

DOI: 10.12264/JFSC2020-0610

不同体色鲤的生长、酪氨酸酶活性、黑色素含量及基因表达比较

傅建军¹, 朱文彬¹, 罗文韬², 王兰梅¹, 罗明坤¹, 董在杰^{1,2}

1. 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;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128

摘要: ‘福瑞鲤2号’鲤(*Cyprinus carpio*)在繁育过程中会出现橘红色个体, 为了探讨鲤体色分化与生长性能的相关性, 利用‘福瑞鲤2号’构建具有青灰色和橘红色个体的家系, 并对其生长性状、酪氨酸酶活性、黑色素含量、黑色素合成通路(ko04916)及生长激素合成、释放和效应通路(ko04935)相关基因的表达水平进行比较。结果显示, 青灰色组3月龄体重、体长、体高和体厚均极显著大于橘红色组($P<0.01$), 其体长/体高显著大于橘红色组($P<0.05$)。青灰色组皮肤中酪氨酸酶活性和黑色素含量均显著高于橘红色组($P<0.05$)。与青灰色组相比, *dct*、*mclr*、*mitfb*、*tyr*和*tyrp1*等12个黑色素合成通路(ko04916)基因在橘红色组皮肤中的表达量显著($P<0.05$)或极显著降低($P<0.01$), 且*gh*、*ghr*和*igf2*等6个生长激素合成、释放和效应通路(ko04935)基因在橘红色组肌肉中的表达量也显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)降低。此外, 代谢通路内基因呈现共表达模式, 代谢通路间共有基因在组织间呈现相似表达趋势。研究表明, 鲤体色变异与黑色素合成通路存在密切关系, 且不同体色个体表现出生长差异, 推测与体色和生长调控通路间存在相同基因有关。

关键词: 鲤; 体色; 生长; 酪氨酸酶; 黑色素; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)08-0939-09

鱼类体色较复杂, 具有黑色素细胞、红色素细胞、黄色素细胞、虹彩细胞、蓝色素细胞和白色素细胞^[1]。鱼类黑色素细胞仅合成真黑色素, 而不能合成褐黑色素, 其丰富的体色通过不同色素细胞合成相应色素以及色素细胞间互作形成^[2]。随着鱼类体色细胞及色素合成相关研究^[3-5]的不断积累, 当前对鱼类体色调控机制的认知不断深入, 尤其是对黑色素细胞形成及黑色素合成相关机制的解析日渐清晰^[1,6]。

鲤(*Cyprinus carpio*)在全球范围具有广泛分布, 并具有诸多体色变异特征的变种或品种, 如锦鲤(*C. carpio* var. *koi*)、瓯江彩鲤(*C. carpio* var. *color*)、荷包红鲤(*C. carpio* var. *wuyuanensis*)和兴国红鲤(*C. carpio* var. *xinguoensis*)等。Katasonov^[7]

认为锦鲤的橘红色表型由2个隐形基因控制, 当2个隐形基因纯合导致黑色素细胞缺失时仅由黄色素细胞起作用。Białowas^[8]和张建森等^[9]在不同体色鲤配对获得的子二代中均发现橘红色与青灰色个体的比率为1:15, 这符合2个位点控制的推论。近年来, 从分子水平对鲤体色调控机制的研究已有较多开展, 包括转录组测序分析^[10-13]及对相关基因或调控因子的研究^[14-18]。这些研究为鱼类体色分化和调控机制的遗传解析提供了丰富的参考数据, 尤其加深了对鲤黑色素合成通路相关基因及其表达调控的认知。

作为兼具食用和观赏价值的经济鱼类, 鲤的生长和体色都是重要的表型性状。在鲤的种质改良和利用实践中, 不同体色群体或变种常被用于

收稿日期: 2020-12-31; 修订日期: 2021-01-26.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-05); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD37); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2019JBFM03).

作者简介: 傅建军(1986-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为鱼类种质资源与遗传改良. E-mail: fujj@ffrc.cn

通信作者: 董在杰, 研究员, 研究方向为鱼类种质资源与遗传改良. E-mail: dongzj@ffrc.cn

开展杂交试验从而提高生长性能^[9,19]。其中,建鲤(*C. carpio* var. *jian*)是基于杂交、家系选育和雌核发育等方法人工培育的鲤品种,其原始亲本之一就是荷包红鲤。利用建鲤、黄河鲤(*C. carpio haematopterus* Temincket Schlegel)和黑龙江鲤(*C. carpio haematopterus*)进行完全双列杂交构建基础群体^[20],并进而培育出的新品种‘福瑞鲤 2 号’,目前已取得广泛的推广养殖。由于具有荷包红鲤的遗传来源,在‘福瑞鲤 2 号’的繁育过程中会有橘红色个体出现。据 Białowas^[8]报道,橘红色个体相较于野生型个体普遍表现为生长慢和存活率低等特点。朱丽艳等^[21]和钱永生等^[22]研究发现不同体色瓯江彩鲤的生长性能存在显著差异。王兰梅等^[23]针对‘福瑞鲤 2 号’生长速度差异个体肌肉组织开展了转录组分析,并发现存在诸多差异表达基因。然而,‘福瑞鲤 2 号’不同体色个体生长差异的分子生物学机制还未见报道。该研究利用‘福瑞鲤 2 号’构建家系,对青灰色和橘红色个体在生长性能、酪氨酸酶活性、黑色素含量、黑色素合成通路(ko04916)及生长激素合成、释放和效应通路(ko04935)基因表达开展研究,探讨体色变异与生长性能的相关性,以期为‘福瑞鲤 2 号’的种质改良和利用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料和生长数据采集

2019 年 4 月,利用‘福瑞鲤 2 号’为亲本,于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴岷亭基地开展人工配组。基于系谱关系,设计了 4 组可能出现体色分化的繁殖配组;亲鱼采用室内水泥池内设置网箱,并挂棕榈片的方式开展人工繁殖。鱼苗孵化后,获得 1 个存在体色分化的家系,并饲养于规格为 700 cm×435 cm×120 cm 的室内水泥池中,养殖用水为曝气地下水。2019 年 7 月,随机挑选青灰色和橘红色个体各 30 尾,用丁香油麻醉后,采用电子秤称量体重(精确度为 0.1 g),采用量鱼板和刻度尺测量体长、体高和体厚(精确度为 0.1 cm)。

1.2 酪氨酸酶活性和黑色素含量测定

随机采集青灰色和橘红色个体各 5 尾,用丁

香油麻醉后,采集血液(1 mL)和背部皮肤组织(60 mg),样本分别标注为 G01、G02、G03、G04 和 G05(青灰色个体),O01、O02、O03、O04 和 O05(橘红色个体)。分别将血液离心取上清,皮肤组织加 1 mL PBS 溶液,匀浆后离心取上清,置于 4 °C 待测。酪氨酸酶活性和黑色素含量采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附测定,具体操作参照相应的试剂盒(臻科生物,中国)。

1.3 实时荧光定量 PCR (qPCR)

对上述 10 尾实验鱼分别采集背部皮肤和肌肉组织,样本按照 TRIzol 法(康为世纪,中国)进行总 RNA 提取,利用 NanoDrop 紫外分光光度计(Thermo,德国)检测核酸浓度,并通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。然后,用 HiScript[®] III RT SuperMix 试剂盒(诺唯赞,中国)将 500 ng 的总 RNA 反转录成 cDNA 模板。

参考 KEGG (www.kegg.jp)代谢通路和 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)上鲤基因序列信息,挑选并设计 ko04916(黑色素合成)、ko04935(生长激素合成、释放和效应)代谢通路相关基因和 β -actin 共 20 个基因的 qPCR 引物(表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 CFX96[™] Real-time System (Bio-Rad, 美国)完成,进行 qPCR 测定时,每个样本设置 3 个重复;反应体系为 20 μ L: 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞,中国) 10 μ L,上下游引物(10 μ mol)各 0.5 μ L, cDNA 模板 1.5 μ L 和 ddH₂O 7.5 μ L。反应程序:95 °C 30 s, 预变性;95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 扩增循环;95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 读取熔解曲线。实验结果以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量^[24]。

1.4 数据处理和分析

对实验获得的生长性状、酪氨酸酶活性、黑色素含量和基因相对表达量等数据进行整理,并检验组间差异显著性(*T* 检验)。基于基因的相对表达量,进行主成分分析(principal component analysis, PCA),并制作样本散点图。分析基因间的线性相关(Pearson),并利用 Cytoscape 软件^[25]基于基因间的显著线性关系($P < 0.05$)构建共表达网络。所述 *T* 检验、线性相关、主成分分析及散点图制作均在 R 程序(www.R-project.org)中完成。

表 1 鲤基因 qPCR 引物序列信息表

Tab. 1 The primer sequence information for qPCR of genes in *Cyprinus carpio*

基因 gene	收录号 accession No.	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	长度/bp length
<i>β-actin</i>	M24113	TGCAAAGCCGGATTCGCTGG AGTTGGTGACAATACCGTGC	187
<i>asip</i>	KC178677	CCAACCATGTGAAGAGAC TGACGAGCAGTAGGTAAC	290
<i>dct</i>	XM_019069482	CTGGATGAGTATAACCGTCTG CGTCTGGCTTGTCGTATC	215
<i>frizzled</i>	XM_019064880	CGCTCTACTTCTTCACCAT ACCTACGACCACATCCAA	284
<i>gh</i>	M27000	CTATTGTCGGTGGTGCTGGTTA CAGGCTGTCCTCAAAGTCGTTA	144
<i>ghr</i>	XM_019108925	AATGCTGGACCTGGAGAGT GAGAAGATGAGGAGGACAAG	237
<i>igf1</i>	XM_019092966	CGTGGATGAATGCTGCTT CTTCTGATGAACCTCCTTACA	181
<i>igf2</i>	XM_019112130	GTGCCAGTCCTCAACAAC GAGAATGCGGTGGAATGG	245
<i>igf3</i>	KT895500	GATGAGGACGCTGCTTCT AAGGTTGCTGCTGTGTTG	109
<i>kita</i>	XM_019125867	TGCGTGTGGTAATGGATG ATGTGAGCGAGTGTAATG	107
<i>mclr</i>	XM_019114733	AGCCATTACTCTGACCATCCT CAACTCCTGACTGCGATACG	199
<i>mitfa</i>	KC565527	ATGCTCTTCCCTCCAACCTG CTCTGACCTCTGCTTCTAC	186
<i>mitfb</i>	XM_0190840110	CCGATGCTTATGGTCTTGT ATGTTACGCTGTCCTTAC	157
<i>pka</i>	XM_019069650	CATTCCTTGTGCGATTGG TCTGTTACCTGTATGTAGCC	250
<i>pkc</i>	XM_019080659	TACATACTCCAGTCCAACCT AAGCGAATCCGTCCTCTT	171
<i>raf</i>	XM_019113428	ACTGGTGGCTGACTGTATC ATGGAGGTGAGTGTGAAGG	177
<i>ras</i>	XM_019066893	AAGCAGGAAGCGTTGTTG CAGCAGTGTGATAGACGATGG	115
<i>tyr</i>	JQ670941	ATGTTACCCGACATCAGCGT AGAACAGCAGGTAAACGCGA	160
<i>tyrp1</i>	KF709395	AGAGATTACCAGAACCACAGG ATTGAGAAACAAATGAGCCAG	182
<i>wnt3</i>	XM_019113280	GTGAGAACCGACCAGATG TGCTTGAAGAAGGCGTATT	277

2 结果与分析

2.1 生长性状比较

本研究获得 1 个具有体色分化(图 1)的家系材料。青灰色组的 3 月龄体重、体长、体高和体厚均极显著高于橘红色组($P<0.01$), 其体长/体高显著大于橘红色组($P<0.05$)(表 2)。基于体重和体长的个体散点图(图 2), 多数橘红色个体小于青灰色个体, 但也存在少量橘红色个体生长表现与青灰色个体相当。



图 1 青灰色和橘红色‘福瑞鲤 2 号’个体
Fig. 1 The *Cyprinus carpio* (FFRC No. 2 strain) individuals with gray and orange skin color

表 2 不同体色鲤 3 月龄表型性状描述性统计

Tab. 2 Descriptive statistics of phenotypic traits in three-month *Cyprinus carpio* with different pigmentation

$n=30; \bar{x}\pm SE$

体色 skin color	体重/g body weight	体长/cm standard length, SL	体高/cm body depth, BD	体厚/cm body thickness, BT	体长/体高 SL/BD	体长/体厚 SL/BT
青灰色 gray	43.67±2.91	11.35±0.28	3.63±0.09	2.28±0.06	3.14±0.06	4.98±0.05
橘红色 orange	21.33±3.23**	8.50±0.39**	2.84±0.12**	1.74±0.08**	2.98±0.03*	4.88±0.03

注: *和**分别表示青灰色和橘红色间差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

Note: * and ** means significant ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) between gray and orange color carps, respectively.

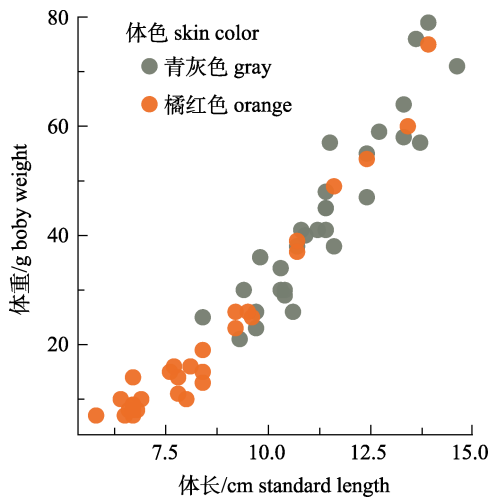


图 2 不同体色鲤生长性状的个体散点图

Fig. 2 Scatter plot for growth traits in *Cyprinus carpio* individuals with different colors

2.2 酪氨酸酶活性和黑色素含量比较

青灰色组的血液和皮肤中酪氨酸酶活性均显著高于橘红色组($P<0.05$) (图 3a)。青灰色组血液中黑色素含量高于橘红色组, 但未达显著水平($P>0.05$); 而青灰色组皮肤中黑色素含量显著高于橘红色组($P<0.05$)(图 3b)。

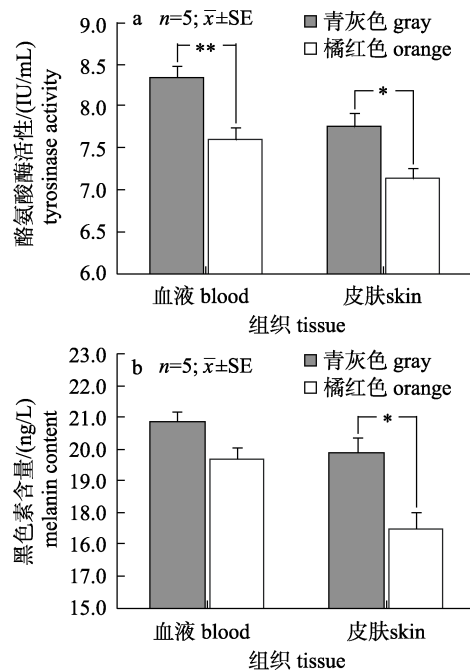


图 3 不同体色鲤血液和皮肤中酪氨酸酶活性(a)和黑色素含量(b)

*和**分别表示显著($P<0.05$)和极显著差异($P<0.01$)。

Fig. 3 Tyrosinase activity (a) and melanin content (b) in blood and skin of different color *Cyprinus carpio*
* and ** means significant ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$), respectively.

2.3 基因的相对表达量分析

基于 19 个 ko04916 和 ko04935 通路基因相对表达量数据, 对‘福瑞鲤 2 号’个体制作主成分分析散点图(图 4), 结果显示青灰色和橘红色个体能获得有效区分。

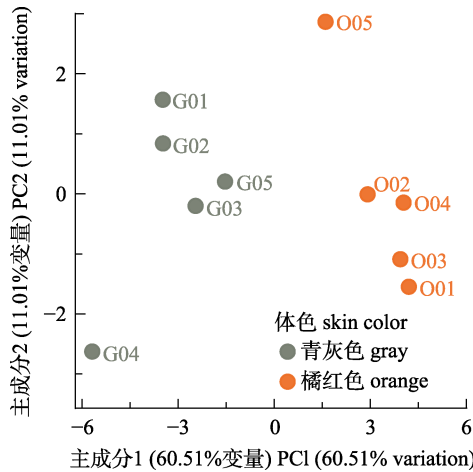


图 4 基于基因相对表达量的不同体色鲤主成分分析散点图

Fig. 4 Scatter plot of different color *Cyprinus carpio* individuals based on gene relative expression data

基因相对表达量在不同体色个体间存在差异(表 3)。在皮肤中, *dct*、*mc1r*、*mitfb*、*tyr* 和 *tyrp1* 等 12 个 ko04916 通路基因在青灰色组的相对表达量显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于橘红色组的相对表达量, 而 *mitfa* 基因在青灰色组的相对表达量极显著低于橘红色组的相对表达量($P<0.01$)。在肌肉中, *gh*、*ghr* 和 *igf2* 等 6 个 ko04935 通路基因在青灰色组的相对表达量显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于橘红色组的相对表达量。此外, *pka*、*pkc*、*raf* 和 *ras* 为 ko04916 和 ko04935 通路间共有基因, 且在青灰色组的皮肤和肌肉中均呈现更高的表达水平; 其中, *pkc*、*raf* 和 *ras* 在皮肤与肌肉的相对表达量间相关系数分别为 0.79 ($P<0.01$)、0.76 ($P<0.05$)和 0.73 ($P<0.05$)。

基于相对表达量的线性关系构建了 2 个代谢通路相关基因的共表达网络(图 5)。其中, *mitfa* 与 *kita*、*ras*、*mc1r*、*frizzed* 和 *wnt3* 存在显著负相关($P<0.05$), 其余基因间均存在显著的正相关($P<0.05$)。

表 3 鲤基因相对表达量统计结果

Tab. 3 Relative expression levels of genes in *Cyprinus carpio* $n = 5; \bar{x} \pm SE$

组织 tissue	基因 gene	组别 group	
		青灰色 gray	橘红色 orange
皮肤 skin	<i>asip</i>	1.06±0.11	2.04±0.61
	<i>dct</i>	2.95±0.39	1.10±0.16**
	<i>frizzed</i>	2.62±0.32	1.00±0.30**
	<i>kita</i>	66.13±8.44	23.82±2.04**
	<i>mc1r</i>	12.58±1.82	3.42±0.36**
	<i>mitfa</i>	15.86±2.32	53.03±11.07**
	<i>mitfb</i>	25.35±7.88	9.10±2.10*
	<i>pka</i>	106.80±11.30	52.27±10.69**
	<i>pkc</i>	5.27±1.49	0.46±0.08**
	<i>raf</i>	43.73±5.65	26.77±5.66*
	<i>ras</i>	23.88±2.98	9.97±2.20**
	<i>tyr</i>	4.09±0.74	0.63±0.17**
肌肉 muscle	<i>tyrp1</i>	151.55±15.78	48.96±18.08**
	<i>wnt3</i>	26.16±1.90	12.75±0.89**
	<i>gh</i>	11.72±1.32	3.95±0.48**
	<i>ghr</i>	831.90±124.23	308.13±141.83*
	<i>igf1</i>	27.95±4.50	30.70±6.78
	<i>igf2</i>	261.73±24.50	83.64±36.40**
	<i>igf3</i>	3.98±0.72	3.18±0.41
	<i>pka</i>	175.64±17.76	114.46±29.12
	<i>pkc</i>	2.15±0.78	0.21±0.05*
	<i>raf</i>	111.92±6.21	66.84±12.81**
	<i>ras</i>	33.09±3.36	12.96±3.19**

注: *和**分别表示青灰色和橘红色组间差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

Note: * and ** means significant ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) between gray and orange groups, respectively.

3 讨论

鲤的体色通常为青灰色, 较普遍出现的体色变异为橘红色, 如荷包红鲤和兴国红鲤。可以利用不同表型特征的鲤品种(或群体)开展杂交试验, 研究其体色分化及其生长差异。据 Białowas^[8]的报道, 在欧洲也常发现有橘红色的鲤个体表现出更低的存活率和生长性能; 并利用杂交子二代开展了体色分化等研究。Liu 等^[26]利用鲤鲫(*Carassius auratus*)核质杂种与散鳞镜鲤开展双列杂交试验, 其中橘红色组合的生长性能普遍低于其他组合。在对瓯江彩鲤的研究中, 朱丽艳等^[21]和钱永生等^[22]分别在群体间(交配组合)和家系内均发

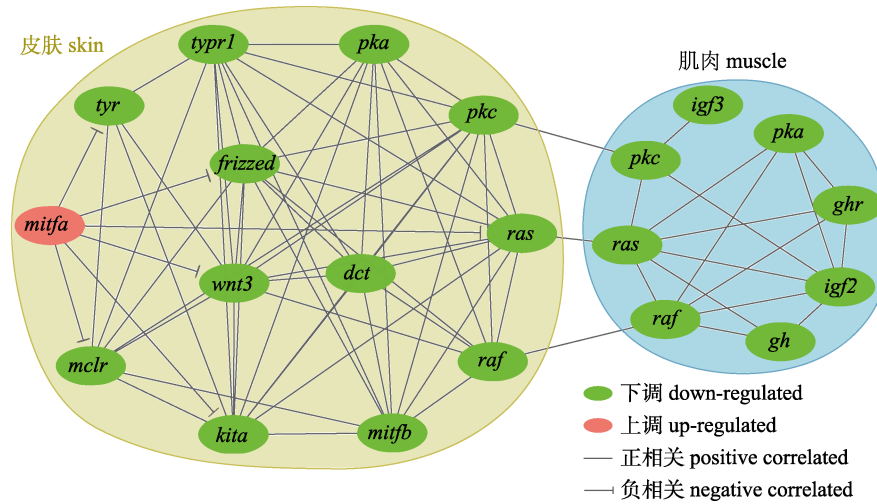


图 5 鲤皮肤和肌肉中基因的共表达网络(橘红色对比青灰色)

Fig. 5 Co-expression network of genes in skin and muscle of *Cyprinus carpio* (orange color vs. gray color)

现具有大块黑斑的“大花”和“粉花”个体具有生长优势。本研究中,同一家系内橘红色组的生长性能极显著低于青灰色组($P < 0.01$),结果与上述报道相似;但在橘红色组中也存在少量具有生长优势的个体,这为进一步选择利用提供可能。此外,不同体色组别的体型也表现出差异,橘红色组的体长/体高比值较小,可能与其原始祖先来源的荷包红鲤具有橘红色和高背等特点^[9]有关,分析表型上存在部分“返祖”现象。上述研究表明,鱼类在体色和生长这两种表型存在一定联系。

酪氨酸酶是黑色素合成通路的限速酶,其活性对鱼类体色具有重要调控作用。研究发现,鱼体酪氨酸酶活性和(或)黑色素含量存在关联性,并受遗传^[27]、营养^[28-29]、环境条件^[30-31]和发育阶段^[14]等因素影响。邓成等^[27]研究发现豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*)体色变异个体在色素及酶含量等方面存在差异,黑色个体皮肤和血液中的黑色素含量显著高于红色个体。程炜轩等^[28]在对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的研究中发现不同组别皮肤中酪氨酸酶活力与黑色素含量变化趋势一致。该研究中,青灰色组血液和皮肤中的酪氨酸酶活性分别极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)高于橘红色组,且青灰色组皮肤中黑色素含量也显著高于橘红色组($P < 0.05$)。因此,认为黑色素合成对鱼类体色变异存在重要影响,其含量能较好反映鱼类体色差异水平;在黑色素合成过程中,

血液可能起到生物合成和运输等功能,而皮肤通过黑色素累积并呈现相应的表型特征。

此外,在鱼类体色研究中,发现黑色素含量存在差异的组在生长性能上也存在一定差异^[29-30]。Chatzifotis 等^[29]和赵宁宁等^[30]分别在对真鲷(*Pagrus pagrus*)和豹纹鳃棘鲈的研究中均发现,黑色素含量最高的实验组相应的生长性能也最佳。然而,王兰梅等^[31]在对红罗非鱼(*Oreochromis spp.*)的研究中发现低温实验组皮肤的黑色素细胞数量更多,且背部皮肤变黑,但是其生长性能和酪氨酸酶活性却较低;这推测与鱼类属变温动物有关,温度是影响鱼体生长代谢速率的重要因素。因此,推测特定生理情况下鱼类酪氨酸酶活力、黑色素含量和生长性能间存在关联。

基于鲤的转录组研究^[10-13,23],发现其体色和生长差异往往可以通过基因的差异表达得到体现,而皮肤和肌肉分别是呈现体色和生长差异的重要组织。本研究基于体色和生长相关基因分别在皮肤和肌肉中的相对表达量,对不同体色鲤个体的主成分分析结果显示,所选基因能较好地反映组间差异。黑色素合成通路(ko04916)基因常被用于鱼类体色机制研究。王巍等^[32]和王良炎等^[33]均发现 *tyr* 基因在锦鲤黑色皮肤中的表达量高于其他皮肤;Bar 等^[34]发现 *mclr* 基因在锦鲤幼鱼黑色素形成和黑色个体中具有更高表达。本研究中, *dct*、*mclr*、*mitfb*、*tyr* 和 *tyrp1* 等 12 个 ko04916 通路基

因在青灰色组皮肤中的表达量显著或极显著高于橘红色组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 *asip* 基因(对黑色素合成起抑制作用^[35]) 在橘红色组中呈现更高表达水平, 这与黑色素含量的组间差异相符。研究发现, *mitfa* 和 *mitfb* 基因在组间均呈现差异性表达, 但表达趋势却相反, 类似现象在鲤^[16]和鲫^[36]的相关研究中也有发现。*mitfa* 基因被认为对黑色素生成具有重要调控作用, 且在其他色素形成过程同样发挥功能^[37], 正如余陆伟等^[15]在没有黑色素生成的“全红”体色瓯江彩鲤胚胎中也能检测到明显的 *mitfa* 表达信号。因此, 推测 *mitfa* 基因在橘红色鲤皮肤的色素形成中可能扮演重要角色, 具体调控机制还有待进一步研究。

生长激素基因(*gh*)的表达水平与鱼类生长性能密切相关, 如魏平等^[38]和何超凡等^[39]均发现, 具生长优势的实验组相应的 *gh* 基因也呈现更高表达水平。该研究中, *gh*、*ghr* 和 *igf2* 等 6 个生长激素合成、释放和效应通路(ko04935)基因在青灰色组肌肉中的相对表达量显著或极显著高于橘红色组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这符合生长性状的组间比较结果。在生长相关基因中, 也发现同源基因(*igf1*、*igf2* 和 *igf3*)存在表达水平和趋势的差异, 分析可能与鲤基因组经历过加倍化^[10], 从而导致新基因和基因新功能的产生有关。此外, ko04916 和 ko04935 通路共有的 4 个基因在皮肤和肌肉中的表达趋势相同, 其中 3 个基因的表达量在组织间具有显著正相关($P < 0.05$)。因此, 推测该研究中鲤体色变异与生长差异间所存在的联系, 可能与相应代谢调控过程中存在共同基因有关, 即所谓“一因多效”; 而相关基因通过协同和/或互作以共表达模式最终影响特定表型, 即所谓“多因一效”。

综上所述, 鱼类具有丰富的体色分化资源, 过去的研究中也关注到不同体色表型存在生长性能的差异性, 但就如何量化分析这两种表型性状间的关联性还未见报道。该研究采用‘福瑞鲤 2 号’这一人工选育品种, 基于系谱信息构建具有单色分化的全同胞家系, 并从生长、体型、酪氨酸酶活力、黑色素含量和基因表达等方面比较分析了体色分化个体的差异性; 尤其是通过体色和生长密切相关代谢通路上诸多基因的表达量来量化分

析两种表型性状间的关联性, 这可为其他性状关联性分析提供新的思路。

参考文献:

- [1] Cal L, Suarez-Bregua P, Cerdá-Reverter J M, et al. Fish pigmentation and the melanocortin system[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 211: 26-33.
- [2] Kelsh R N. Genetics and evolution of pigment patterns in fish[J]. *Pigment Cell Research*, 2004, 17(4): 326-336.
- [3] Logan D W, Burn S F, Jackson I J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores[J]. *Pigment Cell Research*, 2006, 19(3): 206-213.
- [4] Takahashi G, Kondo S. Melanophores in the stripes of adult zebrafish do not have the nature to gather, but disperse when they have the space to move[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2008, 21(6): 677-686.
- [5] Volkening A, Sandstede B. Iridophores as a source of robustness in zebrafish stripes and variability in *Danio* patterns[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3231.
- [6] Wang C H. Brief summary on genetic basis of pigmentation in fish[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 737-742. [王成辉. 鱼类体色变异的遗传基础研究进展简述[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 737-742.]
- [7] Katasonov V Y. Investigation of colour in hybrids of common and ornamental (Japanese) carp. 3: Inheritance of blue and orange colour types[J]. *Genetika*, 1978, 14(12): 2184-2192.
- [8] Białowas H. Inheritance of orange pigmentation and scale pattern in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Archives of Polish Fisheries*, 2004, 12(2): 145-150.
- [9] Zhang J S, Pan G B. Body form and body colour in hybrids of *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1983, 7(4): 301-312. [张建森, 潘光碧. 鲤鱼体色体型遗传的研究[J]. 水产学报, 1983, 7(4): 301-312.]
- [10] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [11] Wang C H, Wachholtz M, Wang J, et al. Analysis of the skin transcriptome in two Oujiang color varieties of common carp[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e90074.
- [12] Li X M, Song Y N, Xiao G B, et al. Gene expression variations of red-white skin coloration in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 21310-21329.
- [13] Luo M K, Wang L M, Yin H R, et al. Integrated analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in different colored skin of koi carp[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 515.

- [14] Yin H R, Luo M K, Wang L M, et al. Changes of pigment-related enzyme activity and gene expression at early developmental stage of koi carp[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(5): 109-117. [殷浩然, 罗明坤, 王兰梅, 等. 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[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 109-117.]
- [15] Yu L W, Cao S Y, Wang J, et al. Formation of melanin and mitfa in-situ in the Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. color)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(4): 481-488. [余陆伟, 曹思雨, 王军, 等. 两种体色瓯江彩鲤黑色素形成比较[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(4): 481-488.]
- [16] Si Z X, Chen H L, Xu X D, et al. Effect of *Dct* on pigmentation patterns in Oujiang color common carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(6): 605-612. [司周旋, 陈红林, 许细丹, 等. 多巴色素异构酶基因对瓯江彩鲤黑斑体色的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(6): 605-612.]
- [17] Hu J, Feng C, Ma X, et al. Molecular cloning and expression of sepiapterin reductase in Japanese ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. *koi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(4): 551-561. [胡菊, 冯彩, 马晓, 等. 锦鲤墨蝶呤还原酶基因的克隆、表达和定位分析[J]. 水产学报, 2020, 44(4): 551-561.]
- [18] Dong Z J, Luo M K, Wang L M, et al. MicroRNA-206 regulation of skin pigmentation in koi carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 47.
- [19] Dong Z, Yuan X. The utilizations of heterosis in common carp in China[J]. Aquaculture Asia, 2002, 7(2): 14-15.
- [20] Dong Z J, Nguyen N H, Zhu W B. Genetic evaluation of a selective breeding program for common carp *Cyprinus carpio* conducted from 2004 to 2014[J]. BMC Genetics, 2015, 16: 94.
- [21] Zhu L Y, Ma Y Q, Xiang S P, et al. Observation and analysis of growth dynamics in Oujiang color common carp with different pigmentation types[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(3): 341-348. [朱丽艳, 马玉清, 项松平, 等. 不同体色瓯江彩鲤生长动态的观察与分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(3): 341-348.]
- [22] Qian Y S, Chen H L, Du J X, et al. Comparison of growth, feeding and respiration characteristics and their correlation among four color patterns in Oujiang color carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(4): 695-702. [钱永生, 陈红林, 杜金星, 等. 4 种体色瓯江彩鲤的生长、摄食和呼吸特性差异及其相关性分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(4): 695-702.]
- [23] Wang L M, Zhu W B, Fu J J, et al. De novo transcriptome analysis and comparison of the FFRC No.2 strain common carp *Cyprinus carpio* associated with its muscle growth[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(1): 79-87. [王兰梅, 朱文彬, 傅建军, 等. 福瑞鲤 2 号不同生长速率个体肌肉组织转录组分析[J]. 水产学报, 2021, 45(1): 79-87.]
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Franz M, Lopes C T, Huck G, et al. Cytoscape.js: A graph theory library for visualisation and analysis[J]. Bioinformatics, 2016, 32(2): 309-311.
- [26] Liu X J, Liang H W, Li Z, et al. Performances of the hybrid between CyCa nucleocytoplasmic hybrid fish and scattered mirror carp in different culture environments[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46329.
- [27] Deng C, Chen S L, Ye H Z, et al. Analysis of pigment and enzyme levels of *Plectropomus leopardus* with body color difference[J]. Life Science Research, 2020, 24(1): 15-20. [邓成, 陈帅龙, 叶恒振, 等. 体色差异豹纹鳃棘鲈的色素及酶含量分析[J]. 生命科学研究, 2020, 24(1): 15-20.]
- [28] Cheng W X, Xu G H, Zhang L, et al. Effects of dietary inclusion of oxidized fish oil on melanin, melanin synthetic enzymes and hormones of *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(5): 1020-1026. [程炜轩, 许国焕, 张丽, 等. 氧化鱼油对黄颡鱼黑色素合成酶及内分泌激素的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 41(5): 1020-1026.]
- [29] Chatzifotis S, Pavlidis M, Jimeno C D, et al. The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*)[J]. Aquaculture Research, 2005, 36(15): 1517-1525.
- [30] Zhao N N, Zhou B W, Li Y, et al. Effects of light color on growth, skin color, and physiological indices of juvenile *Plectropomus leopardus* in a recirculating aquaculture system[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 976-984. [赵宁宁, 周邦维, 李勇, 等. 环境光色对工业化养殖豹纹鳃棘鲈幼鱼生长、肤色及生理指标的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 976-984.]
- [31] Wang L M, Song F B, Zhu W B, et al. Effects of temperature on body color of Malaysian red tilapia during overwintering period[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(1): 72-79. [王兰梅, 宋飞彪, 朱文彬, 等. 温度对马来西亚红罗非鱼越冬期体色的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(1): 72-79.]
- [32] Wang W, Hu H X, Sun X J, et al. Analysis of tyrosinase gene and tissue expression in five different strains of Koi carp (*Cyprinus carpio* Koi)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11): 1658-1666. [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.]
- [33] Wang L Y, Tian X, Pang X L, et al. Molecular cloning, expression pattern and location of *Tyrosinase* gene in Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(7): 1006-1016. [王良炎, 田雪,

- 庞小磊, 等. 黄河鲤酪氨酸酶基因的克隆、表达模式及定位分析[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1006-1016.]
- [34] Bar I, Kaddar E, Velan A, et al. Melanocortin receptor 1 and black pigmentation in the Japanese ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. koi)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2013, 4: 6.
- [35] Cone R D, Lu D, Koppula S, et al. The melanocortin receptors: Agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation[J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 1996, 51: 287-317.
- [36] Zhang Y Q, Liu J H, Peng L Y, et al. Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(5): 1387-1398.
- [37] Johnson S L, Nguyen A T N, Lister J A. *Mitfa* is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell[J]. *Developmental Biology*, 2011, 350(2): 405-413.
- [38] Wei P P, Li X, Zhang J P, et al. Effects of LED spectra on morphological characters and gene expression of growth in *Takifugu rubripes* larvae[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 162-168. [魏平平, 李鑫, 张俊鹏, 等. LED 光谱对红鳍东方鲀仔稚鱼形态性状及生长相关基因表达的影响[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 162-168.]
- [39] He C F, Li X F, Zhang L, et al. Effects of an extruded feed with or without anti-stress additives supplementation on the growth performance, digestive enzymes activities, stress response and the expressions of growth and feeding-related genes in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(6): 1087-1096. [何超凡, 李向飞, 张丽, 等. 膨化饲料及其添加抗应激剂对团头鲂生长性能、消化酶活性、应激及生长与摄食相关基因表达的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43(6): 1087-1096.]

Comparison of growth, tyrosinase activity, melanin content, and gene expression between common carps with different pigmentations

FU Jianjun¹, ZHU Wenbin¹, LUO Wentao², WANG Lanmei¹, LUO Mingkun¹, DONG Zaijie^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China

Abstract: Some orange individuals have been found in certain families of the ‘FFRC No. 2’ strain of common carp (*Cyprinus carpio*) during reproduction. This study aimed to unveil the pigmentation variation and its correlations with growth performance by determining the differences in growth traits, tyrosinase activity, melanin content, and gene expression between gray and orange individuals of ‘FFRC No. 2’ strain common carp. Based on growth trait comparisons after three months, the body weight (BW), standard length (SL), body depth (BD), and body thickness (BT) in the gray group were higher than those in the orange group ($P < 0.01$), and the SL/BD ratio in the gray group was higher than that in the orange group ($P < 0.05$). The tyrosinase activity and melanin content were significantly higher in the gray group than in the orange group ($P < 0.05$). Compared to the gray group, 12 genes (*dct*, *frizzed*, *kita*, *mc1r*, *mitfb*, *pka*, *pkc*, *raf*, *ras*, *tyr*, *tyrp1*, and *wnt3*) of the melanogenesis pathway (ko04916) were down-regulated in the skin of the orange group ($P < 0.05$, or $P < 0.01$), whereas six genes (*gh*, *ghr*, *igf2*, *pkc*, *raf*, and *ras*) of the growth hormone synthesis, secretion and action pathway (ko04935) were synchronously down-regulated in the muscle of the orange group ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). Furthermore, the co-expression patterns of genes were detected within pathways, and the shared genes of pathways showed similar expression patterns in different tissues. The results indicated that the pigmentation variation of *C. carpio* was highly associated with the melanogenesis pathway, and different growths were presented in *C. carpio* with different pigmentations. This correlation might be due to the same genes being shared between pathways related to color and growth.

Key words: *Cyprinus carpio*; pigmentation; growth; tyrosinase; melanin; gene expression

Corresponding author: DONG Zaijie. E-mail: dongzj@ffrc.cn