

## 锦鲤早期发育过程中色素代谢相关酶的活性和基因表达变化

殷浩然<sup>1</sup>, 罗明坤<sup>1</sup>, 王兰梅<sup>2</sup>, 董在杰<sup>1,2</sup>, 朱文彬<sup>2</sup>, 傅建军<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 通过显微观察、酶联免疫吸附及荧光定量 PCR 等方法, 探究了红白、红黑锦鲤 (*Cyprinus carpio* var. koi) 子一代 (F<sub>1</sub>) 早期体色发育过程及不同发育时期色素代谢相关酶 (酪氨酸酶、胱氨酸酶) 的活性和基因 (*agouti*、*mc1r*、*mitf*、*tyr*) 的表达变化。结果表明, 锦鲤出膜后呈淡黄色半透明, 黑色素细胞在出膜 8 d 后开始出现。胱氨酸酶活性随锦鲤发育呈升高趋势, 出膜 7 d 后显著升高 ( $P < 0.05$ ); 7 日龄仔鱼前, 红黑组与红白组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 出膜 7 d 后红黑组比同时期红白组显著升高 ( $P < 0.05$ )。酪氨酸酶在锦鲤发育过程中也呈升高趋势, 但略有起伏, 眼色素积累期及出膜 23 d 后酪氨酸酶活性均比相邻各期高 ( $P < 0.05$ ); 组间比较发现发育各期红黑组均比红白组高 ( $P < 0.05$ )。表明酪氨酸酶、胱氨酸酶活性变化与锦鲤色素细胞发育存在密切关联。*agouti*、*mc1r*、*mitf* 及 *tyr* 4 个基因均在原肠期与神经胚期时表达最高 ( $P < 0.01$ ), 随后均呈下降趋势, 表明这 4 个基因可能在胚胎发育早期的体色形成过程中发挥着重要作用。

**关键词:** 锦鲤; 体色; 酪氨酸酶; 胱氨酸酶; *tyr*; *mitf*; *agouti*; *mc1r*

中图分类号: S 965.8

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Changes of pigment-related enzyme activity and gene expression at early developmental stage of koi carp

YIN Haoran<sup>1</sup>, LUO Mingkun<sup>1</sup>, WANG Lanmei<sup>2</sup>, DONG Zaijie<sup>1,2</sup>, ZHU Wenbin<sup>2</sup>, FU Jianjun<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Centre of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** We investigated the changes of tyrosinase and cystinase activities, as well as the expressions of *tyr*, *mitf*, *agouti* and *mc1r* mRNAs at the early developmental stage of Kohaku and Hi-Utsuri koi carp (*Cyprinus carpio*) by using histological observation, enzyme-linked immunoassay and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction methods. The results show that the hatched carps became light yellow and translucent. The melanocytes occurred on 8 dph (day-post-hatching). The activity of cystinase increased with the koi carp development, and no significant difference was observed between Kohaku and Hi-Utsuri groups before 7 dph ( $P > 0.05$ ), while Hi-Utsuri group showed significantly higher enzyme activity than Kohaku group at the same stages after 7 dph ( $P < 0.05$ ). Tyrosinase activity showed an up-regulation trend with slight fluctuation during the development of koi carp,

收稿日期: 2019-01-28; 修回日期: 2019-05-16

资助项目: 江苏省第五期“333工程”培养资金 (BRA2017083); 农业农村部现代农业人才支撑计划项目 (2016142); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2019ZY22)

作者简介: 殷浩然 (1995—), 男, 硕士研究生, 从事水产动物遗传育种研究。E-mail: 1334733261@qq.com

通信作者: 董在杰 (1967—), 男, 博士, 研究员, 从事水生动物遗传育种研究。E-mail: dongzj@ffrc.cn

and peaked at the ocular pigment stage and on 23 dph ( $P < 0.05$ ). The enzyme activity was significantly higher in Hi-Utsuri group than in Kohaku group at each developmental stage ( $P < 0.05$ ), which indicates that tyrosinase and cystinase activities were closely associated with pigment cell development of koi carp. The expressions of *agouti*, *mc1r*, *mitf* and *tyr* mRNAs peaked in gastrula and blastula periods ( $P < 0.01$ ), then decreased. Thus, *agouti*, *mc1r*, *mitf* and *tyr* mRNAs might play an important role in the formation of body colors in early embryonic development.

**Key words:** koi carp; body color; tyrosinase; cystinase; *tyr*; *mitf*; *agouti*; *mc1r*

鱼类体色是一类重要的表型性状, 与其生存繁殖息息相关, 参与拟态、求偶、伪装、环境适应等多种生物学过程, 而观赏鱼类斑纹和体色的优劣直接决定了其市场价值<sup>[1-2]</sup>。鱼类具有多种色素细胞, 如红色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞及黑色素细胞等<sup>[3]</sup>, 其丰富多彩的体色是各种色素细胞共同作用的结果<sup>[4]</sup>。鱼类色素细胞由神经嵴细胞分化形成, 研究表明大量基因参与到神经嵴细胞向色素细胞迁移和分化的过程<sup>[5]</sup>。其中黑素皮质素 1 受体 (*mc1r*) 基因是黑色素合成的关键基因, *mc1r* 基因产物与  $\alpha$ -促黑色素细胞激素 ( $\alpha$ -MSH) 结合, 启动腺苷酸循环 (cAMP), 促进酪氨酸酶 (*tyr*) 基因表达, 使酪氨酸 (Tyr) 在酪氨酸酶的催化下形成多巴醌 (dopaquinone)。当细胞中的 Tyr 含量较高时, 多巴醌在酪氨酸酶相关蛋白 1 基因 (*tyrp1*) 和相关蛋白 2 基因 (*tyrp2*, 或称多巴素异构酶基因, *dct*) 产物的作用下, 合成真黑色素; 当细胞中的 Tyr 含量较低时, 多巴醌将与半胱氨酸作用, 合成褐黑色素<sup>[6]</sup>。刺豚鼠信号蛋白 (*agouti*) 基因编码的 Asip 蛋白会与  $\alpha$ -MSH 竞争性地与 *mc1r* 基因产物结合, 抑制腺苷酸循环, 减少 Tyr 的生成<sup>[6]</sup>, 此外 Asip 蛋白抑制黑色素细胞分化, 降低小眼畸形相关转录因子 (*mitf*) 基因在黑色素细胞中的表达, 同时降低 *Mitf* 与酪氨酸酶的结合, 而 *mitf* 基因可调控酪氨酸酶基因家族的表达, 对黑色素细胞的发育、分化具有调控作用<sup>[7]</sup>, 通过这 2 条途径, 当 *agouti* 基因表达量较高时, 则生物体更多的是合成褐色素细胞<sup>[8-9]</sup>。

锦鲤 (*Cyprinus carpio* var. *koi*), 隶属鲤形目、鲤科、鲤属, 素有“水中活宝石”之称, 因其体色艳丽似锦, 斑纹多样, 食性杂且易饲养等特征, 而倍受人们喜爱。作为一种高档观赏鱼类, 锦鲤在其体色鉴赏上已形成一定系统, 常见种类包括红白 (Kohaku)、大正三色 (Tajshosanke)、昭和三色 (Showa-sanshoku)、写鲤 (Utsuri) 等, 在国内外观赏鱼市场上占有相当重要的份额<sup>[10]</sup>。近年来, 国内外学者就锦鲤体色调控相关的影响因素做了大量探究。如调控锦鲤的生长环境 (pH、亚硝酸盐、光照)<sup>[11]</sup>, 饲料中添加着色剂<sup>[12-13]</sup>, 杂交后代体色遗传分离标记筛选<sup>[14-15]</sup>, 色素细胞合成分子机制探究<sup>[16-19]</sup>等。然而, 笔者发现在实际生产中仍采用传统的大批量繁育挑选, 并配合着色饲料

饲喂等方法, 进而改善锦鲤的色泽, 基础工作仍相较冗杂。

因此, 本研究深入观察了不同体色锦鲤发育早期体色变化的规律; 进一步分析了其对应各时期色素代谢相关酶的活性 (酪氨酸酶、胱氨酸酶) 及基因 (*agouti*, *mc1r*, *mitf*, *tyr*) 的表达变化。研究结果为进一步了解并预测锦鲤体色发生过程、体色变异的分子遗传基础, 以及进一步培育出遗传性状稳定的锦鲤提供一定的技术和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用锦鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴妃亭基地, 分别挑选性成熟、无外伤、活力强的红白锦鲤 (Kohaku) 与红黑锦鲤 (Hi-Utsuri) ( $\text{♂} : \text{♀} = 1 : 1$ )。将 1 尾红白雌鱼与 1 尾红白雄鱼注射催产剂后置于水泥池中, 记为红白组; 红黑锦鲤通过同样操作记为红黑组。每组 2 个重复。受精后亲鱼捞出, 受精卵置于孵化池中流水孵化, 养殖过程水温保持在 20~23  $^{\circ}\text{C}$ , pH 6.8~7.5。

### 1.2 样品采集

定期从每组网片上取 40~50 粒受精卵, 通过 OLYMPUS CX31 光学显微镜观察并拍照, 发育时期划分以所观察胚胎数 50% 显示的发育特征为准。同时在对各采样时间点, 随机取 90~100 粒卵 (在出膜后的各采样时期称取仔鱼个体 150~200 g), 用滤纸吸干水, 置于 RNA Store 保存液中备用。

### 1.3 检测分析

1.3.1 酶活测定 分别称取不同时期各组锦鲤胚胎、幼鱼或皮肤组织 (60 mg), 加 1 mL PBS 溶液, 匀浆后将匀浆液置于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液于离心管, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中待测。酪氨酸酶、胱氨酸酶活性采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附进行测定 (Zhen Ke, 中国), 具体操作按试剂盒说明进行。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 样品总 RNA 按照 TRIzol 法进行提取, 使用核酸蛋白检测仪 (OD<sub>260</sub> : OD<sub>280</sub>) (Eppendorf, 德国) 测定 RNA 浓度, 并用 1% 琼脂糖检测 RNA 质量。荧光定量步骤按照 PrimeScript<sup>TM</sup> Real-time

PCR 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明进行, 于 CFX96™ Real-time System (Bio-Rad, 美国) 仪器上操作。根据 Gen-Bank 中 *tyr*、*mitf*、*agouti*、*mc1r* 及  $\beta$ -actin 相关序列设计定量引物 (表 1)。

表1 实时荧光定量PCR引物

引物名称 primer	核苷酸序列 (5'-3') sequence
<i>tyr F</i>	CACGGTCTCCGATCTTCCC
<i>tyr R</i>	CATCACGCCAGTCCCAGTA
<i>mitf F</i>	ACAACCTCTGCCCGTCTAAC
<i>mitf R</i>	CCGTGTGAGGTCCAGAGT
<i>agouti F</i>	AACTGCGTGCCGCTCTTGA
<i>agouti R</i>	TAAACAAGCCTTTGGGATCGGG
<i>mc1r F</i>	AGGAATCTCCACTCGCCAA
<i>mc1r R</i>	GCCCGTGCTCCGTCAATAA
$\beta$ -actin F	AGTCAGCAGAGTTGGGTGCT
$\beta$ -actin R	CACGGCATCATTACCAACTG

### 1.4 数据处理

实验结果以“平均值±标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ )”表示。采用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并进行 LSD 和 Duncan's 比较, 显著水平设为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 锦鲤早期发育体色观察

受精卵至 8 日龄仔鱼间各时期, 红白组锦鲤与红黑组锦鲤之间未发现明显差异。锦鲤胚胎发育共经历了受精、卵裂、囊胚、原肠胚、神经胚、器官形成及孵化出膜 7 个阶段, 整个发育过程约 71.5 h。

通过显微观察, 受精后 46.5 h, 锦鲤胚胎眼色素开始积累, 视泡颜色逐渐加深成黑色 (图 1-a)。受精后约 71.5 h, 仔鱼开始陆续破膜, 刚出膜仔鱼鱼体呈淡黄色、半透明, 显微镜下明显观察到鱼体背部的黄色素细胞 (图 1-b)。

出膜后红白组与红黑组仔鱼间未发现明显差别, 鱼体背部的黄色素随时间推移进一步增多, 并向尾部扩散。直到出膜后第 8 天, 红黑组仔鱼背部开始出现零星的树枝状黑色素细胞, 之后开始逐渐增多; 而红白组锦鲤并未观察到黑色素细胞 (图 1-c、1-d)。

出膜后 2 个月, 锦鲤仔鱼的形态与成鱼相似, 体色与斑纹分化明显。统计发现, 红白组子一代 ( $F_1$ ) 性状有

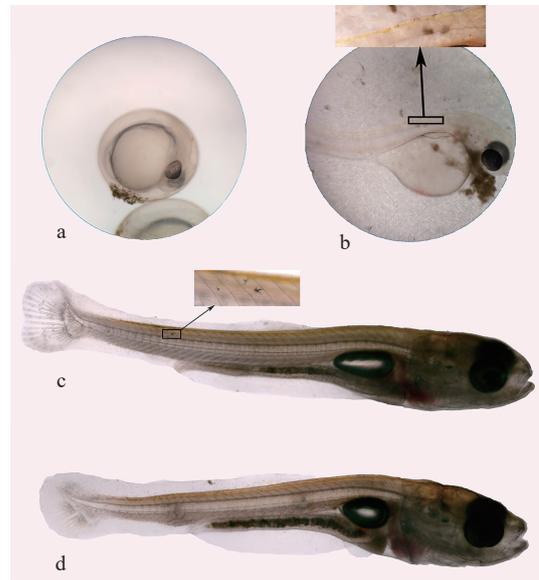


图1 锦鲤早期发育体色变化

- a. 眼色素积累期; b. 刚破膜膜仔鱼, 黑色箭头示黄色素细胞;
- c. 8 日龄红黑组锦鲤, 黑色箭头示黑色素细胞;
- d. 8 日龄红白组锦鲤

Fig.1 Change of body color at early developmental stage of koi carp

- a. eye melanin stage; b. the black arrow indicates the yellow pigment cells that appeared on the back of the newly hatched larvae; c. 8 dph larvae in Hi-Utsuri groups (the black arrow shows melanocytes);
- d. 8 dph larvae in Kohaku groups

3 种: 全红、全白与红白; 红黑组  $F_1$  代体色分化较为复杂, 包括全红、全白、红白、红黑、黑白及三色。取样分析结果显示实验组后代及组间体色分离比例差异较大, 未发现明显的传统分离规律 (表 2、表 3)。而将锦鲤黑色斑纹视为一个性状进行统计发现,  $F_1$  子代中体表具有黑色斑纹个体数与体表无黑色斑纹个体数的比值大致为 2 : 1 (表 4)。

表2 红白组子一代体色性状分离

Tab.2 Segregation of body color characteristics of $F_1$ generation in Kohaku group				
组别 group		全红 red	全白 white	红白 Kohaku
红白A Kohaku A	个体数	463	200	441
	百分比/%	41.94	18.1	39.95
红白B Kohaku B	个体数	377	180	652
	百分比/%	31.18	14.89	53.93

### 2.2 锦鲤早期发育不同时期胱氨酸酶与酪氨酸酶活性变化

通过对锦鲤子代体色发育的显微观察, 选取了 9 个关键时期: 囊胚期、眼色素积累期、出膜期、1 日龄、3 日龄、7 日龄、13 日龄、23 日龄及 43 日龄, 测量对应时间

表3 红黑组子一代体色性状分离

Tab.3 Segregation of body color characteristics of F<sub>1</sub> generation in Hi-Utsuri group

组别 group	全红 red	红黑 Hi-Utsuri	全白 white	红白 Kohaku	三色 Showa	黑白 Shiro-Utsuri
红黑A Hi-Utsuri A	个体数	312	498	2	97	233
	百分比/%	27.01	43.12	0.17	8.40	20.17
红黑B Hi-Utsuri B	个体数	96	134	66	218	403
	百分比/%	8.47	11.83	5.83	19.24	35.57

表4 红黑组子一代黑色斑纹分离

Tab.4 Segregation of black pattern characteristics of F<sub>1</sub> generation in Hi-Utsuri group

组别 group	有黑斑 pigmented	无黑斑 unpigmented
红黑A Hi-Utsuri A	个体数	744
	比例	1.81 : 1
红黑B Hi-Utsuri B	个体数	753
	比例	1.98 : 1

点酶活性的变化。结果表明,红白组锦鲤自囊胚期至3日龄的发育过程中,胱氨酸酶呈上升趋势,但差异不显著( $P>0.05$ );发育至7日龄时,活性开始逐步升高,第43天达到峰值( $P<0.05$ )。红黑组锦鲤,囊胚期至3日龄仔鱼阶段,胱氨酸酶活性差异也不显著( $P>0.05$ );发育至7日龄时,显著高于之前各阶段( $P<0.01$ ),13日龄时略有降低( $P<0.05$ ),之后又升高;发育至43日龄时达到峰值( $P<0.05$ )。组间比较发现,从囊胚期到3日龄仔鱼各期胱氨酸酶活性差异不显著( $P>0.05$ ),至7日龄时,红黑组相较于同期红白组显著升高( $P<0.05$ ,图2)。

酪氨酸酶结果表明,红白组内,囊胚期至1日龄仔鱼阶段,除眼色素积累期时活性显著偏高( $P<0.05$ ),其他各期均较低,且差异不显著( $P>0.05$ );出膜3d后,酪氨酸酶活性逐渐升高,并在第23天达峰值( $P<0.05$ )。红黑组内,囊胚期至3日龄仔鱼阶段,同样观察到眼色素积累期时活性最高( $P<0.05$ ),其他各期差异不显著( $P>0.05$ );出膜后7d,酪氨酸酶活性持续升高,第23天达峰值( $P<0.05$ )。组间比较发现,红黑组子代早期各发育阶段酪氨酸酶活性均比同时期红白组高( $P<0.05$ ,图3)。

### 2.3 锦鲤早期发育不同时期 *agouti*、*mc1r*、*tyr* 及 *mitf* 基因表达

本研究选取了10个关键时期:囊胚期、原肠期、神经胚期、眼基形成期、眼色素积累期、出膜期、1日龄、7日龄、23日龄、43日龄,测量对应时间点 *agouti*、*mc1r*、

*tyr* 及 *mitf* 4个基因的表达量变化。*agouti* 基因在两组锦鲤发育不同阶段均有表达,红白组与红黑组子代锦鲤在早期发育的不同阶段差异均不显著( $P>0.05$ );而两组在原肠期与神经胚期的表达量显著高于其他时期( $P<0.01$ ),之后降低,出膜23d与43d后表达量降至极低且显著低于眼基形成期( $P<0.05$ ,图4)。

*mc1r* 基因在锦鲤不同时期均有表达,两组子代锦鲤在早期发育的不同阶段差异性均不显著( $P>0.05$ )。原肠期表达量极显著高于其他时期( $P<0.01$ ),神经胚期显著高于另外8个时期( $P<0.05$ ),囊胚期、眼基形成期、眼色素积累期、出膜期、1日龄、7日龄、23日龄与43日龄8个时期表达水平较低,且不存在显著性差异( $P>0.05$ ,图5)。

*mitf* 基因在每组锦鲤各期亦均有表达,红白组与红黑组子代锦鲤在早期发育的不同阶段差异性均不显著( $P>0.05$ )。两组子代锦鲤在原肠期表达量显著高于其他时期( $P<0.01$ ),神经胚期次之( $P<0.05$ ),之后逐渐降低,并在7日龄、23日龄与43日龄降至极低( $P<0.05$ ,图6)。

*tyr* 基因在红白与红黑组早期发育不同阶段无显著性差异( $P>0.05$ )。原肠期时表达水平极显著高于其他各期( $P<0.01$ ),神经胚期次之( $P<0.01$ ),囊胚期与眼色素积累期显著高于眼基形成期、出膜期、1日龄、7日龄、23日龄及43日龄6个时期( $P<0.05$ );7日龄、23日龄与43日龄间无显著差异( $P>0.05$ ),且显著低于其他各期( $P<0.05$ ,图7)。

## 3 讨论

### 3.1 锦鲤早期体色变化观察

红白与红黑组锦鲤,在胚胎发育过程中,其胚胎形态和特征未发现明显差异。受精卵均为沉水粘性卵,胚胎因受卵黄囊影响而呈淡黄色,这与鲤鱼及其他品系锦鲤中描述的结果基本一致<sup>[19-22]</sup>。田雪等<sup>[23]</sup>发现,红色锦鲤出膜后,1日龄仔鱼除眼部呈黑色外,身体呈透明,未观察到其他色素细胞形成,而本研究发现红白、红黑组仔鱼出膜后,身体呈淡黄色,显微镜下能观察到仔鱼背部有成片的

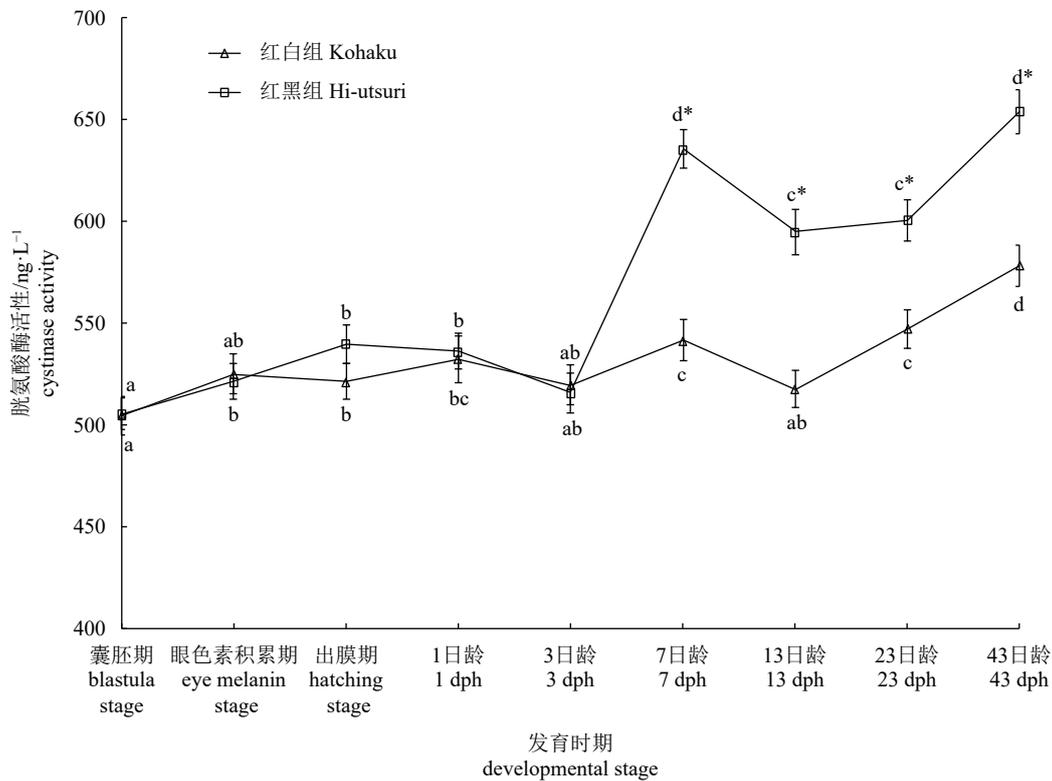


图2 红黑组与红白组发育过程中胱氨酸酶活性的变化

同一组内不同字母表示不同时期差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), \*. 同一时期不同组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),

图 3 同此

Fig.2 Change of cystinase activity during embryonic development of Kohaku group and Hi-Utsuri group

Different letters in the same group indicate significant difference at different periods ( $P < 0.05$ ); the same letters indicate no significant difference ( $P > 0.05$ ); \*. significant difference between different groups in the same period ( $P < 0.05$ ). The same case in Fig.3.

黄色素细胞, 这与张哲等<sup>[22]</sup> 在红白锦鲤出膜仔鱼中所观察的结果一致。8 日龄的仔鱼, 其背部发现呈树枝状的黑色素细胞, 随着时间的推移, 黑色素细胞逐渐扩散至其他部位; 文胜<sup>[24]</sup> 也发现三色锦鲤出膜后 9 d 背部开始出现黑色素细胞, 后扩散至尾部, 这与本研究所观察到的结果基本一致。此外, 本研究还发现无论是红色素细胞或黑色素细胞均首先出现在鱼体背部, 随后逐渐扩散至鱼体两侧及腹部, 证实了锦鲤的色素细胞可能同其他硬骨鱼类色素细胞发育规律相同, 均是通过神经嵴细胞向背腹轴进行迁移<sup>[25]</sup>。

在对发育至二月龄的锦鲤体色统计中, 红白组子代的体色有 3 种: 全红、全白与红白; 而红黑组子代包含全红、全白、红白、红黑、黑白、三色, 子代锦鲤体色的分化比例较为复杂, 并且无明显的遗传规律。Gomelsky 等<sup>[26]</sup> 做了大量锦鲤黑色斑纹的杂交实验, 表明具有黑色斑纹的锦鲤父母之间的杂交导致 3 : 1 的分离 (着色 : 未着色), 而它们与红白锦鲤的杂交则导致 1 : 1 的分离, 从而认为锦鲤中黑斑的发育受一个显性基因 (B1) 的控制。而本研究发现, 体表有黑色斑纹与无黑色斑纹的比例约为 2 : 1, 这与 David 等<sup>[14]</sup> 的部分研究结果相同, 而 David 等认为控制黑

色体色的可能不止有一个显性基因。由此可见锦鲤的体色遗传机制十分复杂, 目前对于锦鲤多体色的遗传规律研究尚无定论, 仍有待于后续进一步的研究。

### 3.2 锦鲤早期发育不同阶段胱氨酸酶及酪氨酸酶活性变化

黑色素合成通路是目前国内外体色研究中, 最为广泛而深入的通路之一。在鱼类的黑色素合成途径中, 酪氨酸酶由酪氨酸酶经一系列氧化催化形成; 当酪氨酸酶具有较高活性时, 促使多巴醌形成真黑色素, 从而使机体呈现黑色; 当酪氨酸酶活性不足时, 多巴醌会进一步与胱氨酸、谷胱甘肽等结合, 并最终形成褐黑色素, 进而使机体呈现黄色或红色<sup>[27-29]</sup>。

锦鲤早期发育过程中, 在显微镜观察下 8 日龄仔鱼背部开始出现树枝状黑色素细胞, 同时胱氨酸酶活性数据表明, 红黑组与红白组锦鲤在发育至 7 日龄之前胱氨酸酶活性无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 7 日龄仔鱼, 红黑组胱氨酸酶活性相比红白组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 推测这是由于此时黑色素开始合成, 而胱氨酸参与了褐黑色素合成, 进而导致胱氨酸酶活性升高<sup>[27]</sup>。

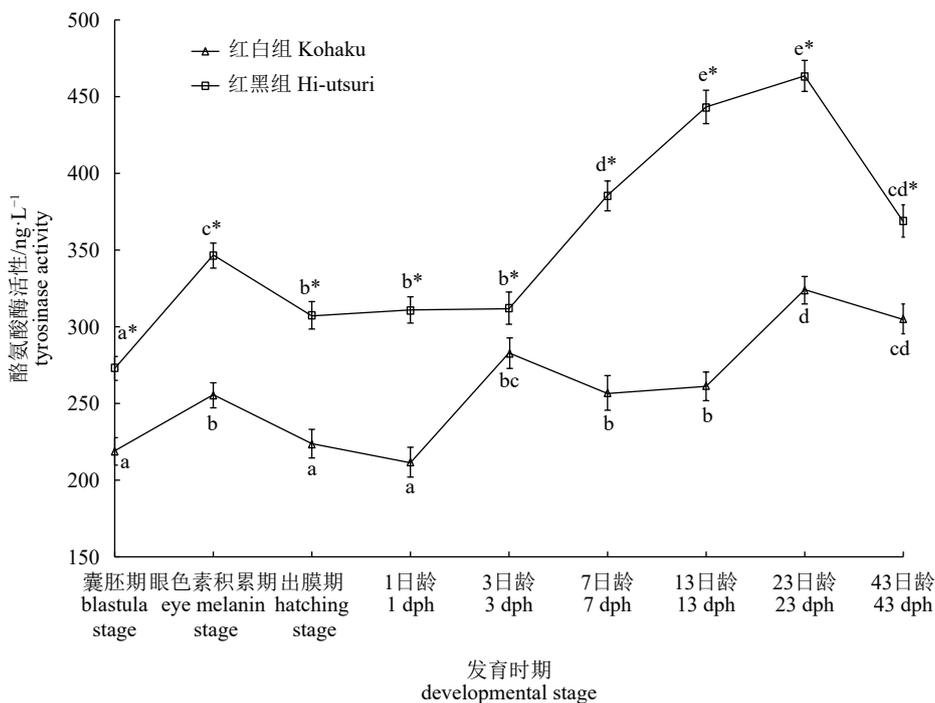


图3 红黑组与红白组发育过程中酪氨酸酶活性的变化

Fig.3 Change of tyrosinase activity during embryonic development of *Kohaku* group and *Hi-Utsuri* group

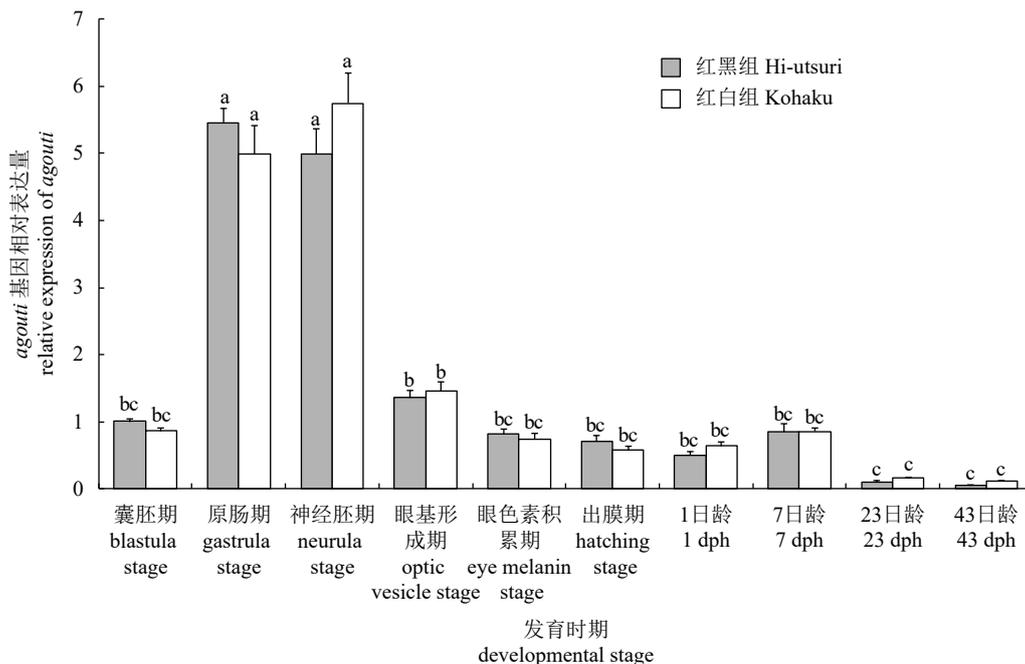


图4 *agouti*基因在锦鲤不同发育时期表达量

不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 后图同此

Fig.4 *agouti* gene expression at different developmental stage

Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same case in the following figures.

锦鲤早期发育不同时期, 红黑组酪氨酸酶活性均比红白组高, 这可能与红黑组仔鱼需要产生更多的黑色素细胞来维持其黑色斑纹相关。此外, 本研究发现, 当胚胎发育

至眼色素积累期时, 红黑组与红白组中酪氨酸酶的活性均开始上升, 结合显微镜下对该时期的观察, 胚胎眼基颜色开始逐渐加深, 推测可能是由于该阶段黑色素细胞开始在

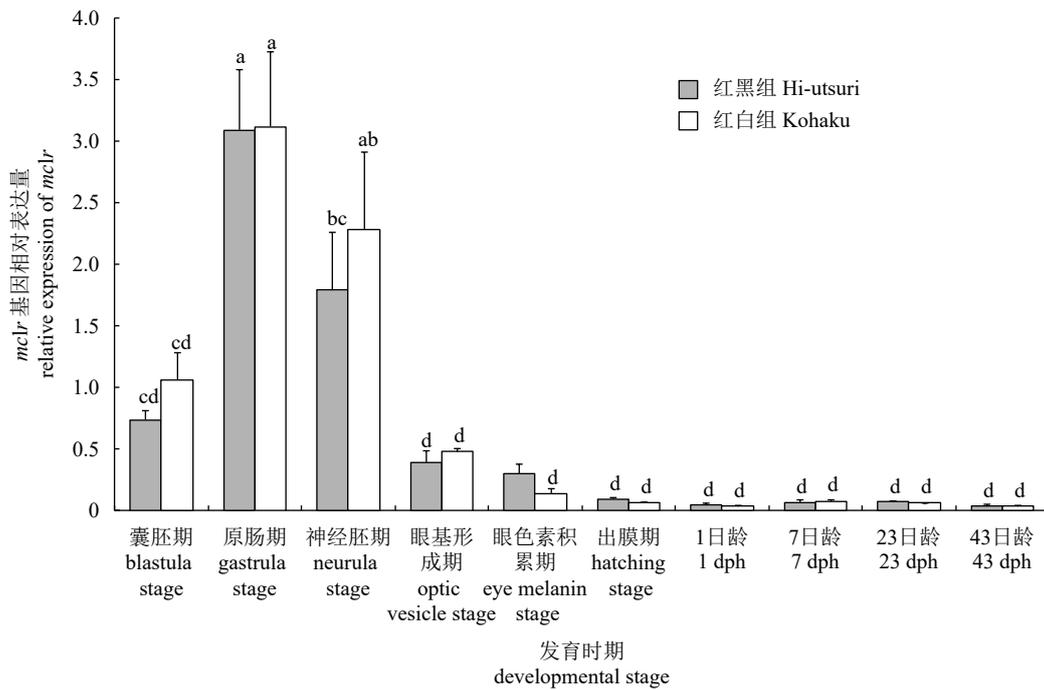


图5 *mclr*基因在锦鲤不同发育时期表达量

Fig.5 *mclr* gene expression at different developmental stage

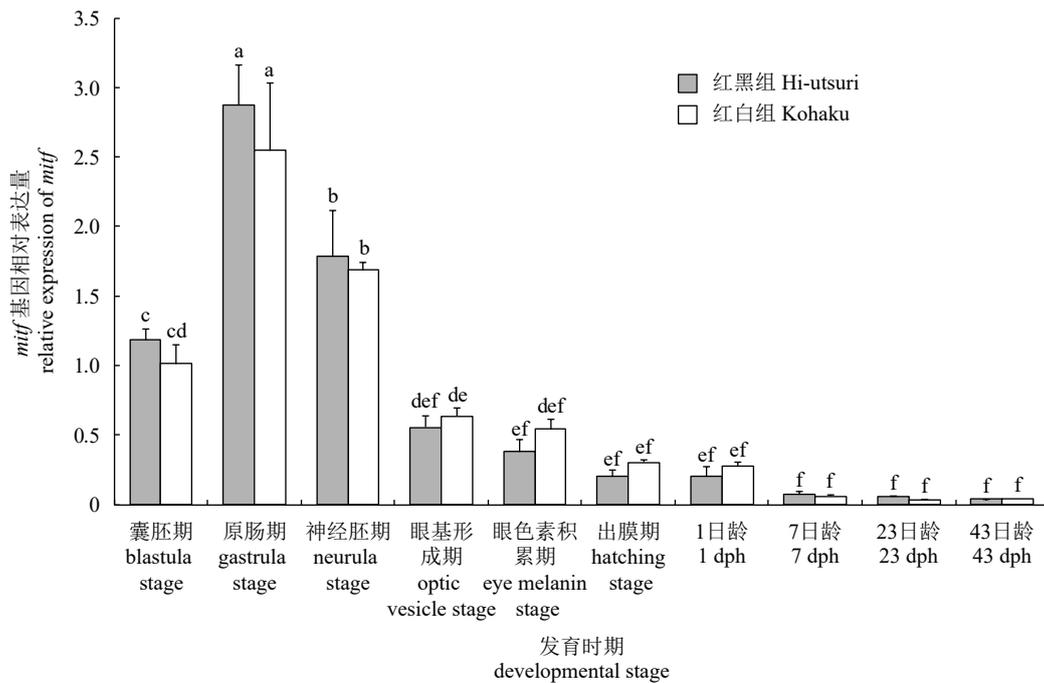


图6 *mitf*基因在锦鲤不同发育时期表达量

Fig.6 *mitf* gene expression at different developmental stage

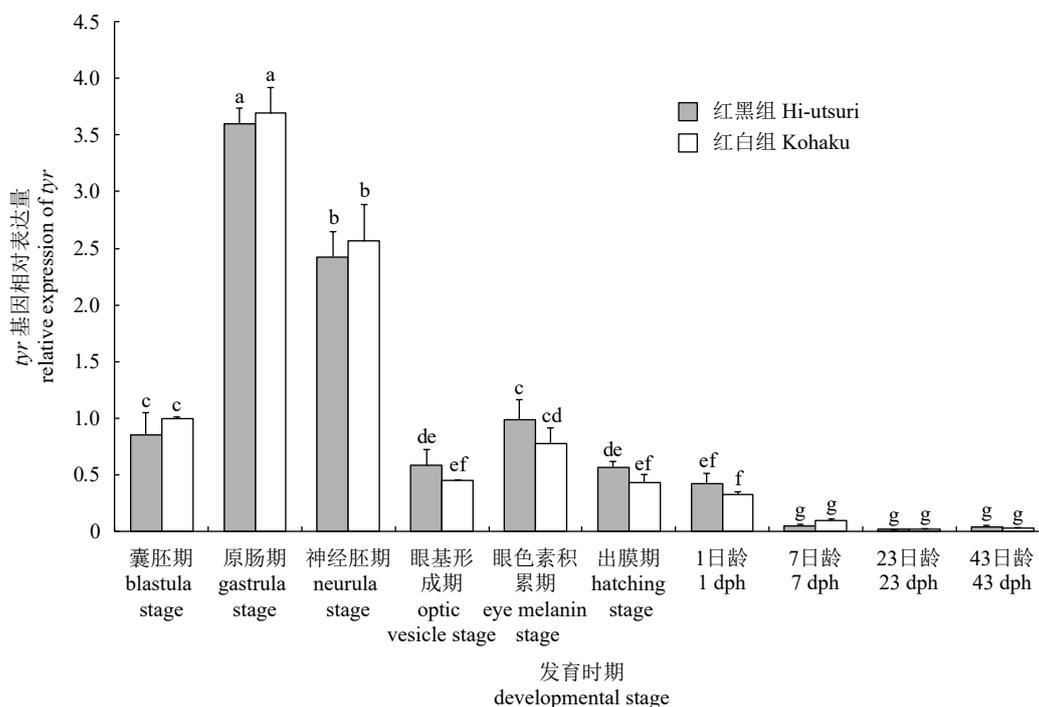
胚胎视网膜上积累所造成<sup>[30]</sup>。

### 3.3 *agouti*、*mclr*、*tyr* 及 *mitf* 基因在锦鲤早期发育不同阶段的表达差异

本研究中, *agouti*、*mclr*、*tyr*、*mitf* 4 种基因在红白实验组与红黑实验组早期发育过程中的表达量差异均不显

著, 推测可能是由于 8 日龄仔鱼之前, 红白组与红黑组形态上并无明显差别, 黑色素细胞尚未开始形成; 而子代出膜 8 d 后, 4 种基因的表达量与出膜前相比均达到极低水平, 所以难以观察到差异。

无论是红白组还是红黑组, *agouti*、*mclr*、*tyr*、*mitf*

图7 *tyr*基因在锦鲤不同发育时期表达量Fig.7 *tyr* gene expression at different developmental stage

4种基因在原肠期与神经胚期的表达量均比其他时期要高,分析可能是由于神经嵴细胞在原肠胚时期开始形成,而鱼类的色素细胞起源于神经嵴细胞<sup>[5]</sup>,此时色素细胞前体开始大量生成;另外可能与各基因不仅参与了色素细胞的形成与分化,还参与了早期发育过程中其他细胞形成的调控相关<sup>[31-34]</sup>。其中 *mitf* 与 *tyr* 基因表达量的趋势大致相同,推测可能是由于 *mitf* 基因对 *tyr* 基因具有调控作用<sup>[7]</sup>。出膜后 *mitf* 与 *tyr* 基因在1日龄阶段表达量较高,之后开始逐渐降低,这与田雪等<sup>[23]</sup>的研究结果相似,推测是由于色素前体细胞向色素细胞分化所致<sup>[32]</sup>。同时本研究发现,在红白组与红黑组子代发育至眼色素积累期时, *tyr* 基因的表达量均明显升高;而此时的酪氨酸酶活性也开始升高,推测主要是由于鱼类视网膜色素上皮细胞中含大量的黑色素细胞造成的<sup>[30]</sup>。

#### 4 总结

鱼类体色调控机制十分复杂,目前针对鱼类体色调控机制已经开展了大量研究<sup>[16-18,35-36]</sup>,而对于锦鲤早期发育过程中体色发生机制的研究却鲜有报道<sup>[23-24]</sup>。本研究揭示了锦鲤早期发育过程中酪氨酸酶、胱氨酸酶的活性变化及 *agouti*、*mc1r*、*mitf*、*tyr* 基因的表达规律与体色形成的相关性,而锦鲤的色素细胞合成涉及到其他相关理化因子,因此对于锦鲤体色早期的发生机制,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] PROTAS M E, PATEL N H. Evolution of coloration patterns[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2008, 24(1): 425-446.
- [2] RODGERS G M, KELLEY J L, MORRELL L J. Colour change and assortment in the western rainbowfish[J]. *Anim Behav*, 2010, 79(5): 1025-1030.
- [3] BRAASCH I, SCHARTL M, VOLFF J N. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish[J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7(1): 74.
- [4] JIANG Y, ZHANG S, XU J, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of skin color variation in common carp[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108200.
- [5] RAWLS J F, MELLGREN E M, JOHNSON S L. How the zebrafish gets its stripes[J]. *Dev Biol*, 2001, 240(2): 301-314.
- [6] LIN J Y, FISHER D E. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 843-850.
- [7] ALTSCHMIED J, DELFGAAUW J, WILDE B, et al. Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish[J]. *Genetics*, 2002, 161(1): 259-267.
- [8] SUZUKI I, TADA A, OLLMANN M M, et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to  $\alpha$ -Melanotropin[J]. *J Invest Dermatol*, 1997, 108(6): 838-842.
- [9] TACHIBANA M. MITF: a stream flowing for pigment cells[J]. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(4): 230-240.
- [10] 章之蓉. 锦鲤 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 2-31.

- [11] 邹旭龙. 几种环境因子对锦鲤生长及体色影响的研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016: 12-26.
- [12] 张晨, 刘倩, 顾宪明, 等. 饲料中不同添加剂组合对锦鲤生长和体色的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(4): 410-415.
- [13] 崔培, 姜志强, 王雪, 等. 不同蛋白水平的虾青素饲料对锦鲤体色、生长及免疫的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 382-388.
- [14] DAVID L, ROTHBARD S, RUBINSTEIN I, et al. Aspects of red and black color inheritance in the Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Aquaculture, 2004, 233(1/2/3/4): 129-147.
- [15] 刘启智, 肖军, 罗凯坤, 等. 雌核发育橙黄色锦鲤的遗传、性腺发育及外形特征 [J]. 水产学报, 2013, 37(3): 390-396.
- [16] LIU J H, WEN S, LUO C, et al. Involvement of the *mitfa* gene in the development of pigment cell in Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 2775-2784.
- [17] LI X, SONG Y, XIAO G, et al. Gene expression variations of red-white skin coloration in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21310-21329.
- [18] LUO M K, WANG L M, ZHU W B. Identification and characterization of skin color micro RNAs in Koi carp (*Cyprinus carpio* L.) by Illumina sequencing [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 779.
- [19] 林光华, 翁世聪. 兴国红鲤的胚胎发育 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 1986(3): 1-8, 103.
- [20] 许静, 谢从新, 邵俭, 等. 雅鲁藏布江尖裸鲤胚胎和仔稚鱼发育研究 [J]. 水生态学杂志, 2011, 32(2): 86-95.
- [21] 韩耀全, 何安尤, 蓝家湖, 等. 乌原鲤的胚胎发育特征 [J]. 水产科学, 2018, 37(3): 368-373.
- [22] 张哲, 卢毅, 詹俊阁, 等. 红白锦鲤的人工催产及胚胎发育研究 [J]. 经济动物学报, 2017, 22(1): 1-6.
- [23] 田雪, 庞小磊, 王良炎, 等. MITFa 及 TYR 基因在红色锦鲤体色发生不同阶段的表达分析 [J]. 水产科学, 2017, 36(2): 197-201.
- [24] 文胜. *mitfa* 基因在观赏鱼体色形成中的功能研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014: 35-36.
- [25] LECLERCQ E, TAYLOR J F, MIGAUD H, et al. Morphological skin colour changes in teleosts [J]. Fish Fish, 2009, 11(2): 159-193.
- [26] GOMELSKY B, CHERFAS N, HULATA G. Studies on the inheritance of black patches in ornamental (Koi) carp [J]. Isr J Aquacult-Bamid, 1998, 50(3): 134-139.
- [27] UYEN L D, NGUYEN D H, KIM E K. Mechanism of skin pigmentation [J]. Biotechnol Bioproc E, 2008, 13(4): 383-395.
- [28] HOEKSTRA H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates [J]. Heredity, 2006, 97(3): 222-234.
- [29] ITO S, WAKAMATSU K. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation [J]. Pigment Cell Melanoma R, 2011, 24(1): 63-74.
- [30] ZOU J, BEERMANN F, WANG J X, et al. The *fugu tyrp1* promoter directs specific GFP expression in zebrafish: tools to study the RPE and the neural crest-derived melanophores [J]. Pigment Cell Melanoma R, 2006, 19(6): 615-627.
- [31] VOISEY J, CARROLL L, van DAAL A. Melanocortins and their receptors and antagonists [J]. Curr Drug Targets, 2003, 4(7): 586-597.
- [32] PARICHY D M. Evolution of danio pigment pattern development [J]. Heredity, 2006, 97(3): 200-210.
- [33] CARREIRA S, GOODALL J, DENAT L, et al. *Mitf* regulation of *Dial* controls melanoma proliferation and invasiveness [J]. Genes Dev, 2006, 20(24): 3426-3439.
- [34] THOMAS A J, ERICKSON C A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest [J]. Pigment Cell Melanoma R, 2008, 21(6): 598-610.
- [35] ZHU W B, WANG L M, DONG Z J, et al. Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 31347.
- [36] 王巍, 胡红霞, 孙向军, 等. 锦鲤酪氨酸酶基因序列分析及其在不同锦鲤品系不同组织中的表达 [J]. 水产学报, 2012, 36(11): 1658-1666.