

海洋國家公園管理處 110 年度補(捐)助研究生進行專題研究計畫

澎湖南方四島周邊海域關鍵種豹鰨 族群分布與體色變異調查

海洋國家公園管理處成果報告

中華民國 110 年 12 月

(本報告內容及建議，不代表本機關意見)

澎湖南方四島周邊海域關鍵種豹鰨 族群分布與體色變異調查

研究人員：吳虹儀

指導教授：蔡欣原 助理教授

海洋國家公園管理處成果報告

中華民國 110 年 12 月

(本報告內容及建議，不代表本機關意見)

目次

| | |
|--------------------------|-----|
| 表次 | IV |
| 圖次 | V |
| 中文摘要 | VI |
| 英文摘要 | VII |
| 第一章 緒論 | |
| 第一節、前言 | 1 |
| 第二章 研究過程與方法 | |
| 第一節、樣本採集 | 3 |
| 第二節、DNA 與 RNA 之萃取 | 3 |
| 第三節、RNA 反轉錄成 cDNA | 4 |
| 第四節、cDNA 建庫與定序技術 | 5 |
| 第五節、序列組裝 | 5 |
| 第六節、差異基因表現 | 6 |
| 第七節、即時定量聚合酶鏈鎖反應儀分析 | 6 |
| 第八節、生物統計 | 6 |
| 第三章 結果 | 7 |
| 第四章 討論 | 9 |
| 第五章 結論與建議 | 12 |

| | |
|------------|----|
| 參考書目 | 21 |
|------------|----|

表次

| | |
|----------|----|
| 表一 | 17 |
| 表二 | 18 |
| 表三 | 19 |
| 表四 | 20 |

圖次

| | |
|----------|----|
| 圖一 | 13 |
| 圖二 | 14 |
| 圖三 | 15 |
| 圖四 | 16 |

中文摘要

豹鱈 (*Plectropomus leopardus*)，分布於熱帶及亞熱帶地區的珊瑚礁海域，為亞洲地區高經濟性魚種之一。隨著漁撈技術增進，野生型豹鱈資源銳減，而豹鱈位處於食物鏈頂端之關鍵物種，當其族群量下降則會影響此海域之生物多樣性。為了維護野生型豹鱈數量，目前我國已由澎湖海洋生物中心建立豹鱈完全養殖技術，但養殖後的豹鱈體色常為灰褐色，其市場價格不佳，無法降低捕捉野生型豹鱈的需求，據先前本實驗室研究成果顯示豹鱈地理分布橫跨澎湖十個海域，卻無澎湖南方四島豹鱈族群分布情形基礎調查資料，故藉本次研究調查豹鱈於澎湖南方四島地理與體色分布，同時透過轉錄組分析探討其調控特殊體色具潛力之數量性狀基因座。結果顯示在西嶼坪嶼、東嶼坪嶼與西吉嶼周邊海域皆發現不同體色之豹鱈分布，並透過轉錄組分析挑選 8 個可能與體色相關之數量性狀基因座，後續以即時定量聚合酶鏈鎖反應來確定不同體色間數量性狀基因座之表現量。本研究透過澎湖南方四島豹鱈生物學與體色相關之研究，希冀提升豹鱈養殖技術並降低過漁現象，達成豹鱈漁業資源永續發展之目標。

英文摘要

Leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) mainly inhabits tropical and subtropical water of coral reef, and it is one of the most important economic groupers in Asian countries. With the improvement of fishing technology, the population of wild-type leopard coral grouper is rapidly declining. Leopard coral grouper is a carnivorous species and a vital fish in the coral reef ecosystem. To maintain their population, the artificial propagation technique of leopard coral grouper has been successfully developed by Fisheries Research Institute. However, the skin color is often lack of bright redness; as such, the market price is lower than wild-type individuals with bright-red color. The previous results showed the distribution of leopard coral groupers with different skin colors across ten Penghu sea areas, but it is still lack of the data around South Penghu Marine National Park. In this study, we investigated the distribution of leopard coral groupers around South Penghu Marine National Park, and explored color-associated quantitative trait loci (QTLs) by using transcriptome analysis. The results showed that there were leopard coral groupers observed with different colors in Xiyupingyu, Donyupingyu, and Xijiyu. We selected eight potentially color-associated QTLs and validated RNA-Seq data using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In conclusion, these findings provided basic biology and useful genetic information for maintaining the balance between fishing and conservation of leopard coral groupers in the future.

第一章、緒論

第一節、前言

花斑刺鰓鮨 (*Plectropomus leopardus*)，分類隸屬於鱸形目 (Perciformes)、石斑魚科 (Epinephelidae)、鰓棘鱸屬 (*Plectropomus*)，俗稱豹鱸、紅條、七星斑與東星斑等，在澎湖南方四島周圍海域為常見的經濟型魚種。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，主要棲息於深度範圍 3~100 公尺的礁岩地區，最大體長可達 120 公分 (邵廣昭, 2020)。豹鱸為先雌後雄的雌雄同體，其性別多隨著社會位階而發生變化 (Adams, 2003; Ferreira, 1995)，在生態系統中，豹鱸在許多肉食性珊瑚礁魚中為食物鏈頂端之關鍵物種 (keystone species)，對於海域生態平衡扮演著極重要之角色 (Wright et al., 2008)。豹鱸體色具多態性，據本實驗室先前在澎湖群島十個不同海域，包括大倉、姑婆嶼、將軍嶼、吉貝、龍門港、鳥嶼、沙港、鎖港、西嶼與望安，所收集的野生型豹鱸個體，結果顯示野生型豹鱸體色呈現豔紅、暗紅與灰褐色之多態性 (peers communications)。除澎湖周邊海域外，日本沖繩及中國南海皆發現不同體色之野生型豹鱸 (Maoka et al., 2017; Yang et al., 2020)。

在經濟層面上，豹鱸不論是在台灣、日本琉球群島、香港與中國皆為鮨科魚類中高經濟價值之魚種，而在澎湖魚市場活魚售價每公斤可達 1600 至 1800 元。近年來過度捕撈及漁業活動影響豹鱸群聚產卵，在菲律賓與澳洲野生豹鱸數量明顯下降，雖國際自然保育聯盟紅皮書將豹鱸列為無危物種 (Choat J.H. & Samoily M., 2018)，但仍需建立適當地漁業管理措施減緩過漁壓力。為了維護豹鱸漁業資源的永續發展，我國政府積極推動豹鱸人工繁殖試驗，在 2014 年豹鱸養殖技術雖已成功完全養殖，但相較於其他經濟魚種，豹鱸養殖存活率低且成長緩慢 (許鐘鋼, 2011)，且經人工環境飼養後的豹鱸無法如野生型體色般豔紅，大多呈現灰褐色、暗紅或粉紅色。過去研究魚體體色發現可能與飲食、外在壓力、環境或基因相關 (Henning et al., 2013; Kusumawati & Setiawati, 2017; McLean, 2021; Yang et

al., 2020; Zhang et al., 2017), 在養殖業技術中, 魚體體色增豔大多透過飼料添加或養殖環境管理 (Kusumawati & Setiawati, 2017; Melianawati et al., 2013), 以此提高其市場價格, 目前已成功研發促進豹鱠體色增豔之飼料, 但同時會增加豹鱣養殖之成本, 若是解析體色調控相關之數量性狀基因座 (quantitative trait loci, QTL), 不但能提升我國豹鱣的產業競爭力, 更能進一步增加我國對於石斑屬豹鱣基因體的研究深度。

我國對於澎湖南方四島海域之野生型豹鱣之基礎生物學研究, 例如體色變異與地理分布, 甚至基因體與遺傳相關研究仍未有任何研究調查。目前豹鱣基因體文獻多半來自中國研究團隊, 且中國研究團隊在 2020 年已完成豹鱣全基因體定序 (Yang et al., 2020)。相較於中國大陸, 雖我國 2014 年已由澎湖海洋生物中心建立豹鱣完全養殖技術 (許鐘鋼等, 2014), 領先亞洲各國, 但我國對於澎湖南方四島海域高經濟價值豹鱣生物學調查甚少, 且基因體研究幾乎無文獻可考。澎湖群島鄰近於南中國海域, 若我國能對於澎湖及澎湖南方四島海域高經濟價值魚種廣泛進行基礎生物學研究, 這對我國漁業資源及生態保育將有實質幫助。

本計畫目的 (1) 調查豹鱣於澎湖南方四島周邊海域之體色與地理分布; (2) 透過轉錄體分析挑選與體色調控之潛力的數量性狀基因座。藉此研究厚實我國澎湖南方四島豹鱣基礎漁業資源調查, 同時維護我國漁業資產; 基因層面希冀應用於養殖業以降低野生艷紅個體捕撈之漁獲壓力, 達到豹鱣漁業資源永續經營與保育目標。

第二章、研究方法及過程

第一節、樣本採集

收集澎湖南方四島海域不同體色之豹繪

本計畫委託澎湖當地漁販在澎湖南方四島周圍海域捕撈紅色體色及灰褐色體色野生型豹繪，並測量與記錄豹繪相關數據（捕獲地點、體重、體長等資料）。取其肌肉組織以 95%酒精保存於-20°C，後續將抽取 DNA 萃取；另外，剪取兩塊五十元大小的魚皮並用磷酸鹽緩衝生理鹽水（phosphate-buffered saline, PBS）潤洗後浸泡在 RNA Keeper (Protech, Taiwan) 存放於-20°C，以利後續萃取其 RNA。

第二節、DNA 與 RNA 之萃取

DNA 遺傳物質萃取保存

依照 gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) 的操作步驟萃取 DNA。取 0.02-0.03 公克肌肉組織放入 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 乾浴槽反應至隔天。隔天將微量離心管 14,000-16,000 xg 離心，抽取其上清液後加入 200 μ L GSB buffer 以及 200 μ L 99.9%酒精搖晃均勻。並將此混和液體收集 DNA 至 GS column，離心並倒掉管內廢液。接著以 wash buffer 沖洗 GS column 再以 14-16,000 xg 離心並倒掉管內廢液，此步驟重複兩次，以 14,000-16,000 xg 離心將殘餘的液體去除。最後加入 45 μ L EB Buffer 回溶 GS column 上的 DNA，以 DS-11 微量分光光度計 (DeNovix, USA) 測定 DNA 的 A260/A230 與 A260/A280 之比值與濃度 (ng/ μ L)，保存於-20°C 冰箱。

RNA 遺傳物質萃取保存

取 0.1g 保存於 RNA Keeper 之魚皮至 2mL 微量離心管含 10 顆磁珠，並加入 1mL TRIzol™ 試劑 (Invitrogen, USA) 以 Prep-CB6 生物樣本均質儀設定線速度為 4350rpm 持續 5 秒、5 個循環，且重複 5-10 次將魚皮打碎，為了去掉磁珠

與多餘的組織，於 4°C 以 7500 xg 離心 1 分鐘後取上清液至新的 1.5mL 微量離心管中，加入 200 μ L 1-Bromo-3-chloropropane (Sigma-Aldrich, USA) 以手劇烈搖晃 15 秒使其混合均勻，靜置 2~3 分鐘後於 4°C 以 12000 xg 離心 15 分鐘後，取大約 400 μ L 上清液至新的 1.5mL 微量離心管，接著加入 400 μ L Isopropanol (Merck, Germany) 輕晃至混合均勻，靜置 10 分鐘，於 4 °C 以 7500 xg 離心 10 分鐘，移除上清液並保留底部 RNA 團塊，加入 1 mL 75%酒精，在 4 °C 以 7500 xg 離心 5 分鐘，上述步驟重複兩次，並風乾 RNA 團塊呈半透明，最後加入 20-50 μ L RNase-free water 在 55°C 乾浴槽下回溶 RNA，以 1%瓊脂糖凝膠電泳確認 RNA 完整性並利用 DS-11 微量分光光度計 (DeNovix, USA) 測定 RNA 的 A260/A230 與 A260/A280 之比值與濃度 (ng/ μ L)，保存 RNA 於-80 °C 冰箱。

第三節、RNA 反轉錄成 cDNA

RNA 純化與 cDNA 合成

以試劑套組 SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen, USA) 提供之方法將 RNA 反轉錄成 cDNA，製備 Anneal primer to template RNA，取 2 μ g 純化後的 RNA 至 0.2m 離心管中，再分別加入 1 μ L 50 μ M random hexamers (Invitrogen, USA) 及 1 μ L 2.5 mM dNTP mix，再以 Nuclease-free water 補至 13 μ L，加熱至 65°C，5 分鐘。準備 RT reaction mix 至 0.2m 離心管中，包含有 4 μ L 5 \times SSIV Buffer、1 μ L 100 mM DTT、1.5 μ L Nuclease-free water、0.5 μ L SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L)，混合均勻後將 7 μ L RT reaction mix 取至 annealed RNA 中，放入聚合酶鏈鎖反應儀，反應條件 (1) 引子：23°C，10 分鐘；(2) 活化反轉錄酵素：55°C，10 分鐘；(3) 去活化反轉錄酵素之活性：80°C，10 分鐘。最後將 cDNA 保存於-20°C。

第四節、cDNA 建庫與定序技術

試劑套組 Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina, USA)，total RNA 以攜帶磁珠的 oligo-dT 純化出 poly A mRNA，再將純化後的 mRNA 序列隨機片段化後，利用隨機引子 (random hexamers) 與反轉錄酶 (SuperScript II Reverse Transcriptase) 以小片段 mRNA 序列當成模板合成第一股 cDNA (First-strand cDNA)，接著合成第二股 cDNA (second-strand cDNA)，最後在兩股進行末端修復 (end repair) 加上腺苷酸 (adenosine)，藉由尾端的腺苷酸來接合轉接子 (indexed adapters)。定序使用 Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) 定序平台，並以 150 bp paired-end reads (PE reads) 的定序方式來讀取片段兩端的序列。利用 cDNA 上的轉接子雜合至定序晶片 (flow cell)，透過橋式連接聚合酶連鎖反應 (bridge PCR) 放大 cDNA 產物的數量，四種去氧核糖核酸 (dNTP) 被標記特定螢光，則結合上此序列的鹼基會被雷射激發後產生螢光訊號被偵測，進行鹼基判定並反覆偵測，得到大量的轉錄體定序資料，cDNA 建庫與定序服務委託基龍米克斯生物科技 (Taipei, Taiwan)。

第五節、序列組裝

原始定序數據利用 Trimmomatic (Bolger et al., 2014) 去除低品質的 reads 及轉接子序列 (adaptor) 得到 clean reads，接著透過 Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 來確認序列品質，並計算出 Q20、Q30 與 GC 含量。將 clean reads 以 Trinity (Haas et al., 2013) 組裝成較長片段的轉錄本，但此組裝仍含有重複的轉錄本，需要經由 CD-HIT-EST (Fu et al., 2012) 來去除多餘性的轉錄本 (redundant transcripts)，將單一基因 (unigenes) 的組裝轉錄本做為後續分析的參考轉錄本。

第六節、差異基因表現

差異基因表現量分析使用 Bowtie2 (Langmead &Salzberg, 2012), 將 clean reads 比對參考轉錄本, 利用軟體 RSEM (Li &Dewey, 2011) 得到每個轉錄本所讀到的次數 (read count), 以軟體 edgeR 中的 trimmed mean of M-values (TMM) 方法將 read count 標準化後, 差異基因表現量分析使用 edgeR (Robinson et al., 2009), 並經錯誤發現率 (false discovery rate, FDR) 方法校正 p-values。根據 Huang et al. (2021) 以 $|\log_2 \text{fold change}|$ 與錯誤發現率篩選出具有顯著差異的數量性狀基因座 (Huang et al., 2021), 後續將以此基準挑選數量性狀基因座並測定其相對表現量。

第七節、即時定量聚合酶鏈鎖反應儀分析

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) 測定相對數量性狀基因座表現量

稀釋反轉錄完的 cDNA (100ng/ μ L) 至 10 ng/ μ L, 接續以試劑套組 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 取 4 μ L cDNA, 再加入 5 μ L PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X), 以及 1 μ L 引子, 反應總體積為 10 μ L, 並混合均勻將樣品注入至 96 well PCR plate。放入 QuantStudio 3 即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Thermo Fisher Scientific, USA) 來偵測 cDNA 間相對數量性狀基因座定量分析, 反應條件如表一。利用 NCBI-blast 設計相對應的引子 (Primer-F、Primer-R) (表二), 相對定量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 分析並以 β -actin 作為內控基因標準化數量性狀基因座之表現量。

第八節、生物統計

不同體色的體長與體重之資料透過軟體 R 語言中的單因子變異數分析 (one way ANOVA), 分析於不同體色豹繪之體長與體重是否有顯著差異, 事後比較檢定以杜凱確實差異檢定 (Tukey's Honestly Significant Difference Test, Tukey's HSD)。

第三章、結果

澎湖南方四島豹繪分布

本試驗將研究擴及澎湖南方四島海域，對於澎湖南方四島海域關鍵物種豹繪進行地理與體色分布研究調查。西嶼坪嶼、東嶼坪嶼與西吉嶼周邊海域皆有發現豹繪足跡，但東吉嶼周邊海域目前無豹繪分布，總共收集到 9 尾豹繪，5 尾紅色個體、2 尾紅褐色個體及 2 灰褐色個體，紅色個體數目多於紅褐與灰褐色個體 (圖一)。圖二為本實驗室於澎湖南方四島收集到不同體色豹繪 (紅色與灰褐色)，並記錄其體色、體長與體重，紅色與灰褐色個體平均體長分別為 44 與 46 公分，平均體重分別為 1.3 及 1.4 公斤 (圖三)，以單因子獨立變異數分析 (one way ANOVA)，不同體色間體長與體重皆無顯著差異。將先前研究擴及澎湖南方四島海域，了解當前至澎湖南方四島海域捕獲之豹繪的地理與體色分布。

轉錄體分析

將本實驗室先前在澎湖周邊海域所收集之豹繪利用轉錄組分析得到 130 GB 的 raw reads 及 120 GB 的 clean reads。Reads 平均數量為 73,854,515，平均 GC 比例為 48.16%， $Q \geq 20$ 和 $Q \geq 30$ 皆大於 94%。利用 Trinity 組裝出 14,089 個轉錄子 (transcripts)，再以 CD-HIT-EST 去掉重複性的轉錄子，得到 13,724 個單一基因 (unigenes)，其 N50 長度為 1,419 與平均長度為 1,077。

篩選調控體色潛力數量性狀基因座

透過轉錄組分析挑選紅色與灰褐色間具有顯著差異表現的數量性狀基因座，依據 Huang et al. (2021)之挑選基準(Huang et al., 2021)，篩選出 8 個功能可能與體色調控相關之數量性狀基因座，紅色個體上調控 (up-regulation) 數量性狀基因座有 *epha2b*、*slc7a5*、*stat3*、*tgfb1a* 與 *timp2a* (表五)；紅色個體下調控 (down-regulation) 數量性狀基因座有 *mpx*、*kdf1a* 與 *aldoaa* (表六)，並以即時定量聚合酶鏈鎖反應做後續確認。

以即時定量聚合酶鏈鎖反應確認 RNA-Seq 結果

為了確認轉錄組分析之結果，我們挑選了 8 個差異表現的數量性狀基因座，並利用即時定量聚合酶鏈鎖反應分析，結果顯示 *epha2b*、*slc7a5*、*stat3*、*tgfb1a* 與 *timp2a* 的 qPCR 與 RNA-Seq 之 \log_2 Fold change 平均值皆大於 1；*mpx*、*kdf1a* 與 *aldoaa* 的 qPCR 與 RNA-Seq 之 \log_2 Fold change 平均值皆小於 -1 (圖四)，qPCR 與 RNA-Seq 之 \log_2 Fold change 結果皆一致上升或下降。

第四章、討論

澎湖南方四島周邊海域捕獲豹鱈

為了收集澎湖南方四島周邊海域之豹鱈，先是詢問澎湖南方四島的磯釣人員，然而磯釣人員口述說“因豹鱈棲息於較深海的珊瑚礁地區，島邊釣到豹鱈機率非常低”，並提供我們在澎湖周邊海域作業的店商。故本實驗室同時詢問澎湖海鮮店商、休閒漁業船、民宿人員與當地居民和漁民是否願意協助或捕撈豹鱈，但因我們所需要的數量少以致價格偏高，最後只有澎湖海功商號以常規價格出售新鮮豹鱈且在符合規定的海域下進行捕撈。澎湖海功商號人員協助本實驗室收集不同體色之野生型豹鱈，並記錄魚體採集地點、體長與體重。本計畫於澎湖南方四島的西嶼坪嶼、東嶼坪嶼與西吉嶼周邊海域收集到 9 尾不同體色之豹鱈，因漁船無至東吉嶼捕撈漁獲，所以在東吉嶼於本研究中未收集到不同體色豹鱈之相關資訊，此外，先前本實驗室記錄不同體色之體長與體重，發現紅色個體體長與體重皆顯著大於暗紅與灰褐色個體 (peers communications)，但在澎湖南方四島所捕獲到個體之體長與體重於不同體色間並沒有顯著差異，灰褐色平均體重與體長皆大於紅色個體。

成功萃取高品質之 RNA 遺傳物質

將 PBS 與 RNA Keeper 冷藏寄送至澎湖海功商號，請海功商號人員取豹鱈魚皮與肌肉存放於 RNA Keeper 中，再冷凍寄回台灣本島。萃取魚皮之 RNA 以 DS-11 微量分光光度計測定 RNA 濃度 (ng/μL) 與品質，RNA 濃度皆大於 400 ng/μL 且 A260/A280 與 A260/A230 之比值皆大於 1.8，同時利用 1% 瓊脂糖凝膠進行電泳分析確認 RNA 完整性，在膠圖中能清楚看到 28S 與 18S 的產物，本試驗成功萃取出高品質之 RNA。

紅色體色生成相關數量性狀基因座

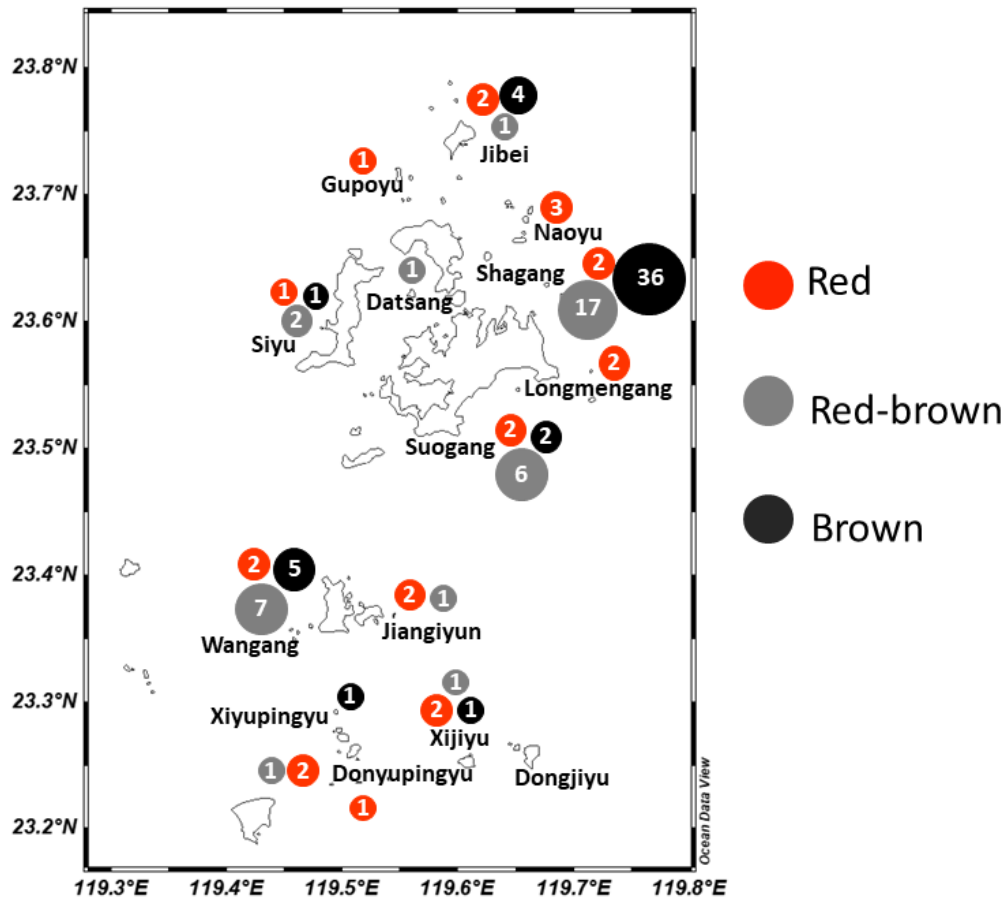
許多文獻指出 SLC (Solute Carrier) 家族中的 *slc3a2b* 與 *slc7a11* 可促進棕黑色素 (pheomelanin) 合成，使魚體顏色呈現紅色 (Xu et al., 2014; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2016)，在我們結果中則是發現 *slc7a5* 在紅色個體中表現量較高，顯示 *slc7a5* 可能參與棕黑色素合成。近年來，cAMP (cyclic adenosine monophosphate)、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 和 Wnt (wingless-type MMTV in integration site) 被認為是影響魚體色相關的路徑 (Henning et al., 2013; Jiang et al., 2014; Wang et al., 2014)，*epha2* 為酪氨酸激酶 (tyrosine kinase)，在人類水晶體上皮細胞 (human lens epithelial, HLE) 中會去抑制 MAPK 與 AKT 路徑 (Ma et al., 2017)，我們推測在豹鱈中 *epha2* 可能會抑制 MAPK 路徑使下游 *MITF* 無法活化，進而影響黑色素生成，使魚體體色呈現偏紅色。除了影響棕黑色素或黑色素之合成路徑外，魚體呈紅色也與類胡蘿蔔素運送有關，類胡蘿蔔素包含蝦紅素 (astaxanthin)、胡蘿蔔二醇 (tunaxanthin)、 α - 隱黃質 (α - cryptoxanthin) 和金盞花紅素 (adonirubin)，這些分子會直接影響豹鱈體色，尤其是蝦紅素會使豹鱈體色增豔 (Maoka et al., 2017; Yang et al., 2020)。

灰褐色體色生成相關數量性狀基因座

色素細胞 (chromatophores) 由胚胎中神經脊發育而來，於兩棲動物、魚類、爬行動物、甲殼動物、頭足綱動物之皮膚與眼睛所呈現色彩，大部分常見細胞類型可分為黃色素細胞 (xanthophore)、紅色素細胞 (erythrophore)、黑色素細胞 (melanophore)、白色素細胞 (leucophores) 與彩虹色素細胞 (iridophore)。aldoaa 於斑馬魚早期發育中，發現會影響神經元軸突之路徑 (axon tract) 的發育，則可能去調控色素細胞形成進而影響體色生成之色彩 (Blaker-Lee et al., 2012)。在哺乳類發現角質細胞除了調控細胞增生外，甚至能促進皮膚的黑色素形成 (Domingues et al., 2020; Hirobe, 2014)，*kdf1a* 為角質細胞分化因子，在斑馬魚模式物種資料庫 (zebrafish model organism database, ZFIN) 預測 *kdf1a* 參與上游或內部之角質細胞分化與發育，本研究發現灰褐色豹繪中 *kdf1a* 表現量較高，有機會調控豹繪黑色素之形成。

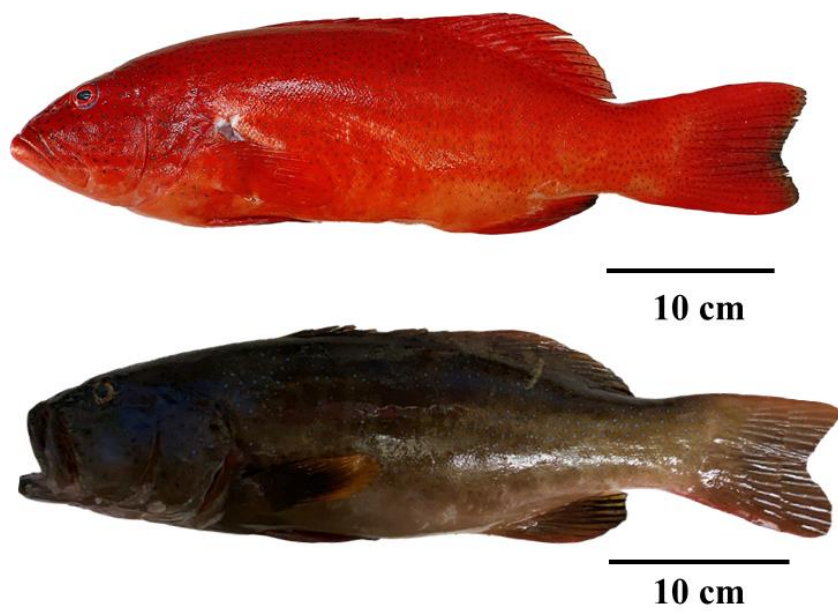
第五章、結論與建議

豹繪是珊瑚礁海域食物鏈頂端之關鍵物種，影響此海域生物族群結構。隨著豹繪市場需求量增加，野生型豹繪數量隨之降低，為了減緩過漁現象，本研究藉由尋找豹繪調控艷紅體色之數量性狀基因座，可協助我國豹繪養殖之發展。本研究於澎湖南方四島收集到不同體色之豹繪，歸納出澎湖周邊海域豹繪之地理與體色分布，並以轉錄體定序分析不同體色之豹繪的相關數量性狀基因座，從中挑選出 8 個可能調控體色之具潛力數量性狀基因座，但結果仍需經多方驗證。



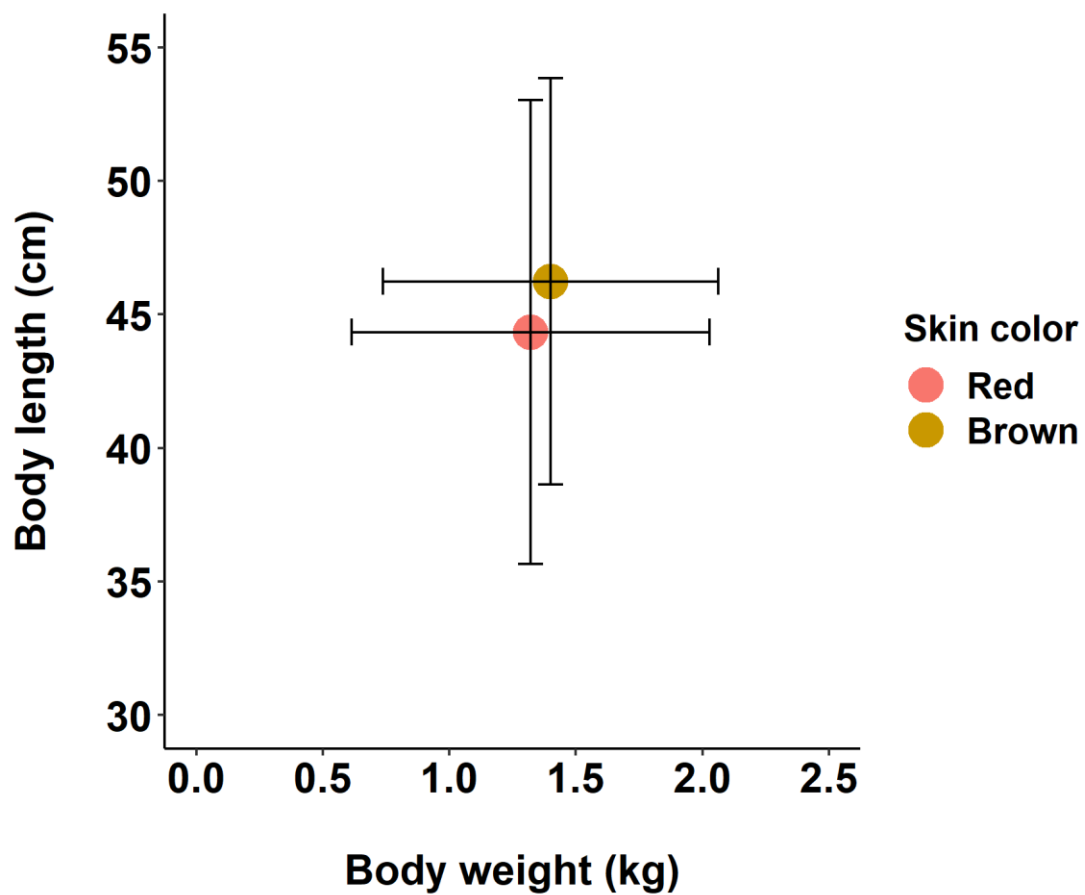
圖一、澎湖海域豹繪體色分布

過去一年本實驗室於澎湖周邊海域已收集 100 隻不同體色之野生型豹繪，並加上澎湖南方四島海域所捕獲的 9 隻個體。圖中黑點為偏褐色豹繪；灰點為偏暗紅色豹繪；紅點為偏亮紅色豹繪，其數字為收集數量。



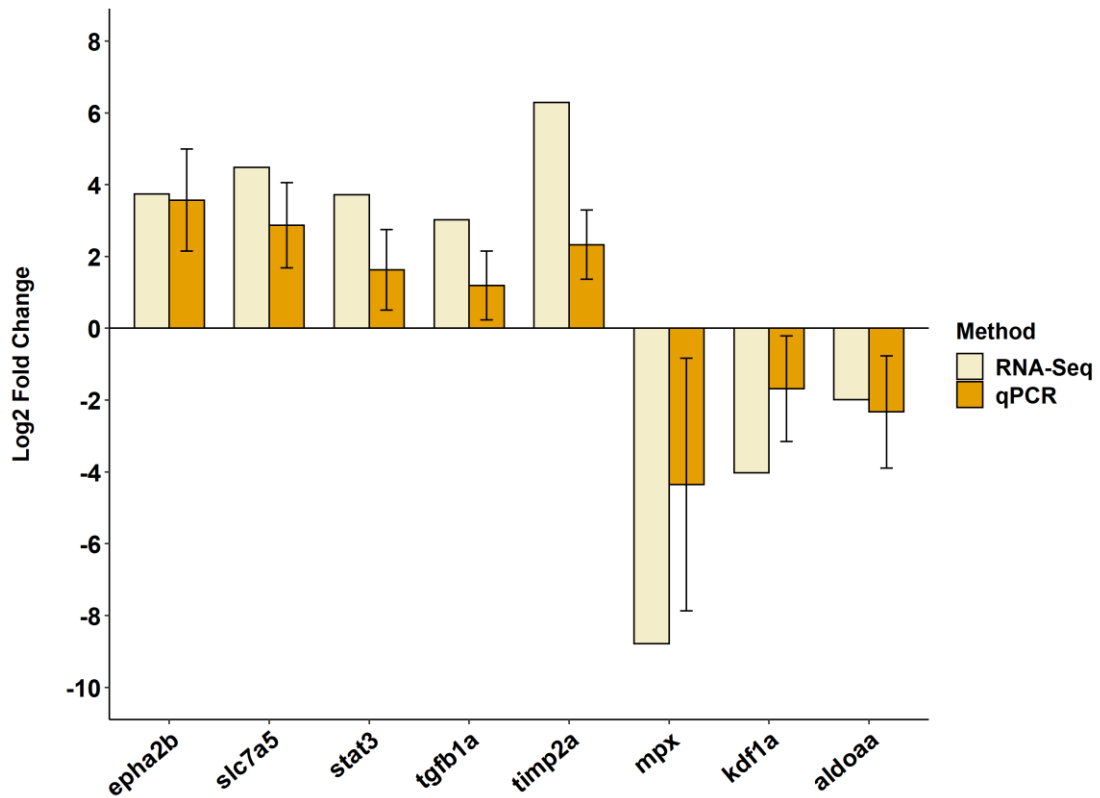
圖二、紅色與灰褐色野生型豹繪

澎湖南方四島收集之不同體色豹繪，顏色分別為紅色與灰褐色。直線比例尺：10公分。



圖三、紅色與黑褐色之體長與體重

豹繪區分為紅色與灰褐色並記錄其體長與體重，縱軸為體長(公分)，橫軸為體重(公斤)，誤差線為平均值 \pm SD。



圖四、比較 RNA-Seq 與 qPCR 之上與下調控差異數量性狀基因座

RNA-Seq 與 qPCR 數值為紅色組別 (treatment) 與灰褐色組別 (control) 之相對表現量 (Log₂ Fold Change), 結果顯示兩者結果一致上升或下降。縱軸為 Log₂ Fold Change, 橫軸為 5 個上調控與 3 個下調控之數量性狀基因座, 誤差線為平均值 ± SD。

表一、即時定量聚合酶鏈鎖反應儀反應條件

| Step | Temperature | Duration | Cycles |
|---------------------------|-------------|----------|--------|
| UDG activation | 50°C | 2 min | Hold |
| Dual-Lock™ DNA polymerase | 95°C | 2 min | Hold |
| Denature | 95°C | 15 s | 40 |
| Anneal | 60°C | 15 s | |
| Extend | 72°C | 1 min | |
| Melting curve | 95°C | 15 s | 1 |
| | 60°C | 1 min | |
| | 95°C | 15 s | |

表二、即時定量聚合酶鏈鎖反應分析所使用的引子

| Gene | Primer name | Sequence (5'-3') | Amplicon size (bp) |
|----------------|-------------|---------------------------|--------------------|
| <i>β-actin</i> | β-actin-F | TACGAGCTGCCTGACGGACA | 240 bp |
| | β-actin-R | GGCTGTGATCTCCTTCTGCA | |
| <i>epha2b</i> | epha2b-F | GATGGACACGCGTGGATCAAA | 106 bp |
| | epha2b-R | CTCCAAACGACCTCGCTTCA | |
| <i>slc7a5</i> | slc7a5-F | AAGCCGATCGCACACTCCTT | 109 bp |
| | slc7a5-R | AGCGACCGATCAAGGTGAATA | |
| <i>stat3</i> | stat3_1F | AATGGTCAGGCCTCTCTTGGT | 121 bp |
| | stat3_1R | GCTGACAAATCACCCAAAGAATGTA | |
| <i>tgfb1a</i> | tgfb1a_1F | AGTGGATACATAAGCCGACTGG | 102 bp |
| | tgfb1a_1R | ACAGGGCCAAAATCTGAGAATA | |
| <i>timp2a</i> | timp2a-F | GTGCAGCGGATGATCTTGCAATC | 110 bp |
| | timp2a-R | ATCACACTGTGTCACCTCATTCA | |
| <i>mpx</i> | mpx_1F | CACTGTCCCAGCCTTTAGGG | 116 bp |
| | mpx_1R | CAGCGTCTGTAACAACAAACTCA | |
| <i>aldoaa</i> | aldoaa_1F | GACACTCCTCCTCACACAAGTACA | 106 bp |
| | aldoaa_1R | GACAGGAAAGTGATGCCAGGGA | |
| <i>kdf1a</i> | kdf1a-F | TCATGAGCAGTGACGTTCCA | 73 bp |
| | kdf1a-R | CTCATCTTCCTCGCCAGTTCA | |

表三、上調控 (Up regulation) 之數量性狀基因座於紅色個體

透過轉錄組分析，各挑選出 5 個上調控之數量性狀基因座。

| Up-regulated candidate DEGs associated with skin color in red fish | | | | |
|--|---------------|---------------------|----------|--|
| Gene_ID | Gene symbol | log ₂ FC | FDR | Gene name |
| TRINITY_GG_10025_c0_g1_i1 | <i>epha2b</i> | 3.74 | 1.44E-05 | eph receptor A2 b |
| TRINITY_GG_3481_c1_g1_i1 | <i>slc7a5</i> | 4.48 | 4.73E-07 | solute carrier family 7 member 5 |
| TRINITY_GG_2290_c0_g1_i1 | <i>stat3</i> | 3.72 | 1.56E-05 | signal transducer and activator of transcription 3 |
| TRINITY_GG_2866_c0_g1_i1 | <i>tgfb1a</i> | 3.02 | 4.14E-04 | transforming growth factor, beta 1a |
| TRINITY_GG_6617_c0_g1_i1 | <i>timp2a</i> | 6.29 | 1.18E-11 | TIMP metallopeptidase inhibitor 2a |

表四、下調控 (Down regulation) 之數量性狀基因座於紅色個體

透過轉錄組分析，各挑選出 3 個下調控之數量性狀基因座。

| Down-regulated candidate DEGs associated with skin color in red fish | | | | |
|--|---------------|---------------------|----------|--|
| Gene_ID | Gene symbol | log ₂ FC | FDR | Gene name |
| TRINITY_GG_176_c0_g1_i1 | <i>mpx</i> | -8.79 | 1.67E-16 | myeloid-specific peroxidase |
| TRINITY_GG_7548_c0_g1_i1 | <i>kdf1a</i> | -4.02 | 1.61E-05 | keratinocyte differentiation factor 1a |
| TRINITY_GG_8457_c0_g1_i1 | <i>aldoaa</i> | -1.99 | 2.25E-02 | aldolase a, fructose-bisphosphate, a |

參考書目

1. 邵廣昭 (民109)。台灣魚類資料庫。取自：<http://fishdb.sinica.edu.tw>
2. 許鐘鋼、陳文展、蘇懿忠、林金榮 (民103)。豹鱸完全養殖成功。行政院農業委員會水產試驗所，99。
3. 許鐘鋼 (民100)。豹鱸種苗生產技術。水產試驗所特刊，第12號：35-42。
4. Adams, S. (2003). Morphological ontogeny of the gonad of three plectropomid species through sex differentiation and transition. *J. Fish Biol.*, 63(1), 22–36.
5. Blaker-Lee, A., Gupta, S., McCammon, J. M., DeRienzo, G., & Sive, H. (2012). Zebrafish homologs of genes within 16p11.2, a genomic region associated with brain disorders, are active during brain development, and include two deletion dosage sensor genes. *Dis. Model. Mech.*, 5(6), 834–851.
6. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
7. Choat J.H. & Samoilys M. (2018). *Plectropomus leopardus*, leopard coral grouper. *IUCN Red List Threat. Species*.
8. Domingues, L., Hurbain, I., Gilles-marsens, F., Sirés-campos, J., André, N., Dewulf, M., Romao, M., Lesegno, C. V.De, Macé, A., Blouin, C., Guéré, C., Vié, K., Raposo, G., Lamaze, C., & Delevoeye, C. (2020). Coupling of melanocyte signaling and mechanics by caveolae is required for human skin pigmentation. *Nat. Commun.*, 11(1), 1–14.
9. 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(2), 653–669.
10. Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–

3152.

11. Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Philip, D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Macmanes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., ...Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat. Protoc.*, 8, 1494–1512.
12. Henning, F., Jones, J. C., Franchini, P., & Meyer, A. (2013). Transcriptomics of morphological color change in polychromatic Midas cichlids. *BMC Genomics*, 14(1), 1–14.
13. Hirobe, T. (2014). Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sin.*, 32(4), 200–204.
14. Huang, Z., Ma, B., Guo, X., Wang, H., Ma, A., Sun, Z., & Wang, Q. (2021). Comparative transcriptome analysis of the molecular mechanism underlying the golden red colour in mutant Taiwanese loach. *Aquaculture*, 736979.
15. Jiang, Y., Zhang, S., Xu, J., Feng, J., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Sun, X., & Xu, P. (2014). Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of skin color variation in common carp. *PLoS One*, 9(9), e108200.
16. Kusumawati, D., & Setiawati, K. M. (2017). The use of carotene materials as the source of red color pigmentation on leopard grouper larvae (*Plectropomus leopardus*). *Aquac. Indones.*, 17(2), 35.
17. Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 9(4), 357–359.
18. Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 1–16.
19. Ma, X., Ma, Z., Jiao, X., & Hejtmancik, J. F. (2017). Functional non-coding

- polymorphism in an EPHA2 promoter PAX2 binding site modifies expression and alters the MAPK and AKT pathways. *Sci. Rep.*, 7(1), 1–15.
20. Maoka, T., Sato, W., Nagai, H., & Takahashi, T. (2017). Carotenoids of red, brown, and black specimens of *Plectropomus leopardus*, the coral trout (Suziara in Japanese). *J. Oleo Sci.*, 66(6), 579–584.
 21. McLean, E. (2021). Fish tank color: An overview. *Aquaculture*, 530, 735750.
 22. Melianawati, R., Astuti, N. W. W., & Suwirya, K. (2013). The use of copepods to improve juveniles production of coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepède, 1802). *Middle East J. Sci. Res.*, 16(2), 237–244.
 23. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140.
 24. Wang, C., Wachholtz, M., Wang, J., Liao, X., & Lu, G. (2014). Analysis of the skin transcriptome in two Oujiang color varieties of common carp. *PLoS One*, 9(3), 1–8.
 25. Wright, K. J., Higgs, D. M., Belanger, A. J., & Leis, J. M. (2008). Auditory and olfactory abilities of larvae of the Indo-Pacific coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepède) at settlement. *J. Fish Biol.*, 72(10), 2543–2556.
 26. Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Cao, D., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., ... Sun, X. (2014). Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nat. Genet.*, 46(11), 1212–1219.
 27. Yang, Y., Wu, L. N., Chen, J. F., Wu, X., Xia, J. H., Meng, Z. N., Liu, X. C., & Lin, H. R. (2020). Whole-genome sequencing of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) and exploration of regulation mechanism of skin color and adaptive evolution. *Zool. Res.*, 41(3), 328–340.

28. Zhang, Y., Liu, J., Peng, L., Ren, L., Zhang, H., Zou, L., Liu, W., & Xiao, Y. (2017). Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.). *Fish Physiol. Biochem.*, 43(5), 1387–1398.
29. Zhu, W., Wang, L., Dong, Z., Chen, X., Song, F., Liu, N., Yang, H., & Fu, J. (2016). Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia. *Sci. Rep.*, 6(7), 1–12.