

澎湖海域豹鱸艷紅體色與單點核苷酸變異位點之關聯性分析

吳虹儀¹ · 陳高松² · 黃侑勛³ · 王敏儒⁴ · 謝恆毅⁴ · 蔡欣原^{1*}

¹ 國立中山大學海洋生物科技暨資源學系

² 行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

³ 行政院農業委員會水產試驗所東部海洋生物研究中心

⁴ 行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

摘要

豹鱸 (*Plectropomus leopardus*) 分布於熱帶及亞熱帶地區的珊瑚礁海域，為亞洲地區重要經濟性石斑魚種之一，且艷紅體色個體價格高於灰褐色個體。隨著漁撈技術進步市場需求日益漸增，以致野生豹鱸漁業資源銳減。為了保育野生豹鱸族群，行政院農委會澎湖海洋生物研究中心已建立豹鱸完全養殖技術。然而，人工繁殖豹鱸體色常為灰褐色或淺粉紅色，無法取代捕捉野生艷紅體色豹鱸之需求，且目前對於豹鱸體色形成機制也尚未了解透徹。本研究於澎湖十處海域收集不同體色豹鱸相關資料達 2,916 筆，並萃取其遺傳物質 DNA 供後續實驗，結果顯示所捕獲之艷紅體色豹鱸體長皆顯著大於灰褐色與暗紅色個體，以基因體研究方法與線性混合模型分析具潛力之三個單點核苷酸變異位點，其中代號 SNP_87_4 與多個魚體部位體色表現變異在統計上具有顯著差異。綜合上述結果，本研究希冀能提供養殖業篩選出艷紅體色豹鱸之種魚，滿足市場需求緩解野生豹鱸捕撈壓力，協助產業發展並維護生態平衡達到資源永續經營之雙贏目標。

關鍵詞：豹鱸、體色、單點核苷酸變異位點、數量性狀基因座

前言

豹鱸 (Leopard coral grouper, *Plectropomus leopardus*) 中文名花斑刺鰷鯧，俗名為七星斑、東星斑與紅條等。分類上屬於鱸形目 (Perciformes)、鮨科 (Serranidae)、鰷棘鱸屬 (*Plectropomus*)，分布於日本以南至澳洲及加羅林群島以東的西太平洋海域 (Zeller, 1997)，棲息於深度範圍 3 - 100 m 的暖水礁岩地區，最大體長可達 120 cm (邵, 2020)。豹鱸與大多數的石斑魚都是先雌後雄的雌雄同體，其性別轉變隨著社會位階而發生 (Ferreira, 1995; Adams, 2003)。近年來東南亞地區因過度捕撈，以及漁業活動影響豹鱸群聚產卵，在菲律賓與澳洲發現豹鱸族群量下降甚為明顯 (Padilla *et al.*, 2003; Mclean *et al.*, 2011; Yin, 2014)，雖然國際自然保育聯盟紅皮書目

前將豹鱸列為無危物種 (least concern) (Choat and Samoilys, 2018)，但仍需要建立妥適的漁業管理措施及保育行動策略，以免將來淪為資源量評估風險等級更高之物種。

石斑魚是重要經濟性水產養植物種，約有 47 種石斑魚養殖盛行於東亞及東南亞地區 (Rimmer and Glamuzina, 2019)，主要以龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)、點帶石斑 (*E. coioides*) 及馬拉巴石斑 (*E. malabaricus*) 為大宗養殖種類。豹鱸因具有別於上述種類的艷紅體色，又在中華文化中紅色象徵好運及喜氣，使得該魚種一直為華人市場中的高經濟價值石斑魚種 (Fabinyi, 2012)，且艷紅色體色豹鱸可比灰褐色個體高出兩倍價錢 (Yang *et al.*, 2020)。行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物中心已建立豹鱸完全養殖技術 (許等, 2014)，惟經人工環境飼養的豹鱸其體色無法像野生型體色般艷紅，大多呈現灰褐色、暗紅或粉紅色。為改善此問題，已有許多飼料添加或養殖環境管理相關研究提出如何進行體色增豔

* 通訊作者 / 高雄市鼓山區蓮海路 70 號, TEL: (07)5252000 ext. 5031, E-mail: hyt@mail.nsysu.edu.tw

(Kelsh, 2004; Melianawati *et al.*, 2013; Kusumawati and Setiawati, 2017)，探討調控體色遺傳變異機制則可供了解該等飼料添加物或環境因素如何與遺傳因子交互作用，進而降低養殖管理成本，係為一值得探究的魚類體色變異議題。

豹鱧如同其他珊瑚礁魚擁有多變的體色，會因為外在的環境條件、攝食行為、疾病以及其他壓力等而有所改變 (Kingsford, 1992; Wang *et al.*, 2015; Lerebours *et al.*, 2016)，豹鱧體色具多態性，在本研究中魚隻樣本體色介於豔紅與灰褐色間，臺灣周邊海域、日本沖繩及中國南海皆有發現不同體色之野生型豹鱧 (Cai *et al.*, 2013; Maoka *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020)。除了外在因素影響體色呈現外，研究發現飼料中添加類胡蘿蔔素中因含有蝦紅素會使豹鱧體色呈現紅色 (Kusumawati and Setiawati, 2017; Maoka *et al.*, 2017)，改變調節類胡蘿蔔素相關基因 *BCO2*、*LRP11*、*ANGPTLs* 也可能影響豹鱧所帶有的體色 (Yang *et al.*, 2020)。目前中國研究團隊已完成豹鱧全基因體序列定序，而其全基因序列小於其他石斑魚，推斷可能與豹鱧位於石斑科之演化樹祖先位階為較早演化出之物種有關 (Yang *et al.*, 2020)。過去常利用微衛星基因座等相關遺傳標誌來探討野生豹鱧的族群歧異度、族群遺傳結構，有助於豹鱧育種與漁業管理 (Ding *et al.*, 2009; Van Herwerden *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2018)。藉由計算人工養殖魚之微衛星基因座異合性 (heterozygosity) 比例可發現，豹鱧異合性比例為 0.42% (Yang *et al.*, 2020)，高於赤點石斑魚的 0.375% (Ge *et al.*, 2019)、莫瑞鱈的 0.113% (Austin *et al.*, 2017)、歐洲梭鱸的 0.14% (Nguinkal *et al.*, 2019)、西藏高原鰍的 0.1% (Yang *et al.*, 2019)、雄性草魚的 0.25% 與雌性草魚的 0.09% (Wang *et al.*, 2015)，顯示豹鱧在水產養殖物種中尚屬低度人為選育物種，且具有高度族群遺傳歧異度，進而影響到表現型變異 (phenotypic variations)。

分子標誌輔助育種 (marker-assisted selection) 有效且精確地用於重要的經濟性水產物種 (Eze, 2019)，從遺傳調控機制下，於目標基因尋找單點核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，此單點核苷酸變異位點極有可能會影響魚體性狀，例如大西洋鮭魚中 *IGF1* 基因位於啟動子

位置上的單點核苷酸變異位點，與體重成長發育有顯著差異 (Tsai *et al.*, 2014)；金魚尾巴外觀呈現雙尾或單尾的性狀差異是透過 *chd* 基因上其單點核苷酸變異位點轉譯成終止密碼子 (Abe *et al.*, 2014)；藍身大石斑 (*E. tukula*) 的 3'非轉譯區與非同義編碼區域分別在 *ACTC1* 和 *PCNT* 基因上的單點核苷酸變異位點與生長性狀相關 (Hsu *et al.*, 2021)。

根據中國發表豹鱧體色調控相關之數量性狀基因座 (quantitative trait loci, QTL) 文獻中 (Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020)，本研究根據 Wang *et al.* (2015) 之表三與 Yang *et al.* (2020) 之表一，兩篇文獻經轉錄體分析結果各列出具有顯著差異的數量性狀基因座，從上述文獻之結果中篩選出的八個高度與體色相關之數量性狀基因座，後續將利用基因體研究方法找出具潛力單點核苷酸變異位點，運用線性混合模型估算豹鱧體色相關數量性狀基因座之單點核苷酸變異點與體色性狀間的關聯性，篩選出與豔紅體色豹鱧相關之分子標誌，不但能增加我國對於豹鱧基因體的研究深度，更可協助產業進行種原群選汰與管理，協助我國豹鱧養殖的產業化發展。

材料與方法

一、收集不同體色之野生型豹鱧

以竿釣、水肺潛水與當地魚市場購買等方式採集澎湖周邊海域之野生豹鱧，收集不同體色魚體並記錄其採集地點、體色、體重與體長等數據。以體色計測量不同體色豹鱧之五個不同位點的 L/a/b 值，分別為頭部、中背段、尾腹段、尾部與尾鰭 (Fig. 1)，並依體色分成灰褐色、暗紅色及豔紅色，標示此體色數量於捕獲地點，最後取其肌肉組織保存於 95%酒精進行後續試驗分析。

二、萃取 DNA 遺傳物質

根據 gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid) 的標準操作步驟萃取 DNA 遺傳物質。取 0.02 – 0.03 g 肌肉組織放入 1.5 ml 微量離心管中，加入 200 μ l Lysis buffer 和 20 μ l Proteinase K solution 混合均勻，以滅菌剪刀將組織剪碎後放置於 60°C 乾



Fig. 1 The five measurement sites for the wild-type leopard coral grouper individuals with bright red and brown skin coloration in the Penghu region. The numbers represent the head (1), the middle part of the back (2), the bottom part of the abdomen (3), the tail (4), and the caudal fin (5). These five sites were measured via L/a/b values using a colorimeter.

浴槽反應至隔天。將 1.5 ml 微量離心管的混合液以 $14,000 - 16,000 \times g$ 離心，接著取其上清液於新的 1.5 ml 微量離心管中，並加入 200 μ l GSB buffer 及 200 μ l 99.9% 酒精混合均勻後，將混合液吸出移至 GS column，再以 $14,000 - 16,000 \times g$ 離心 1 min，將 collection tube 內的液體倒入廢液桶。接著以 wash buffer 沖洗 GS column，再以 $14,000 - 16,000 \times g$ 離心 30 sec 並倒掉管內廢液，上述步驟重複兩次，以 $14,000 - 16,000 \times g$ 離心 3 min 將殘餘的液體去除。在 GS column membrane 上加入 45 μ l EB Buffer 靜置 3 min 以利回溶 DNA，最後以 $14,000 - 16,000$ rpm 離心 30 sec，收集回溶 DNA 於 1.5 ml 微量離心管，以超微量分光光度計 (DeNovix, USA) 測定 DNA 品質與濃度，DNA 品質須符合 A260/A280 與 A260/A230 之比值介在 1.8 及 2.0 間，並將樣品保存於 -20°C 冰箱。

三、聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

將粒腺體 DNA 中細胞色素 c 氧化酶亞基 I 基因 (cytochrome c oxidase I, COI) 生物條碼 (DNA barcode) 作為內部控制基因 (internal control gene)，並利用 PCR 技術將此片段放大，以此來辨識和鑑定豹鰨。PCR 技術使用 Butter Taq 2X Master

Mix (Protech, Taiwan)，根據廠商建議配方與反應條件 (1) 高溫分離兩股 DNA： 95°C 5 min；(2) 引子黏合與延長： 95°C 30 sec、 55°C 30 sec、 72°C 1 min，共循環 30 次；(3) 最後延長： 72°C 5 min。取 5 μ l PCR 產物與 1 μ l 6X DNA Fluorescent Loading Dye (SMOBIO, Taiwan) 混合，接著將樣本注入 1% 瓊脂糖凝膠 (agarose gel) 進行電泳分析，以 Bio-1000F 藍光掃描影像系統 (Microtek, Taiwan) 於藍光下確認單一產物長度與濃度後，送至廠商進行桑格定序 (Sanger sequencing) 服務，樣本序列以 NCBI 資料庫比對確認此物種為豹鰨，接續體色相關基因序列實驗。

四、體色相關基因序列定序

本研究根據已發表文獻中 Wang *et al.* (2015) 之表三與 Yang *et al.* (2020) 之表一篩選出八個與體色高度相關之數量性狀基因座 (Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020)，並對此八個體色相關數量性狀基因座之外顯子上游約 1000 個核苷酸進行引子設計，煉合溫度皆約 60°C ，將收集之不同體色同種之野生型豹鰨以對應之引子進行 PCR 放大後，上述樣本送至廠商 (Genomics, Taiwan) 進行桑格定序服務，並進行後續單點核苷酸變異點基因型分析。

五、以等位基因特異性擴增法 (allele-specific amplification, ASA) 檢測單點核苷酸變異點基因型

以等位基因特異性擴增法並設計 12 組引子，使用 Butter Taq 2X Master Mix，根據廠商建議配方以及反應溫度與時間，將攜帶有潛力之單點核苷酸變異點相對應體色數量性狀基因座放大此片段，檢測不同個體之豹鰨此單點核苷酸變異點中所攜帶基因型。

六、體色相關序列之變異點與線性混合模型關聯性分析

經序列分析並找尋有代表性之單點核苷酸變異點，體色相關因子 (地點、單點核苷酸變異點基

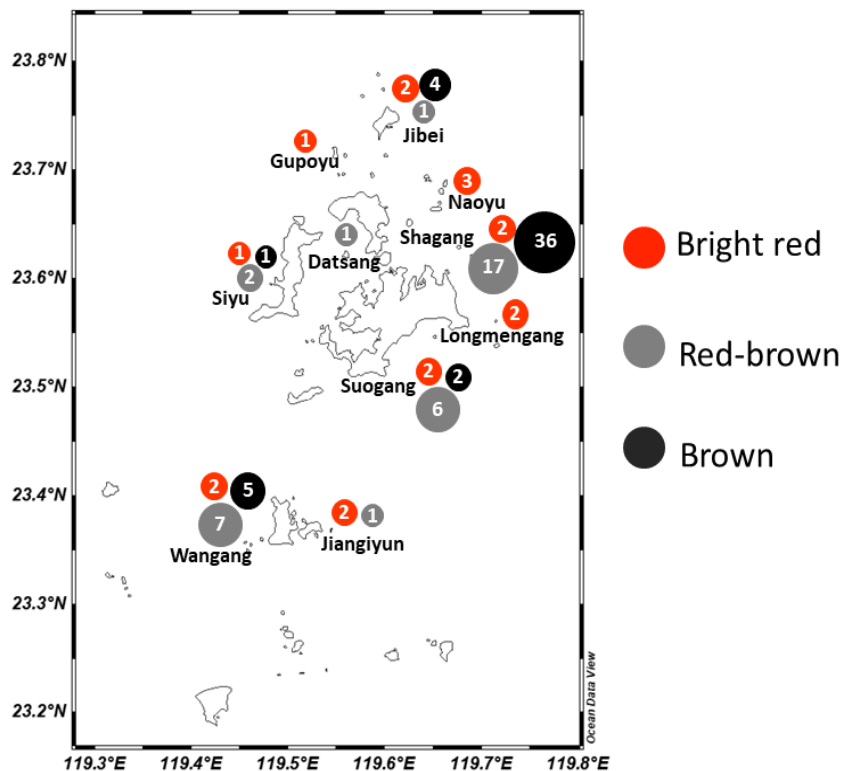


Fig. 2 Distribution of the leopard coral grouper throughout Penghu. Each circle represents a different color (bright red, red-brown, or brown), and the number in each circle represents the sample size collected.

因型與魚體長度) 套用線性混合模型 (linear mixed model, LMM) 測定其關聯性, 本實驗採用已發表之程式 DMU restricted maximum likelihood estimation (DMU REML) package 進行序列變異點與體色關聯性之統計分析 (Madsen and Jensen, 2013)。線性混合模型應用公式為：

$$y = Xb + m_i B_i + Zu + e$$

y 為性狀體色的向量； X 為固定因子之矩陣； b 為固定因子之向量； m_i 為基因型之向量包含第 i 遺傳標記所攜帶之遺傳訊息； B_i 為第 i 遺傳標記之隱性遺傳效應； Z 為隨機因子之矩陣； u 為隨機因子之向量； e 為隨機餘數的向量，其分布為 $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ 。透過此模型探討每一個單點核苷酸變異點對於豹鱸體色之影響力。

七、生物統計

DMU REML package 序列變異點與體色關聯性之統計分析，需由統計軟體 R 語言撰寫；不同體色的體長相關資料透過軟體 R 語言中的單因子變異數分析 (one way ANOVA)，分析於不同體色下豹鱸之體長是否有顯著差異，事後比較檢定以

杜凱確實差異檢定 (Tukey's honestly significant difference test, Tukey's HSD)。

結果與討論

一、澎湖海域不同體色豹鱸之地理分布與體長

橫跨澎湖周邊十個不同海域，自大倉、姑婆嶼、將軍嶼、吉貝、龍門、鳥嶼、沙港、鎖港、西嶼與望安，收集到 100 尾不同體色之野生型豹鱸 (17 尾豔紅、35 尾暗紅、48 尾灰褐色)，共計表徵數據達到 2,916 筆。由體色地理分布圖中發現，沙港為灰褐色魚體出現之熱點；暗紅與豔紅色魚體分布並無特別熱點 (Fig. 2)，且此兩種體色捕獲數量皆小於灰褐色個體。而沙港在這十個海域中，收集到最多尾豹鱸；大倉為內陸型海域，僅收集到一尾豹鱸。所捕獲魚體體長，灰褐色個體平均體長為 24.29 ± 2.75 cm，暗紅色個體為 24.02 ± 4.91 cm，豔紅色個體為 39.58 ± 10.48 cm，其中灰褐色個體體型偏小。灰褐色個體體長與暗紅色的個體之間沒有顯著差

異，豔紅色個體體長則顯著大於灰褐色 ($p < 0.001$) 及暗紅色個體 ($p < 0.001$) (Fig. 3)。

本研究於 2020 年 7 - 10 月份收集樣本，而豹鱸繁殖季大約在 5 - 10 月 (許, 2011)，未來能以 5 - 10 月進行收集樣本增加樣本數量，截至目前，所收集之樣本數還不足以反映真實情形，且每個樣點捕獲單位努力漁獲量不同可能會造成數據上體色分布的誤差。

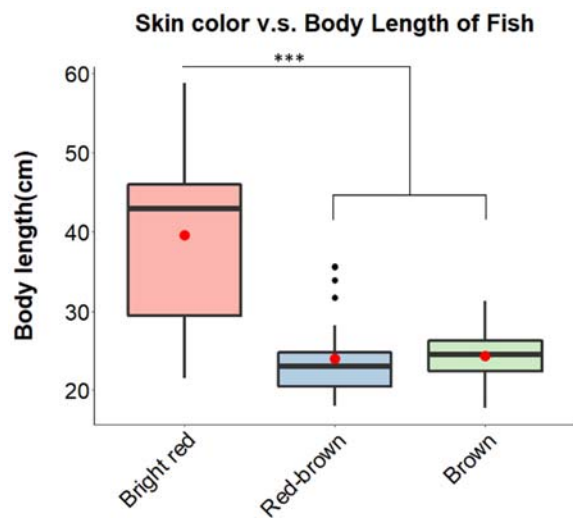


Fig. 3 Comparison of the body lengths of individuals with different skin colors. The body lengths among the individuals with different skin colors were significantly different using one-way ANOVA in the R package. The mean values are marked by a red dot. Significant sign: *** $p < 0.001$.

二、經線性混合模型探勘與體色調控相關三個具潛力之變異位點

本研究挑選了八個具有潛力與體色相關之數量性狀基因座，最終只有六個與體色相關之數量性狀基因座以聚合酶連鎖反應成功放大出來，找到七個單點核苷酸變異位點，再以等位基因特異性擴增法檢測其單點核苷酸變異點基因型，將上述得到的數據導入線性混合模型，加入體色外觀、不同捕獲地點與單點核苷酸變異點。經線性混合模型選出三個最可能與體色變異之序列變異點，代號為 SNP_87_4、SNP_103_1.1 與 SNP_103_1.2，此變異位點皆預期落在相對的數量性狀基因座上之啟動子區域，依體色表現型分類出同型或異型

合子之基因型，再根據哈溫定律計算出等位基因頻率 (Allele frequency) 分別為 0.92/0.08、0.85/0.15、0.93/0.07 (Table 1)。進一步分析，發現單點核苷酸變異點 SNP_87_4、SNP_103_1.1、SNP_103_1.2 與多個部位具有高度顯著差異。SNP_87_4、SNP_103_1.1 在不同體色中各找到三種基因型 (C/C、C/A、A/A；C/C、C/T、T/T)，SNP_103_1.2 則只找到兩種基因型 (C/C、A/A)。Color1L 表示以體色計偵測魚體頭部的顏色的明亮度 (L: light) 的數值，數字為測量魚體部位，而數字後的 L/a/b 則分別表示顏色明亮、紅色與黃色數值；deltaE_1_control 則是將體色計所測得魚體頭部的 L/a/b 標準化後加總的數值，數字為測量魚體部位。在測量魚體尾腹段的紅色數值 Color4a，SNP_87_4 基因型間之均值差距最大可差大約 19 個體色單位 (Table 2)，結果顯示 SNP_87_4 可能調控豹鱸體色之單點核苷酸變異位點，日後將會增加其樣品數目與利用基因表現量定量技術進行多重驗證。

Table 1 Three SNPs, putative locations and allele frequencies. Three SNPs were evaluated using the linear mixed model located on candidate QTLs, including SNP_87_4, SNP_103_1.1, and SNP_103_1.2

SNP no.	Putative region in corresponding gene	Allele frequencies
SNP_87_4	Promoter	0.92/0.08
SNP_103_1.1	Promoter	0.85/0.15
SNP_103_1.2	Promoter	0.93/0.07

三、分子標誌對經濟與社會之助益

橫跨澎湖周邊海域發現不同體色之豹鱸地理分布，藉由近代基因體研究方法與線性混合模型來歸納出具有潛能的單點核苷酸變異位點，本研究目前結果找到可能與體色調控相關的單點核苷酸變異位點代號 SNP_87_4，SNP_87_4 為豹鱸體色具有潛力之分子標誌，日後將再針對 SNP_87_4 分子標誌更進一步研究，除了對豹鱸體色能更加了解外，未來可提供於相關產業以分子科技的方式篩選高經濟價值豹鱸，縮短艷紅豹鱸選育時程，進而提升豹鱸養殖技術，方能有效降低捕撈野生型豹鱸的壓力，以維護生態平衡並達到漁業資源永續經營。

Table 2 Three SNPs were significantly associated with the coloration of multiple body positions located on the candidate QTLs. The genotypes of the three SNPs were C/C, C/A, A/A (SNP_87_4), C/C, C/T, T/T (SNP_103_1.1), and C/C, A/A (SNP_103_1.2), respectively. L: light, a: redness, and b: yellow. $\Delta E = [(A-Ac)^2 + (B-Bc)^2 + (L-Lc)^2]^{1/2}$. Ac, Bc, and Lc are the average of the skin color at each measurement site. The high L/a/b values represent light (L), red (a), and yellow (b) colors

Traits	Genotype (no. of fish)								
	SNP_87_4			SNP_103_1.1			SNP_103_1.2		Mean(SD)
	C/C	C/A	A/A	C/C	C/T	T/T	C/C	A/A	
Color1L	29.92 ± 0.86	30.43 ± 1.60	32.16 ± 4.60	28.76 ± 0.91	33.46 ± 1.31	31.33 ± 2.62*	29.89 ± 0.86	34.18 ± 2.47*	30.93(3.99)
Color1a	9.81 ± 0.76	11.78 ± 1.41	21.88 ± 4.04**	9.95 ± 0.88	10.94 ± 1.34	13.73 ± 2.87	10.07 ± 0.77	14.21 ± 2.34*	5.24(5.18)
Color1b	7.10 ± 0.48	6.72 ± 0.89	9.04 ± 2.59	6.39 ± 0.50	9.14 ± 0.75	7.65 ± 1.62*	7.05 ± 0.48	8.83 ± 1.45	6.93(2.70)
Color2a	9.14 ± 0.83	11.0 ± 1.54	22.15 ± 4.41*	9.55 ± 0.97	9.85 ± 1.47	13.62 ± 3.16	9.51 ± 0.85	13.29 ± 2.59	4.09(5.68)
Color2b	7.66 ± 0.38	7.96 ± 0.69	11.32 ± 2.02	7.63 ± 0.47	8.33 ± 0.71	9.39 ± 1.54	7.69 ± 0.41	10.52 ± 1.24**	7.69(2.19)
Color3a	16.70 ± 1.09	18.22 ± 2.01	35.57 ± 5.81*	17.12 ± 1.33	17.74 ± 2.02	20.71 ± 4.32	17.25 ± 1.18	19.63 ± 3.56	6.37(8.47)
Color4a	13.33 ± 0.90	14.90 ± 1.67	32.66 ± 4.82**	14.02 ± 1.12	13.87 ± 1.70	16.60 ± 3.64	13.88 ± 0.99	16.75 ± 2.99	5.61(7.39)
Color5L	29.89 ± 0.81	27.24 ± 1.50	41.81 ± 4.34*	29.51 ± 0.98	30.7 ± 1.47	30.95 ± 3.06	29.73 ± 0.88	32.72 ± 2.49	28.55(4.35)
Color5b	6.58 ± 0.41	5.61 ± 0.74	14.11 ± 2.17**	6.54 ± 0.48	7.22 ± 0.73	7.22 ± 1.57	6.70 ± 0.43	7.44 ± 1.30	5.30(2.56)
deltaE_1_control	8.27 ± 0.53	7.87 ± 0.98	15.84 ± 2.83	7.45 ± 0.61	10.21 ± 0.72	9.79 ± 1.40***	8.27 ± 0.59	10.99 ± 1.60*	6.24(3.28)
deltaE_3_control	13.84 ± 0.80	15.77 ± 1.48	30.53 ± 4.24***	13.87 ± 0.96	16.16 ± 1.45	18.05 ± 3.11	14.50 ± 0.87	16.52 ± 2.64	9.07(5.57)
deltaE_4_control	10.98 ± 0.63	10.42 ± 1.16	27.67 ± 3.35***	11.10 ± 0.86	11.81 ± 1.29	15.24 ± 2.70	11.18 ± 0.76	14.85 ± 2.25	7.68(5.22)
deltaE_5_control	9.6 ± 0.65	9.49 ± 1.21	21.53 ± 3.48*	9.56 ± 0.80	10.53 ± 1.18	11.88 ± 2.41	9.73 ± 0.71	12.58 ± 2.04	6.34(4.33)

Values in bold represent those that are significant

*Overall SNP $P < 0.1$; **Overall SNP $P < 0.05$; ***Overall SNP $P < 0.01$

謝 辭

本研究感謝行政院農業委員會科技計畫編號：109 農科-1.1.5-科-aO 在研究經費上的支持。

參考文獻

- 邵廣昭 (2020) 臺灣魚類資料庫. 取自：
<http://fishdb.sinica.edu.tw>
- 許鐘綱, 陳文展, 蘇懿忠, 林金榮 (2014) 豹鱸完全養殖成功. 行政院農業委員會水產試驗所電子報, 第99期.
- 許鐘綱 (2011) 第五章：豹鱸種苗生產技術. 2010石斑魚精緻養殖研討會論文集, 水產試驗所特刊第12號, 35-42.
- Abe, G., S. H. Lee, M. Chang, S. C. Liu, H. Y. Tsai and K. G. Ota (2014) The origin of the bifurcated axial skeletal system in the twin-tail goldfish. *Nat. Commun.*, 5: 1-7.
- Adams, S. (2003) Morphological ontogeny of the gonad of three plectropomid species through sex differentiation and transition. *J. Fish Biol.*, 63: 22-36.
- Austin, C. M., M. H. Tan, K. A. Harrison, Y. P. Lee, L. J. Croft, P. Sunnucks, A. Pavlova and H. M. Gan (2017) De novo genome assembly and annotation of Australia's largest freshwater fish, the Murray cod (*Maccullochella peelii*), from Illumina and Nanopore sequencing read. *Gigascience*, 6: 1-6.
- Cai, X., M. Qu, S. Ding, H. Wang, H. Wang, L. Hu and Y. Su (2013) Differentiation of coral trout (*Plectropomus leopardus*) based on an analysis of morphology and complete mitochondrial DNA: Are cryptic species present?. *Acta Oceanol. Sin.*, 32: 40-46.
- Choat, J. H. and M. Samoilys (2018) *Plectropomus leopardus*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2018: e.T44684A100462709.
- 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: 1485-1487.
- Eze, F. (2019) Marker-assisted selection in fish: a review. *Asian J. Fish. Aquat. Res.*, 3: 1-11.
- Fabinyi, M. (2012) Historical, cultural and social perspectives on luxury seafood consumption in

- China. Environ. Conserv., 39: 83-92.
- Ferreira, B. P. (1995) Reproduction of the common coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae: Epinephelinae) from the central and northern Great Barrier Reef, Australia. Bull. Mar. Sci., 56: 653-669.
- Ge, H., K. Lin, M. Shen, S. Wu, Y. Wang, Z. Zhang, Z. Wang, Y. Zhang, Z. Huang, C. Zhou, Q. Lin, J. Wu, L. Liu, J. Hu, Z. Huang and L. Zheng (2019) De novo assembly of a chromosome-level reference genome of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) using nanopore sequencing and Hi-C. Mol. Ecol. Resour., 19: 1461-1469.
- Van Herwerden, L., J. Howard Choat, S. J. Newman, M. Leray and G. Hillersøy (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: 1595-1607.
- Hsu, T. H., Y. T. Chiu, H. T. Lee, H. Y. Gong and C. W. Huang (2021) Development of EST-molecular markers from RNA sequencing for genetic management and identification of growth traits in potato grouper (*Epinephelus tukula*). Biology, 10: 36.
- Kelsh, R. N. (2004) Genetics and evolution of pigment patterns in fish. Pigment Cell Res., 17: 326-336.
- Kingsford, M. J. (1992) Spatial and temporal variation in predation on reef fishes by coral trout (*Plectropomus leopardus*, Serranidae). Coral Reefs, 11: 193-198.
- Kusumawati, D. and K. M. Setiawati (2017) The use of carotene materials as the source of red color pigmentation on leopard grouper larvae (*Plectropomus leopardus*). Aquac. Indones., 17: 35-45.
- Lerebours, A., E. C. Chapman, M. J. Sweet, M. R. Heupel and J. M. Rotchell (2016) Molecular changes in skin pigmented lesions of the coral trout *Plectropomus leopardus*. Mar. Environ. Res., 120: 130-135.
- Ma, K. Y., L. van Herwerden, S. J. Newman, M. L. Berumen, J. Howard 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: 1-15.
- Madsen, P. and J. Jensen (2013) A user's guide to DMU. A package for analysing multivariate mixed models. Version 6, release 5.2. Cent. Quant. Genet. Genomics, Dept. Mol. Biol. Genet. Univ. Aarhus, Res. Cent. Foulum, Box, 50, 8830.
- Maoka, T., W. Sato, H. Nagai and T. Takahashi (2017) Carotenoids of red, brown, and black specimens of *Plectropomus leopardus*, the coral trout (Suziara in Japanese). J. Oleo Sci., 66: 579-584.
- 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. Bio. Ecol., 406: 71-78.
- Melianawati, R., N. W. W. Astuti and K. Suwirya (2013) The use of copepods to improve juveniles production of coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepède, 1802). Middle East J. Sci. Res., 16: 237-244.
- Nguinkal, J.A., R. M. Brunner, M. Verleih, A. Rebl, L. de losRíos-Pérez, N. Schäfer, F. Hadlich, M. Stüeken, D. Wittenburg and T. Goldammer (2019) The first highly contiguous genome assembly of pikeperch (*Sander lucioperca*), an emerging aquaculture species in Europe. Genes, 10: 1-14.
- Padilla, J. E., S. Mamauag, G. Braganza, N. Brucal, D. Yu and A. Morales (2003) Sustainability assessment of the live reef-fish for food industry in Palawan, Philippines. Philippines: WWF.
- Rimmer, M. A. and B. Glamuzina (2019) A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. Rev. Aquac., 11: 58-87.
- Tsai, H. Y., A. Hamilton, D. R. Guy and R. D. Houston (2014) Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) gene are associated with growth-related traits in farmed Atlantic salmon. Anim. Genet., 45: 709-715.
- Wang, L., C. Yu, L. Guo, H. Lin and Z. Meng. (2015) In silico comparative transcriptome analysis of two color morphs of the common coral trout (*Plectropomus leopardus*). PLoS One, 10: 1-15.
- Wang, Y., Y. Lu, Y. Zhang, Z. Ning, Y. Li, Q. Zhao, H. Lu, R. Huang, X. Xia, Q. Feng, X. Liang, K. Liu, L. Zhang, T. Lu, T. Huang, D. Fan, Q. Weng, C. Zhu, Y. Lu, W. Li, Z. Wen, C. Zhou, Q. Tian, X. Kang, M. Shi, W. Zhang, S. Jang, F. Du, S. He, L. Liao, Y. Li, B. Gui, H. He, Z. Ning, C. Yang, L. He, L. Luo, R. Yang, Q. Luo, X. Liu, S. Li, W. Huang, L. Xiao, H. Lin, B. Han and Z. Zhu (2015) The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. Nat. Genet., 47: 625-631.
- Yang, X., H. Liu, Z. Ma, Y. Zou, M. Zou, Y. Mao, X. Li, H. Wang, T. Chen, W. Wang and R. Yang (2019)

- Chromosome - level genome assembly of *Triplophysa tibetana*, a fish adapted to the harsh high-altitude environment of the Tibetan Plateau. *Mol. Ecol. Resour.*, 19: 1027-1036.
- Yang, Y., L. N. Wu, J. F. Chen, X. Wu, J. H. Xia, Z. N. Meng, X. C. Liu and H. R. Lin (2020) Whole-genome sequencing of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) and exploration of regulation mechanism of skin color and adaptive evolution. *Zool. Res.*, 41: 328-340.
- Yin, X. (2014) Sustainability of coral trout (*Plectropomus leopardus*) fisheries in the Philippines and Indonesia. *Aquat. Sci.*, 57.
- Zeller, D. C. (1997) Home range and activity patterns of the coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 154: 65-77.
- Zhang, J., H. 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.

Association Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms and Red Skin Coloration in Penghu Leopard Coral Grouper (*Plectropomus leopardus*)

Hung-Yi Wu¹, Kao-Sung Chen², You-Syu Huang³, Min-Rui Wang⁴, Hernyi Justin Hsieh⁴
and Hsin-Yuan Tsai^{1*}

¹Department of Marine Biotechnology and Resources, National Sun Yat-sen University

²Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

³Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

⁴Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) is one of the most economically important species of grouper in Asia, particularly the wide-type individuals with a bright red color that are typically found in tropical and subtropical coral reef habitats. Improvements in fishing technology and increasing market demand have resulted in a rapid decline in the population of wild-type leopard coral groupers. To maintain this population of groupers, an artificial propagation technique has been successfully developed by the Fisheries Research Institute. However, the skin of these fish often lacks the bright red coloration, which does not meet the needs of the market enough to alleviate overfishing. The mechanisms underlying the coloration of the leopard coral grouper remain unknown. This study collected 2,916 related data from wild-type leopard coral groupers with different skin colors across ten Penghu sea areas, and their deposited their genomic DNA for further examination. The data showed that the body length of the bright red individuals was significantly larger than that of the brown and red-brown individuals. Contemporary genomics methods and linear mixed model analysis were utilized, and the results showed three single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with color-associated quantitative trait loci (QTLs). SNP_87_4 was significantly associated with the coloration of multiple body positions in leopard coral groupers. In conclusion, this study may help select the redness color leopard coral grouper for brood stock, and consequently to satisfy market demand for bright red individuals. Thus, overfishing of the wide-type individuals would decrease, and a balance between fishing and conservation would be maintained.

Key words: Coral trout (*Plectropomus leopardus*), skin coloration, SNP, QTL

*Correspondence: No. 70 Lien Hai Road, Kaohsiung 804, Taiwan. TEL: (07)5252000 ext. 5031, E-mail: hyt@mail.nsysu.edu.tw