴自天然海域捕撈，由於氣候變遷、棲地破壞及過度漁撈，以及缺乏有效的漁業資源保育與管理等因素，致該魚種滅絕風險漸增，國際自然保護聯盟紅皮書 (IUCN Red List) 已將該魚種評定為 Least Concern (LC) 等級 (Choat and Samoilys, 2018)。爰此，中國、日本、馬來西亞、泰國及我國等許多國家相繼投入豹鱸人工繁養殖技術的研發與建立，盼能減緩野生族群的採捕壓力及提供廣大的市場需求。行政院農業委員會水產試驗所 (以下簡稱本所) 也於 2014 年成功建立該魚種的完全養殖技術。

許多繁養殖魚類常因有限的種魚群產生的先驅者效應 (founder effect)、基因漂變 (random genetic drift)，以及近親交配 (inbreeding)，導致子代呈現低遺傳歧異度的現象，進而發生成長狀況不佳、抗病能力或環境耐受力變差的狀況 (Waples *et al.*, 1990; Taniguchi, 2003)。因此，已有許多研究聚焦於種魚與子代個體遺傳歧異度的監測分析，並與野生族群進行比較 (Coughlan *et al.*, 1998; Norris *et al.*, 1999; Perez-Enriquez *et al.*, 1999; Sekino *et al.*, 2002; Lundrigan *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Glover *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2020; Polovina *et al.*, 2020)。惟常見的養殖石斑魚種類中，應用微衛星基因座 (microsatellite locus) 作為遺傳標誌進行野生與圈養族群的遺傳歧異度比較研究者，則僅有點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 與龍膽石斑 (*E. lanceolatus*) (Wang *et al.*, 2011, 2016)。豹鱸雖已有利用粒線體基因或微衛星基因座等遺傳標誌針對野外族群遺傳歧異度、族群遺傳結構進行探討 (Zhu and Yue, 2008; Ding *et al.*, 2009; van Herwerden *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Harrision *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018)，但尚無針對野生、圈養與人工繁殖族群之

遺傳歧異度比較研究。

微衛星基因座因具有：1. 共顯性遺傳；2. 符合中性選汰；3. 多型性高及 4. 基因突變率高等特性，相較於粒線體基因較適合應用探討於長時間的生物地理事件，微衛星基因座對於數個世代內 (短時間) 族群遺傳結構的變化有較高的解析能力 (Herlberg, 2007)。目前已被廣泛應用於探討石斑魚的遺傳歧異度與族群遺傳結構 (Rhodes *et al.*, 2003; Zatzoff *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Antoro *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Schunter *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Beldade *et al.*, 2014)。

目前臺灣對於豹鱸的研究仍相當缺乏，僅有少數的生態分佈調查報告顯示北部海域從三貂角到西部海域的澎湖均可發現豹鱸蹤跡，又在澎湖海域有較豐富的豹鱸族群。利用粒線體控制區基因與微衛星基因座序列的差異，推論豹鱸在其整個印度西太平洋的分佈範圍內可能 6 至 9 個遺傳分化明顯的系群，推論不同群之間在生態尺度上幾乎沒有基因交流 (gene flow)，當某一地區之族群滅絕後恐難由其他地區的族群入添補充。臺灣與菲律賓海域的族群已有相當程度的遺傳分化，但相對與宿霧海域的族群遺傳組成較為相似，與巴拉望海域的族群則較不相似 (van Herwerden, 2009; Ma *et al.*, 2018)。本所已建立的豹鱸完全養殖技術，協助產業開發新興石斑養殖物種與增裕海洋資源，惟對於種原庫內種魚與澎湖野生族群的遺傳歧異度的了解仍有限。爰此，本研究針對：1. 適用於澎湖海域豹鱸之微衛星基因座的篩選；2. 澎湖海域野生族群與種原庫種魚及 F1 人工繁殖個體遺傳歧異度分析，以及 3. 同族群的遺傳結構組成等進行探討，藉以評估遺傳歧異度變動的模式與程度，並推論可能的原因。

材料與方法

一、樣本採集與實驗前處理

(一) 澎湖海域野生豹鱸 (PHW) 採集

透過休閒釣客、標本漁戶、潛水店家、自行以水肺潛水或於在地魚市場購買等方式蒐集，攜回實驗室後置於 -20°C 冷凍庫冰存。

Table 1 Characteristics of 8 microsatellite loci for *Plectropomus leopardus*

NO.	Loci ID	Label	Repeat motif	Sequence	T _m (°C)	Prod size	N _a	H-W test (p value)	Accession number
P2	PL3007	VIC	(AC)22	ATTGATCACTCAGCCCCTCTC CTCAGCAGCTATTGGATACATT	61	213-245	11	0.24	HM807488.1
P6	PL3066	VIC	(CT)11	CACGATGGTCTAAATCCTGTCC CCTGTAACCCAAGACACAAAAC	65	215-242	4	0.96	HM807495.1
P7	PL68	NED	(AC)5...(TG)10	TGACCACAAACCAACAAC ATTTCCAAACCTCCTTAC	58	349-430	15	0.19	KC602389
P8	PL58	PET	(TG)9TCCA(TG)7TT(TG)5	AAGCCGCACGATGTGGAAAC CAGATGGAGAAGAAGCAGGAA	59	203-270	11	0.47	KC602387
P9	PL1473	FAM	(TC)6(CT)6(CA)6...(CA)5	CTGAACGGATAAGCTGTGGC CTGTGGGTTTGGATGGAGAT	65	170-215	3	0.41	KC602382
P11	PL11	NED	(TC)6(TG)3	CACTCATGCTGTCCCTTTTCTC TGCGAGGACACAGAGCAAGAA	57	146-163	4	0.03*	GU724997
P12	PL09	PET	(TG)16T(GTGC)4	CCACAAACCTGCTGGTCATAT CAATCACCTGGTCCGAAGTCT	55	105-149	13	0.09	GU724995
P14	PLL12-Ding	VIC	(AC)19	CTTGATGACTCGGGCTCCTTTC GTGTTTGGCAGGACCTTGAGTG	50	242-302	13	0.48	FJ548650

(二) 種原庫豹鱸種魚樣本 (PHB) 採集

配合本所澎湖海洋生物研究中心進行豹鱸種魚檢查工作時，採集尾鰭鰭膜組織約 1×0.5 cm，即刻保存於 95% 酒精中，再攜回至實驗室進行 DNA 萃取供後續實驗分析。該批種魚均為採集自澎湖海域個體。

(三) 人工繁殖個體樣本 (PHF1) 採集

該批樣本為本所澎湖海洋生物研究中心於 103 年度所繁殖之 F1 個體，採集當下乃飼養於該中心室內 FRP 水槽，隨機採集 34 尾個體全魚以冷凍方式攜回實驗室進行後續實驗。

實驗前處理，首先建置上述每尾豹鱸之編 (voucher number)，測量基礎形質與體色，採集肌肉 (約 0.5×0.5 cm)、生殖腺、胃及耳石等樣本。

二、萃取 genomic DNA

取約 5 - 10 mg 的肌肉組織置於 1.5 ml 離心管中，待酒精揮發後，使用 PUREGENETM DNA Purification Kit (Gentra systems Co., Nottingham, UK) 萃取基因組 DNA，存放於 -20°C 冰箱中備用。

三、微衛星基因座篩選與分析

根據 Zhu *et al.* (2005)、Ding *et al.* (2009)、Zhang *et al.* (2010)、Van Herwerden *et al.* (2000)、Liu *et al.* (2013) 及 Harrison *et al.* (2014) 等研究所發表之 79 組豹鱸或刺鯧屬微衛星基因座引子進行測試 (Table 1)。

將成功獲得 PCR 產物的 18 組引子，依據 PCR 產物之預測片段長度進行分組，分別利用 FAM、VIC、NED 及 PET 等 4 種螢光染劑合成螢光引子 (Table 1)。利用螢光引子毛細電泳分析技術 (capillary electrophoresis with fluorescent-labeled technique) 進行所有樣本之微衛星基因座片段長度判讀及分析。

四、遺傳多樣性與族群遺傳結構分析

利用 Genepop 4.0 (Raymond and Rousset, 1995) 及 FSTAT version 2.3.9.2 (Goudet, 2001) 軟體檢測每個基因座是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)、連鎖不平衡檢定 (linkage disequilibrium)、微衛星多型性指數 (polymorphism information content; PIC) >0.5 表示具有高多型性，

Table 2 Polymorphism information content (PIC) of microsatellite loci of *Plectropomus leopardus* for all sample sites

Population	Locus number							
	P2	P6	P7	P8	P9	P11	P12	P14
All populations	0.82	0.55	0.84	0.87	0.36	0.2	0.83	0.75
Wild population (PHW)	0.78	0.46	0.87	0.76	0.39	0.25	0.77	0.79
Broodstock (PHB)	0.83	0.56	0.84	0.75	0.35	0.03	0.75	0.76
Offspring (PHF1)	0.73	0.57	0.75	0.73	0.32	0.31	0.69	0.65

0.5 > PIC > 0.25 表示具有中度的多型性，PIC < 0.25 表示具有低度多型性 (Botstein *et al.*, 1980)。利用統計軟體 Arlequin Version 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 及 GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008) 估算計算族群的異型合子的觀察值 (H_o) 和期望值 (H_e) 及對偶基因數 (number of alleles) (A)；族群間的遺傳分化指數 (F_{st}) 係根據 $F_{st} = 1/(1+4Nm)$ 的公式，估計遺傳分化程度，其中 N 表示族群中有效族群量， m 表示個體遷徙速率。當 F_{st} 值愈高，顯示遺傳分化程度愈大 (Wright, 1965, 1978)；應用 STRUCTURE 軟體進行 bayesian-clustering assignment test，從個體層面上分析所有樣本之遺傳結構組成 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003)，並依照遺傳上的差異進行模擬分群，推估可能之分群並以不同顏色代表不同的遺傳組成。根據對偶基因頻率的柱狀分佈圖，各柱體代表每一尾豹鱸樣本，相同顏色表示具有類似的對偶基因頻率。以 MCMC 法 (Markov chain Monte Carlo) 進行事後機率值 (likelihood) 運算，並進行 10,000 次模擬計算，並重覆 10 次運算取平均值。分別計算各分群數 (K : 1 至 3 群) 的事後機率平均值，該值越接近 0 顯示此 K 值分群的結果越可信；並以 Structure Harvester 線上軟體進行 Evanno 演算，藉以推論最佳的分群數。

結 果

本研究共計採集 33 尾野生、60 尾豹鱸種魚及 34 尾人工繁殖豹鱸，共計 127 尾樣本進行分析比較。完成 79 組豹鱸與刺鰓屬的微衛星基因座引子測試，其中僅 18 組微衛星引子均可於野生、種魚及人工繁殖等 3 個族群獲得 PCR 產物。

接續利用 18 組螢光微衛星引子進行基因型判讀，其中僅 8 組可於多數豹鱸樣本呈基因片段長度多型性，PIC 值介於 0.20 (P11) 至 0.87 (P8)，除了 P9 及 P11 外，其他組引子之 PIC 值皆高於 0.5，顯示這些微衛星基因座在本研究的豹鱸樣本中具中或高度多型性 (Table 2)。哈溫平衡檢測結果顯示，僅 P8 與 P11 有顯著偏離 ($p < 0.05$)，其餘基因座均無偏離；連鎖不平衡檢測顯示，P12 與 P14 有顯著連鎖 ($p < 0.05$)，其餘基因座兩兩間均無連鎖效應。

八組微衛星基因座的對偶基因數 (A) 介於 3 組 (P9) 至 20 組 (P12)，平均 12.25 組。此外，就野生 (PHW)、種魚 (PHB) 及人工繁殖 (PHF1) 等 3 個族群個別來看，在 3 個族群內均呈現基因片段多型性。PHW 族群中以 P9 與 P11 具有最少的對偶基因數 (3 組)，P7 具有最多的對偶基因數 (13 組)；PHB 族群以 P9 及 P11 具有最少的對偶基因數 (2 組)，P7 具有最多的對偶基因數 (17 組)；PHF1 族群以 P9 具有最少的對偶基因數 (2 組)，P2 具有最多的對偶基因數 (10 組) (Table 3)。

利用 8 組微衛星基因座所估算出豹鱸在 PHW、PHB 及 PHF1 等 3 個族群中的 H_o 值介於 0.18 - 0.81，平均值為 0.64； H_e 值介於 0.21 - 0.88，平均值為 0.68。PHW 族群的 H_o 值介於 0.26 - 0.82，平均值為 0.64； H_e 值介於 0.27 - 0.89，平均值為 0.68，其中有 1 組異型合子觀察值大於期望值。PHB 族群的 H_o 值介於 0 - 0.83，平均值為 0.62； H_e 值介於 0.03 - 0.86，平均值為 0.65，其中僅 1 組異型合子觀察值大於期望值。PHF1 族群的 H_o 值介於 0.26 - 0.82，平均值為 0.66； H_e 值介於 0.37 - 0.79，平均值為 0.65，其中有 5 組異型合子觀察值大於期望值 (Table 3)。

Table 3 Summary table of microsatellite loci genetic variability

Population	Parameters	Locus number								
		P2	P6	P7	P8	P9	P11	P12	P14	ALL
ALL (n = 127)	A	14	6	18	18	3	4	20	15	12.25
	A _R	4.18	2.77	4.38	4.50	1.94	1.61	4.27	3.75	
	H _o	0.78	0.60	0.81	0.73	0.45	0.18	0.77	0.77	0.64
	H _e	0.83	0.60	0.86	0.88	0.46	0.21	0.85	0.78	0.68
Wild population (PHW) (n=33)	A	9	4	13	11	3	3	11	11	8.13
	A _R	3.99	2.49	4.65	3.83	2.06	1.76	4.01	4.05	
	H _o	0.82	0.50	0.75	0.76	0.48	0.21	0.79	0.82	0.64
	H _e	0.81	0.50	0.89	0.80	0.51	0.27	0.81	0.83	0.68
Broodstock (PHB) (n=60)	A	12	6	17	13	2	2	14	12	9.75
	A _R	4.26	2.81	4.13	3.71	1.92	1.10	3.76	3.85	
	H _o	0.80	0.60	0.83	0.73	0.53	0.00	0.75	0.72	0.62
	H _e	0.85	0.61	0.86	0.78	0.45	0.03	0.79	0.79	0.65
Offspring (PHF1) (n=34)	A	10	4	9	6	2	3	9	8	6.38
	A _R	3.74	2.83	3.81	3.57	1.87	1.88	3.55	3.23	
	H _o	0.71	0.68	0.82	0.74	0.26	0.47	0.76	0.82	0.66
	H _e	0.76	0.63	0.79	0.78	0.41	0.37	0.72	0.71	0.65

A: number of alleles
 A_R: allelic richness
 H_o: observed heterozygosity
 H_e: expected heterozygosity

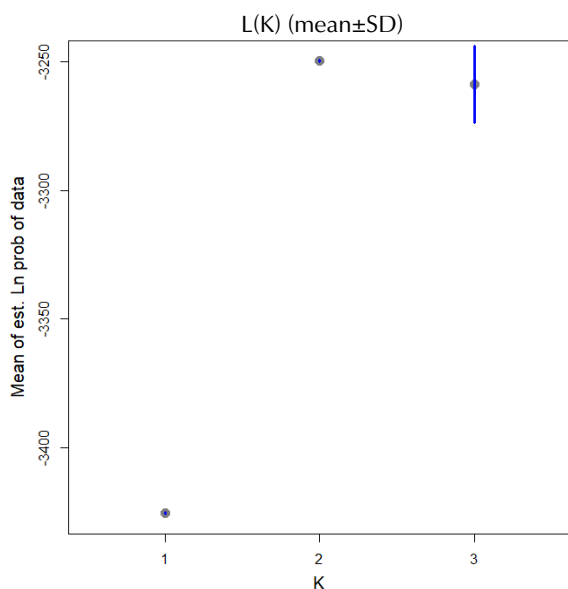


Fig. 1 Mean of the estimated Ln probability (likelihood) of K=1, 2, 3.

PHW、PHB 及 PHF1 等 3 個族群之間的 *F_{st}* 分別為 0.062 (PHW vs PHB)、0.062 (PHW vs PHF1) 及 0.087 (PHB vs PHF1)，統計上皆呈現顯著差異 ($p < 0.05$)。族群遺結構組成分析結果顯示，當 $k = 3$ 時具有最高可信度的事後機率平均值 (likelihood) = -3258.7 (Fig. 1)，Evanno 演算結果顯示，分為 3 群為最佳之分群結果 (Fig. 2)。

討 論

水產種苗生產過程中，親代種原的管理是很重要的一環，包括其來源、體型尺寸、性別組成、性狀表現及遺傳歧異度等相關資訊蒐集與分析，都會影響後續的繁養殖操作 (Duncan *et al.*, 2013)。譬如母體效應 (maternal effect) 的影響，雌魚的個體大小或年齡會影響其卵的大小與品質，進而影響子代幼苗的存活率與初期成長 (Messina and Fox, 2001;

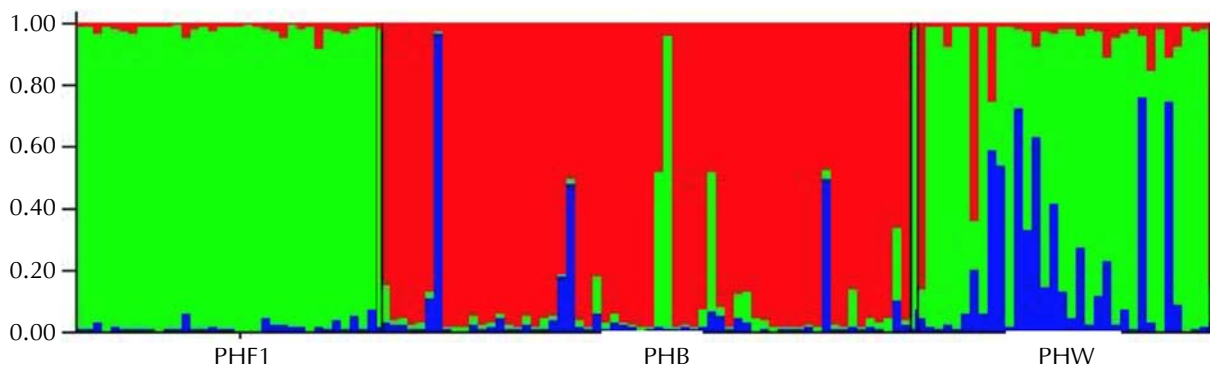


Fig. 2 Genetic clustering patterns of *Plectropomus leopardus* from different sample sites as inferred by Bayesian methods implemented in the STRUCTURE program.

Rollinson and Rowe, 2016)。此外，人為選汰、小規模的種魚群數量會導致發生先驅者效應或基因漂變現象，均會造成子代呈現低遺傳歧異度，進而發生成長狀況不佳、抗病能力或環境耐受力變差的狀況 (Waples *et al.*, 1990; Taniguchi, 2003)。即便起初種魚群與野生族群具有相似的遺傳歧異度，仍可能因為不當的飼養管理或繁殖策略，導致數個繁殖世代內的遺傳歧異度迅速衰退 (Taniguchi, 2003)。

本研究為繼龍膽石斑與點帶石斑之後，第3種進行野生與人工繁養殖族群遺傳歧異度比較分析的石斑魚類。本研究採用之79組微衛星基因座為參考已發表之文獻，並非自行篩選，可用於分析的組數比率僅10.1% (8組)，且部分基因座之基因片段多型性偏低，均可能會影響分析結果。未來仍需篩選具多型性之微衛星基因座以持續進行遺傳歧異度監測分析，亦可發展遺傳標誌之指紋分析技術 (fingerprinting technique)，藉以進行分子標誌育種，篩選成長性狀較佳或體色較紅艷之個體做為種魚，或是可用於人工繁殖個體有進行放流或逸散之野外時，可協助用於評估放流的效果或逸散的程度 (Coughlan *et al.*, 1998; Lundrigan *et al.*, 2005)。

根據微衛星基因座的對偶基因數的比較顯示，野生與種魚群具有近似的對偶基因數目，人工繁殖群在P7、P8、P12及P14等數個微衛星基因座則有明顯的減少趨勢。3個族群具近似的異型合子的觀察值，顯示3個族群仍具尚屬高程度的遺傳歧異度。相較於其他大宗養殖石斑魚種，澎湖豹鱸野生與種魚族群的基因數有高於野生點帶石斑

與龍膽石斑的趨勢，但在異型合子觀察值則無明顯差異。人工繁殖族群的部分，豹鱸與點帶石斑或龍膽石斑亦無明顯差異；若以國際自然保護聯盟紅皮書之資源評估等級進行區分比較不同魚種的對偶基因數，澎湖海域的豹鱸明顯高於極危 (critically endangered, CR) 等級的拿騷石斑 (*E. striatus*)、瀕危 (endangered, EN) 等級的赤點石斑 (*E. akaara*)、無危 (least concern, LC) 等級的馬拉巴石斑 (*E. malabaricus*) 與網紋石斑 (*E. merra*)，卻明顯低於LC等級的玳瑁石斑 (*E. quoyanus*) 與橫紋鱸 (*Cephalopholis boenak*) (Table 4)。本研究調查期間發現，在臺灣周圍海域僅澎湖海域擁有豐富的豹鱸族群數量，是否為豹鱸之繁殖或棲息場域目前仍無定論，實有必要釐清以協助該魚種之漁業資源管理及保育。此外，因本所已完成該魚種之完全養殖技術，針對野外族群的保育管理，也將有助於種原庫內種魚的汰換與維持遺傳歧異度，減緩子代發生遺傳歧異度降低的狀況。

本研究分析之人工繁殖個體為F1子代，雖親代種原均為自野外採集之個體，惟根據族群遺傳結構組成成分與遺傳分化指數分析的結果均顯示，野生、種魚及人工繁殖等3個族群間呈現明顯不同的遺傳結構，且有顯著的遺傳分化。野生與種魚群呈現不同遺傳結構，推論可能是由於採集自澎湖海域不同的系群所致。根據馬等 (2014, 2018) 的研究顯示，臺灣海域的豹鱸與菲律賓海域的族群雖有相當程度的分化，與宿霧海域的族群較相似，卻與巴拉望海域的族群不同。此結果也顯示澎湖海域可能存在有不同系群的豹鱸族群。同樣分佈於澎湖海域呈現不同遺傳結構的狀況也發生在桌

Table 4 Genetic variability inferred from microsatellite loci of groupers and some aquaculture species

Species	A	Ho	He	IUCN Red list status	Reference
<i>Plectropomus leuaprds</i> (PHW)	8.1	0.64	0.68	LC	this study
<i>P. leuaprds</i> (PHB)	9.8	0.62	0.65	LC	this study
<i>P. leuaprds</i> (PHF1)	6.4	0.66	0.65	LC	this study
<i>Epinephelus striatus</i>	4 – 25	0.11 – 1	0.61 – 1	CR	Jackson <i>et al.</i> , 2014
<i>E. akaara</i>	4.3	0.58	0.45	EN	Koedprang <i>et al.</i> , 2007
<i>E. polyphkadion</i>	14	0.59 – 0.92	0.78 – 0.95	VU	Rhodes <i>et al.</i> , 2003
<i>E. morio</i>	8 – 27	0.44 – 0.95	0.54 – 0.93	VU	Zatcoff <i>et al.</i> , 2004
<i>E. marginatus</i>	10.3	0.61	0.74	VU	De Innocentiis <i>et al.</i> , 2001
<i>E. malabaricus</i>	3.7	0.67	0.72	LC	Yin <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coioides</i> (Thailand)	3.6 – 5.1	0.36 – 0.55	0.5 – 0.66	LC	Antoro <i>et al.</i> , 2005
<i>E. coioides</i>	6.4 – 12.9		0.64 – 0.81		Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coioides</i> (Aquaculture)	6.7 – 8.8		0.65 – 0.73		
<i>E. coioides</i> (South China Sea)	3.6	0.68	0.7		Yin <i>et al.</i> , 2012
<i>E. merra</i>	4.6	0.75	0.78	LC	Yin <i>et al.</i> , 2012
<i>E. merra</i>	14.6	0.56	0.73		Muths <i>et al.</i> , 2015
<i>E. quoyanus</i> (Australia)	18.4	0.75	0.81	LC	Al-Salamah, 2014
<i>E. quoyanus</i> (Taiwan)	11.6	0.76	0.78		Chen <i>et al.</i> , 2015
<i>Cephalopholis boenak</i> (Taiwan)	18.9	0.68	0.75	LC	Shiao <i>et al.</i> , unpublished
<i>E. lanceolatus</i>	7.4 – 7.8	0.34 – 0.35	0.66	DD	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>E. lanceolatus</i> (Aquaculture)	6 – 7.6	0.36 – 0.45	0.54 – 0.64		
<i>Pampus argenteus</i>	5.5	0.71	0.77	VU	Qin <i>et al.</i> , 2013
<i>Lates calcarifer</i> (Aquaculture)	10.2	0.8	0.78	LC	Senanan <i>et al.</i> , 2014
<i>L. calcarifer</i>	12.2	0.79	0.79		

型軸孔珊瑚 (*Acropora hyacinthus*)，以細胞核基因與粒線體控制區基因分析結果顯示澎湖北部與南部海域呈現截然不同的基因型，北部海域的系群與日本沖繩相似，南部海域則與日本鹿兒島相似，推測應為受到海底地形與黑潮的隔離 (barrier) 致產生臨域性遺傳分化 (parapatric genetic differentiation) 的現象 (Suzuki *et al.*, 2016)。此現象也在許多石斑魚被發現有類似狀況，例如烏鰭石斑 (*E. marginatus*) (Schunter *et al.*, 2011a, b)、拿騷石斑 (Jackson *et al.*, 2014)、黑尾下美鮨 (*Hyporthodus acanthistius*) (Beldade *et al.*, 2014)、赤石斑魚 (*E. fasciatus*) (Kuriwa *et al.*, 2014)、網紋石斑魚 (Muths *et al.*, 2015)。豹鱧在澎湖海域是否有

因為水文等環境因子造成遺傳分化仍需要更多的研究驗證。

種魚與人工繁殖群呈現不同遺傳結構，推論可能為繁殖操作方式與豹鱧的繁殖產卵行為所致。現行本所豹鱧繁殖方式乃將所有種魚集中與收卵，無法確認是否所有種魚均有排精卵的行為，亦無法進行實際配對個體的辨識。根據 Samoilys and Squire (1994) 的調查指出，豹鱧在形成繁殖群 (spawning aggregation) 時，雄魚仍具有領域性以防止其他雄魚靠近。在與雌魚發生求偶行為與配對後，會迅速游離繁殖群，在接近水表面同時排出精卵。然而在人工的環境內，豹鱧是否仍保有此行為尚無明確的研究。從本研究的結果推論，即便將多

尾豹鱸種魚集中進行繁殖，實際上可能僅有少數的個體有排精卵的行為，而導致繁殖子代的遺傳結構與種原群整體不同。另一方面，劉等 (2004) 發現橫紋鱸在人工飼養環境下，雌魚的性轉變行為會受同一池內有無其他雄魚個體存在影響。在已有雄魚存在的池中，雌魚皆未有性轉變行為。倘將 2 尾以上的公魚於同池飼養，則會造成行為位階較弱勢的個體再度性轉 (bidirectional sex change) 變成雌魚，整個池中僅會有一尾公魚的存在。這種在石斑魚的雙向性轉變現象也曾在赤點石斑被驗證 (Okumura, 2001; Sadovy and Liu, 2008)。綜上，豹鱸飼養於人工環境下是否產生階級性的社會行為模式，以及繁殖配對行為模式與性轉行為模式，進而影響種原群的性比與繁殖子代的遺傳歧異度，均待更多的研究予以確認。

目前對於臺灣周圍海域豹鱸族群的研究仍非常缺乏，未來應積極進行遺傳多樣性、族群遺傳結構、產卵場調查、動物行為與基礎漁業生物學等研究，俾利擬定合理且有效之漁業管理保育策略，以維該魚種之永續利用，也可幫助豹鱸發展成為新興養殖石斑魚種。本研究亦將持續針對種原庫豹鱸 F2 子代進行遺傳歧異度評估，俾供豹鱸種魚管理參考。

謝 辭

本研究特別感謝行政院農業委員會水試驗所科技計畫編號：105 農科-11.2.1-水-A1 (3) 在研究經費上的支持；感謝國立臺灣大學漁業科學研究所與中央研究院生物多樣性研究中心對於實驗與設備上給予的支持；感謝行政院農業委員會水試驗所澎湖海洋生物研究中心與賴銘哲先生協助提供與採集豹鱸樣本，特此感謝。

參考文獻

- Beldade, R., A. M. Jackson, R. Cudney-Bueno, P. T. Raimondi and G. Bernardi (2014) Genetic structure among spawning aggregations of the gulf coney *hyporthodus acanthistius*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 499: 193-201.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3): 314-331.
- Bruno, J. F. and E. R. Selig (2007) Regional decline of coral cover in the indo-pacific: Timing, extent, and subregional comparisons. *Plos One*, 2(8): e711.
- Cesar, H., L. Burke and L. Pet-Soede (2003) The economics of worldwide coral reef degradation. Cesar Environ. Econ. Consulting (CEEC), 6828GH Arnhem, The Netherlands, 23 pp.
- Chen, K. S., L. P. Liu, C. H. Sung, K. C. Wen and S. T. Hsiao (2015) A preliminary study on genetic diversity and population genetic structure of longfin grouper (*Epinephelus quoyanus*) in Taiwan and Southern Great Barrier Reef, Australia. *J. Taiwan Fish. Res.*, 23 (2): 27-36.
- Choat, J. H. and M. Samoilys (2018) *Plectropomus leopardus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T44684A100462709.
- Coughlan, J. P., A. K. Imsland, P. T. Galvin, R. D. Fitzgerald, G. Naevdal and T. F. Cross (1998) Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: A preliminary study. *J. Fish Biol.*, 52(5): 916-922.
- Crozier, R. H., Y. C. Crozier and A. G. Mackinlay (1989) The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial-DNA evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.*, 6(4): 399-411.
- Ding, S. X., H. S. Zeng, Y. Wang, Y. Pan and X. F. Shi (2009) Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus* lacepede). *Mol. Ecol. Resour.*, 9(6): 1485-1487.
- Duncan, N. J., A. K. Sonesson and H. Chavanne (2013) Principles of finfish broodstock management in aquaculture: control of reproduction and genetic improvement. *In Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (G. Allan & G. Burnell eds.), Woodhead Pub., 23-75.
- Falush, D., M. Stephens and J. K. Pritchard (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4): 1567-1587.
- Glover, K. A., M. Quintela, V. Wennevik, F. Besnier and A. Sørvik (2012) Three decades of farmed escapees in the wild: a spatio-temporal analysis of Atlantic salmon population genetic structure throughout Norway. *Plos One* 7(8): e43129.

- Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Hamilton, R. J. and M. Matawai (2006) Live reef food fish trade causes rapid declines in abundance of squaretail coral grouper (*Plectropomus areolatus*) at a spawning aggregation site in Manus, Papua New Guinea. SPC Live Reef Fish Information Bull., 16: 13-18.
- Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) FAO Species Catalogue: Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). FAO Fisheries Synopsis NO.125, Vol. 16, 382 pp.
- Hugall, A., J. Stanton and C. Moritz (1997) Evolution of the at-rich mitochondrial DNA of the root knot nematode, meloidogyne hapla. Mol. Biol. Evol., 14(1): 40-48.
- Jackson, A. M., B. X. Semmens, Y. S. de Mitcheson, R. S. Nemeth, S. A. Heppell, P. G. Bush, A. Aguilar-Perera, J. A. B. Claydon, M. C. Calosso, K. S. Sealey, M. T. Scharer and G. Bernardi (2014) Population structure and phylogeography in nassau grouper (*Epinephelus striatus*), a mass-aggregating marine fish. Plos One, 9(5): doi.org/10.1371/journal.pone.0097508.
- Karlsson, S., T. Moen, S. Lien, K. A. Glover and K. Hindar (2011) Generic genetic differences between farmed and wild atlantic salmon identified from a 7k snp-chip. Mol. Ecol. Resour., 11: 247-253.
- Khasanah, M., N. Nurdin, Y. Sadovy de Mitcheson, and J. Jompa (2020) Management of the grouper export trade in Indonesia. Rev. Fish. Sci. Aqua., 28(1): 1-15.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16 (2): 111-120.
- Kuriwa, K., S. N. Chiba, H. Motomura and K. Matsuura (2014) Phylogeography of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus* (Perciformes: Serranidae), and influence of the kuroshio current on cryptic lineages and genetic population structure. Ichthyol. Res., 61: 361-374.
- Leis, J. M., K. J. Wright and R. N. Johnson (2007) Behaviour that influences dispersal and connectivity in the small, young larvae of a reef fish. Mar. Biol., 153(1):103-117.
- Liu, Q., H. Lin, J. Chen, J. Ma, R. Liu and S. Ding (2020) Genetic variation and population genetic structure of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) based on genome wide single nucleotide polymorphisms in farmed and wild populations. Fish. Res., 232, 105718.
- Lundrigan, T. A., J. D. Reist and M. M. Ferguson (2005) Microsatellite genetic variation within and among arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in north America. Aquaculture, 244(1-4): 63-75.
- Ma, K. Y. (2014) Patterns and processes of diversification in groupers (family: Epinephelidae) Doctoral dissertation, James Cook University.
- Ma, K. Y., L. van Herwerden, S. J. Newman, M. L. Berumen, J. H. Choat, K. H. Chu and Y. S. de Mitcheson (2018) Contrasting population genetic structure in three aggregating groupers (percoidei: Epinephelidae) in the Indo-west Pacific: The importance of reproductive mode. BMC Evol. Biol., 18(1): 180.
- McLean, D. L., E. S. Harvey and J. J. Meeuwig (2011) Declines in the abundance of coral trout (*Plectropomus leopardus*) in areas closed to fishing at the Houtman Abrolhos Islands, western Australia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 406(1-2): 71-78.
- Messina, F. J. and C. W. Fox (2001) Offspring size and number. In Evolutionary Ecology, Concepts and Case Studies (C. W. Fox, D. A. Roff and D. J. Fairbairn eds.), Oxford, University Press, 113-127.
- Muths, D., E. Tessier and J. Bourjea (2015) Genetic structure of the reef grouper in the west Indian Ocean appears congruent with biogeographic and oceanographic boundaries. Mar. Ecol., 36(3): 447-461.
- Norris, A. T., D. G. Bradley and E. P. Cunningham (1999) Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*salmo salar*) populations. Aquaculture, 180(3-4): 247-264.
- Okumura, S. (2001) Evidence of sex reversal towards both directions in reared red spotted grouper *Epinephelus akaara*. Fish. Sci., 67(3): 535-537.
- Perez-Enriquez, R., M. Takagi and N. Taniguchi (1999) Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. Aquaculture, 173(1-4): 413-423.
- Polovina, E. S., E. Kourkouni, C. S. Tsigenopoulos, P. Sanchez-Jerez and E. D. Ladoukakis (2020) Genetic structuring in farmed and wild gilthead seabream and european seabass in the Mediterranean Sea: Implementations for detection of escapees. Aquat.

- Living Resour., 33(7): 11.
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- Raymond, M. and F. Rousset (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86(3): 248-249.
- Roberts, C. M. (1997) Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science*, 278(5342): 1454-1457.
- Rollinson, N. and L. Rowe (2016). The positive correlation between maternal size and offspring size: Fitting pieces of a life-history puzzle. *Bio. Rev.*, 91(4): 1134-1148.
- Rousset, F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*, 8(1): 103-106.
- Sadovy, Y. and M. Domeier (2005) Are aggregation-fisheries sustainable? Reef fish fisheries as a case study. *Coral Reefs*, 24(2): 254-262.
- Sadovy, Y. and M. Liu (2008) Environmental and biodiversity impacts of capture-based aquaculture. *Capture-based aquaculture*, 5.
- Sadovy de Mitcheson, Y., M. T. Craig, A. A. Bertoni, K. E. Carpenter, W. W. L. Cheung, J. H. Choat, A. S. Cornish, S. T. Fennessy, B. P. Ferreira, P. C. Heemstra, M. Liu, R. F. Myers, D. A. Pollard, K. L. Rhodes, L. A. Rocha, B. C. Russell, M. A. Samoilys and J. Sanciangco (2013) Fishing groupers towards extinction: A global assessment of threats and extinction risks in a billion-dollar fishery. *Fish Fish.*, 14(2):119-136.
- Samoilys, M. A. and L. C. Squire (1994) Preliminary-observations on the spawning behavior of coral trout, *Plectropomus leopardus* (Pisces, Serranidae), on the great-barrier-reef. *Bull. Mar. Sci.*, 54(1): 332-342.
- Sattar, S. A., A. Najeeb, F. Islam, M. S. Afzal and E. Wood (2012) Management of the grouper fishery of the Maldives. *In Proc. 12th Int. Coral Reef Sym., Cairns*, 13: 1-5.
- Schunter, C., J. Carreras-Carbonell, E. MacPherson, J. Tintore, E. Vidal-Vijande, A. Pascual, P. Guidetti and M. Pascual (2011a) Matching genetics with oceanography: Directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Mol. Ecol.*, 20(24): 5167-5181.
- Schunter, C., J. Carreras-Carbonell, S. Planes, E. Sala, E. Ballesteros, M. Zabala, J. G. Harmelin, M. Harmelin-Vivien, E. Macpherson and M. Pascual (2011b) Genetic connectivity patterns in an endangered species: The dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 401(1-2): 126-133.
- Sekino, M., M. Hara and N. Taniguchi (2002) Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213(1-4): 101-122.
- Slatkin, M. (1985) Gene flow in natural-populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 16: 393-430.
- Suzuki, G., S. Keshavmurthy, T. Hayashibara, C. C. Wallace, Y. Shirayama, C. A. Chen and H. Fukami (2016) Genetic evidence of peripheral isolation and low diversity in marginal populations of the *Acropora hyacinthus* complex. *Coral Reefs*, 35: 1419-1432.
- Taniguchi, N. (2003) Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev. Fish Bio. Fish.*, 13(2): 177-185.
- Taylor, M. S. and M. E. Hellberg (2003) Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a caribbean reef fish. *Science*, 299(5603): 107-109.
- To, W. I. (2009) The biology, fishery of groupers (family: Serranidae) in Hong Kong and adjacent waters, and implications for management. Doctoral dissertation, University of Hong Kong.
- Van Herwerden, L., J. Benzie, L. Peplow and C. Davies (2000) Microsatellite markers for coral trout (*Plectropomus laevis*) and red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) and their utility in other species of reef fish. *Mol. Ecol.*, 9(11): 1929-1931.
- Van Herwerden, L., J. H. Choat, S. J. Newman, M. Leray and G. Hillersoy (2009) Complex patterns of population structure and recruitment of *Plectropomus leopardus* (Pisces: Epinephelidae) in the Indo-West Pacific: Implications for fisheries management. *Mar. Biol.*, 156(8): 1595-1607.
- Waples, R. S., G. A. Winans, F. M. Utter and C. Mahnken (1990) Genetic approaches to the management of pacific salmon. *Fisheries*, 15(5): 19-25.
- Wang, L., Z. N. Meng, X. C. Liu, Y. Zhang and H. R. Lin (2011) Genetic diversity and differentiation of the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) between and within cultured stocks and wild populations inferred from microsatellite DNA analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(7): 4378-4394.
- Wang, Q., X. Wang, Z. Z. Xie, Y. Q. Li, L. Xiao, C. Peng, H. F. Zhang, S. S. Li, Y. Zhang and H. R. Lin

- (2016) Microsatellite analysis of the genetic relationships between wild and cultivated giant grouper in the South China Sea. *J. Genet.*, 95(2): 369-376.
- Wen, C. K. C., M. S. Pratchett, G. R. Almany and G. P. Jones (2013) Patterns of recruitment and microhabitat associations for three predatory coral reef fishes on the southern Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs*, 32(2): 389-398.
- Wilkinson, C. (2008) Status of Coral Reefs of the World: 2008. Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre, Townsville, Australia, 296 pp.
- Williamson, D. H., G. R. Russ and A. M. Ayling (2004) No-take marine reserves increase abundance and biomass of reef fish on inshore fringing reefs of the great barrier reef. *Environ. Conserv.*, 31(2): 149-159.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol.*, 19: 395-420.
- Wright, S. (1978) Evolution and genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Zhang, J. B., H. F. Liu and Y. Song (2010) Development and characterization of polymorphic microsatellite loci for a threatened reef fish *Plectropomus leopardus*. *Conserv. Genet. Resour.*, 2: 101-103.
- Zhu, Z. Y., L. C. Lo, G. Lin, Y. X. Xu and G. H. Yue (2005) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from red coral grouper (*Plectropomus maculatus*). *Mol. Ecol. Notes*, 5(3): 579-581.

Genetic Divergence Between Laboratory-bred and Wild Populations of Coral Trout (*Plectropomus leopardus*) Inferred from Microsatellite DNA

Chen, Kao-Sung^{1,2*}, Sheng-Tai Hsiao³, Colin Kuo-Chang Wen⁴, Hernyi Justin Hsieh⁵,
Chai-Hsia Gan¹, Yung-Song Wang² and Chaolun Allen Chen⁶

¹Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

²Institute of Fisheries Science, National Taiwan University

³Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

⁴Department of Life Science, Tunghai University

⁵Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

⁶Biodiversity Research Center, Academia Sinica

ABSTRACT

Coral trout, *Plectropomus leopardus*, is one of the high-priced groupers. However, wild populations of *P. leopardus* are facing population decline due to overharvesting and habitat destruction. In order to restore the wild populations, we established a breeding program to artificially propagate *P. leopardus*, and subsequently examined the genetic diversity and differentiation among the breeding stock, artificially bred stock (F1), and wild populations around the Penghu Islands of Taiwan. A total of 127 individual specimens of *P. leopardus*, including 60 individuals from the breeding stock, 34 F1 fish, and 33 fish from the wild populations were examined using 8 nuclear microsatellite (MST) markers. The results of the MST analyses revealed that the number of alleles (A) ranged from 3 to 20, the observed heterozygosity (Ho) ranged from 0.18 to 0.81, and the expected heterozygosity (He) ranged from 0.21 to 0.88. The allele and heterozygosity results revealed that the genetic diversity of the F1 fish was not significantly decreased in comparison to that of the breeding stock and wild populations. However, the pairwise population differentiation index (Fst) ranged from 0.021 to 0.087, and all the population pairs were significantly different ($p < 0.05$) from each other. Furthermore, the genetic structure analysis results revealed that distinct genetic structures existed among the breeding stock, F1, and wild populations (when $k = 3$ with maximum likelihood value = -3258.7), suggesting the effect of artificial selection on the breeding stock. Our results will be useful for the future management of the breeding stock and the conservation of coral trout in general.

Key words: Coral trout (*Plectropomus leopardus*), microsatellite locus, genetic variability, population genetic structure

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 20246, Taiwan. TEL: (02)2462-2101 ext.2519; Fax: (02)2462-4627; E-mail: kschen@mail.tfrin.gov.tw