

文章编号: 1674 - 5566(2016)03 - 0329 - 08

DOI:10.12024/jsou.20150901537

瓯江彩鲤酪氨酸酶(TYR)基因的选择压力分析

古珍珍¹, 杨新鑫¹, 胡建尊¹, 项松平², 王 剑³, 王 军¹, 徐志彬², 王成辉¹

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 浙江省龙泉市水利水电局, 浙江 龙泉 323700; 3. 浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场, 浙江 龙泉 323700)

摘 要: 酪氨酸酶是生物体黑色素合成的关键限速酶, 黑色斑纹是瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 体色的主要特点之一。以瓯江彩鲤的 5 种体色选育系 F_5 为材料, 探讨酪氨酸酶基因 5 个外显子及其在不同体色间的变异特性和承受选择压力的敏感性。结果发现: 酪氨酸酶基因外显子 1 和外显子 5 的核苷酸变异率最高, 选择性位点最多, 易承受到选择压力; 5 个外显子的非同义替换率 (d_N) 与同义替换率 (d_S) 的比值 (ω 值) 均小于 1 (0.10 ~ 0.67), 表明它们均受到净化选择压力; 不同体色瓯江彩鲤的酪氨酸酶基因也均受到净化选择压力 ($\omega = 0.12 \sim 0.23$)。应用 PAML 软件中的 M2a 和 M8 两种模型检测显示: 无黑斑体色瓯江彩鲤所受正向选择压力位点数高于有黑斑体色, 但不存在显著差异 ($P > 0.05$); 酪氨酸酶基因中的部分氨基酸位点较易受正向选择压力。研究结果表明: 瓯江彩鲤酪氨酸酶基因较保守, 主要受净化选择作用, 当前的人工选育未对酪氨酸酶基因造成显著的选择压力。

关键词: 瓯江彩鲤; 酪氨酸酶基因; 选择压力; 遗传变异

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 体色丰富、花斑绚丽^[1], 至今已有 1 200 余年的养殖历史^[2], 它包含“全红”、“大花”、“麻花”、“粉玉”和“粉花”5 种基本体色^[3]。先前研究发现, 不同体色瓯江彩鲤遗传多样性存在显著差异^[1,4], 表明其体色的遗传分化方向存在差异, 不同体色可能受到了不同的自然或人工选择压力。同时, 不同体色的生长性能也存在显著差异, 如“大花”和“粉花”体色的生长速度显著快于“全红”和“粉玉”体色^[2,5]。而在瓯江彩鲤的几种体色类型中, 黑色斑块或斑纹 (以下简称黑斑) 是其重要特点之一, 如 5 种基本体色类型中, 有 3 种 (“大花”、“麻花”、“粉花”) 出现了黑斑。有黑斑与无黑斑体色类型间是否也存在选择压力差异尚不得而知。

酪氨酸酶 (Tyrosinase, *TYR*) 是生物体中黑色

素合成的关键限速酶^[6], 其变异会直接影响黑色素形成及体色表现^[7]。杨新鑫等^[8]的研究发现: 不同体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因 cDNA 全序列存在较大差异。此外, 胡建尊等^[9]研究指出该基因的第 1 外显子存在一定程度的选择压力。而经过连续多代的选育后, 5 种体色瓯江彩鲤已形成了体色纯合度较高的选育系, 但其体色相关基因是否发生了选择压力差异尚缺乏研究。本研究以瓯江彩鲤 5 种体色选育系 F_5 为材料, 通过分析酪氨酸酶基因 5 个外显子及其在不同体色间的变异情况和受到的选择压力, 旨在探讨酪氨酸酶基因 5 个外显子的变异情况, 观察基因不同外显子所受到的选择压力差异; 了解黑斑体色与无黑斑体色瓯江彩鲤所受的人工选择压力变化, 探讨人工选择对体色相关基因的驱动效应。

收稿日期: 2015-09-01 修回日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(30907725, 31372521); 上海市科学技术委员会项目(15391900800)

作者简介: 古珍珍(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 1174499653@qq.com

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼取自浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场的以体色和生长性能为选育指标所选育出的体色纯度较高的 F_5 一龄鱼种,包括“全红”(简称“QH”)、“大花”(简称“DH”)、“麻花”(简称“MH”)、“粉玉”(简称“FY”)、“粉花”(简称“FH”),共 27 尾。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取新鲜活鱼的皮肤组织约 50 mg,置于 1.5 mL RNase-free 离心管中,使用 RNA Store 试剂(北京天根生化科技有限公司)保存,转存至 -80°C 冰箱备用,用 Trizol 法抽提总 RNA^[8]。以总 RNA 为模板,利用 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒(宝生物工程大连有限公司)合成 cDNA。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据瓯江彩鲤酪氨酸酶基因全序列(GenBank 登录号: KU189170),利用 Primer premier 5.0 软件^[10]设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成(上游引物: CTCTCCCTCTGCTTCTGTCTT; 下游引物: GAAGTCGATCCCTCCTCTTCAC),以反转录的 cDNA 为模板,扩增不同体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因的编码区序列。

PCR 扩增体系为 50 μL ,包含: PCR Master Mix 25 μL , ddH₂O 19 μL ,正反引物各 2 μL ,模板 2 μL ; PCR 扩增反应程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min,进行 35 个循环后 72°C 延伸 10 min,最后 4°C 保存。反应结束后,各取产物 4 μL 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行纯化。纯化产物用 PMD19-T 载体连接(宝生物工程大连有限公司),再转入大肠杆菌中培养,每个个体挑取 3~5 个阳性克隆进行测序。

1.4 数据处理

使用 BioEdit 软件^[11]和 Clustal W 软件^[12]对所测序列进行比对编辑;使用 DnaSP 5.10 软件^[13]计算序列的多态位点数(S)、平均核苷酸差异指数(k)、核苷酸多样性(π)、同义替换率(d_s)和非同义替换率(d_N)。

采用以下两种方法来检验酪氨酸酶基因受到的选择压力:

(1) 非同义替换率与同义替换率的比值($\omega = d_N/d_s$)^[14],若 $\omega > 1$,表明酪氨酸酶基因受到了正向选择压力;若 $\omega = 1$,表明酪氨酸酶基因受到了中性选择压力;若 $\omega < 1$,表明酪氨酸酶基因受到了净化选择。

(2) 采用 PAML version 4.5 软件包^[15]中 Codeml 程序的 M2a 和 M8 模型检测酪氨酸酶基因的选择压力位点,以模型中的 BEB (Bayes empirical Bayes)^[16]标准来确定正向选择压力位点,若后验率大于 95% 时,表明该位点受到显著的正向选择压力。

2 结果

2.1 外显子间的遗传变异与选择压力分析

所测序列经校正、拼接,得到瓯江彩鲤 TYR 基因的 cDNA 全长(结果见 GenBank 登录号: KU189143~KU189169),其包括 1 608 bp 开放阅读框,编码 535 个氨基酸。该基因由 5 个外显子组成,其中外显子 1 为 822 bp、外显子 2 为 217 bp、外显子 3 为 148 bp、外显子 4 为 182 bp、外显子 5 为 239 bp。相比之下,外显子 1 的碱基变异位点数目最多(97 个),其次是外显子 5(33 个);而从核苷酸变异率(变异核苷酸数与总核苷酸数之比)看,外显子 5 最高(13.81%),其次是外显子 1(11.80%)。外显子 1 和外显子 5 的平均核苷酸差异指数和核苷酸多样性也均较高,而外显子 2~4 的核苷酸差异指数和核苷酸多样性均较低,且数值较为接近,具体如表 1 所示。

通过非同义替换率(d_N)与同义替换率(d_s)的比值(ω 值)来观察每个外显子所受选择压力(表 1),结果表明:各外显子的 ω 值均小于 1(0.10~0.67),表现为净化选择。

2.2 体色间的遗传变异与选择压力分析

在 5 种体色之间,“全红”和“麻花”两种体色酪氨酸酶基因的核苷酸变异率高于其他 3 种体色;有黑斑体色类型(“大花”、“麻花”、“粉花”)的变异率(8.64%)略高于无黑斑体色类型(“全红”、“粉玉”)的变异率(7.71%),见表 2。平均核苷酸差异指数(k)和核苷酸多样性(π)的变异趋势与上述一致。

通过 ω 值来观察不同体色类型瓯江彩鲤酪

氨酸酶基因的选择压力(表2),发现其 ω 值均小于1(0.12~0.23),表现为净化选择;有黑斑体色类型的酪氨酸酶基因的 ω 值略高于无黑斑体色类型,但差异不显著($P>95%$)。此结果表明,不

同体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因主要受净化选择,有黑斑体色与无黑斑体色瓯江彩鲤在进化过程中所受选择压力相似,也为净化选择。

表1 瓯江彩鲤酪氨酸酶基因5个外显子的遗传变异与选择压力参数
Tab. 1 Genetic variation and selection pressure parameters for the five exons of tyrosinase gene in Oujiang color common carp

外显子 exon	序列长度 the length of the sequence	多态位点数 number of polymorphic sites	平均核苷酸 差异指数 average number of nucleotide differences	核苷酸多样性 nucleotide diversity	非同义替换率 nonsynonymous substitution rate	同义替换率 synonymous substitution rate	ω 值 ω -value
外显子1 exon 1	822	97 (11.80%)	20.801	0.025 3	0.008 2	0.080 1	0.10
外显子2 exon 2	217	16 (7.37%)	2.271	0.010 6	0.009 3	0.013 9	0.67
外显子3 exon 3	148	12 (8.11%)	2.798	0.018 9	0.006 0	0.057 4	0.10
外显子4 exon 4	182	13 (7.14%)	2.453	0.013 5	0.005 8	0.037 5	0.15
外显子5 exon 5	239	33 (13.81%)	7.892	0.033 9	0.021 1	0.068 2	0.31

注:括号中为核苷酸变异率。

Note: The percentage of the variation sites are presented in parenthesis.

表2 5种体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因遗传变异与选择压力参数
Tab. 2 Genetic variation and selection pressure parameters in tyrosinase gene from the five colors patterns of Oujiang color common carp

体色 body color	多态位点数 number of polymorphic sites	平均核苷酸 差异指数 average number of nucleotide differences	核苷酸多样性 nucleotide diversity	非同义替换率 nonsynonymous substitution rate	同义替换率 synonymous substitution rate	ω 值 ω -value	
有黑斑 (with black spots)	大花(DH) 麻花(MH) 粉花(FH) 平均(mean)	41 (2.55%) 106 (6.59%) 79 (4.91%) 139 (8.64%)	10.250 65.500 41.500 36.389	0.006 4 0.040 9 0.025 9 0.022 7	0.003 5 0.017 9 0.012 8 0.010 5	0.015 4 0.111 2 0.064 8 0.060 1	0.23 0.16 0.20 0.17
无黑斑 (without black spots)	全红(QH) 粉玉(FY) 平均(mean)	112 (6.97%) 37 (2.30%) 124 (7.71%)	42.810 18.833 35.800	0.026 7 0.011 7 0.022 4	0.010 8 0.004 3 0.008 7	0.075 4 0.035 0 0.064 3	0.14 0.12 0.14
总平均(mean)		137 (8.52%)	0.013	20.063 0	0.012 0	0.014 2	0.85

注:括号中为核苷酸变异率。

Note: The percentage of the variation sites are presented in parenthesis.

2.3 选择压力位点检测

通过M2a和M8两种模型分别对不同体色酪氨酸酶基因所受的选择压力位点进行检测(表3和表4),发现不同体色间酪氨酸酶基因所受选择压力的似然对数值相似,其正向选择压力位点数也相同,但“全红”体色的正向选择压力位点数最多(7个),其次为“麻花”(3个)、“粉玉”和“粉花”相同(1个)、“大花”未检测出正向选择压力位点;5种体色内的正向选择压力位点的后验概率均小于95%,未达到显著性水平($P>0.05$)。

在3种有黑斑体色彩鲤中,应用M2a模型检测到7个正向选择压力位点,应用M8模型检测到8个正向选择压力位点;而两种无黑斑体色彩鲤中,使用M2a模型和M8模型均检测到10个正

向选择压力位点(表3)。当5种体色合并检测时,在M8模型中检测到第79位氨基酸受到了显著的正向选择压力(后验概率为95.4%)。

进一步分析上述受到正向选择压力的氨基酸位点在各外显子的分布情况(表4),研究发现:受到正向选择压力的80个氨基酸位点中,精氨酸(R)被检测出的频率最高(占17.5%);其次为谷氨酸(Q)、丝氨酸(S)、亮氨酸(L),均占12.5%,表明这几个氨基酸位点较容易受正向选择压力。此外,受正向选择压力的氨基酸位点主要分布于外显子1和外显子5,“全红”体色酪氨酸酶基因氨基酸位点所受选择压力较强;无黑斑体色的氨基酸位点所受正向选择压力高于有黑斑体色。

表 3 5 种体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因的氨基酸选择性位点检测结果
 Tab.3 Positively selected amino acid sites on tyrosinase gene from the five color patterns of Oujiang color common carp

体色 body color	模型 model	似然值对数 lnL	参数估计 parameter estimates	正向选择压力位点 sites under positive selection
大花 DH	M2a	-2 411.318 2	$\omega_0 = 0.247\ 78, p_0 = 1$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0$ $\omega_2 = 1, p_2 = 0$	
	M8	-2 411.320 6	$p_0 = 0.999\ 99, p = 32.669\ 0$ $p_1 = 0.000\ 01, q = 99.000\ 0$ $\omega = 1.000\ 00$	
麻花 MH	M2a	-2 682.999 1	$\omega_0 = 0.073\ 08, p_0 = 0.901\ 75$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.043\ 35$ $\omega_2 = 1.000\ 00, p_2 = 0.054\ 90$	79 (0.535)、 155 (0.583)、 505 (0.614)
	M8	-2 682.949 1	$p_0 = 0.999\ 99, p = 0.166\ 72$ $p_1 = 0.000\ 01, q = 0.851\ 28$ $\omega = 1.000\ 00$	79 (0.631)、 155 (0.709)、 505 (0.741)
有黑斑 with black spots	粉花 FH	M2a	$\omega_0 = 0.163\ 76, p_0 = 0.973\ 80$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.013\ 35$ $\omega_2 = 1.000\ 00, p_2 = 0.012\ 86$	504 (0.568)
		M8	$p_0 = 0.999\ 99, p = 1.497\ 65$ $p_1 = 0.000\ 01, q = 6.482\ 29$ $\omega = 1.000\ 00$	504 (0.682)
平均 mean	M2a	-3 112.754 3	$\omega_0 = 0.129\ 52, p_0 = 0.916\ 60$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.000\ 00$ $\omega_2 = 1.596\ 73, p_2 = 0.083\ 39$	79 (0.727)、111 (0.556)、 116 (0.538)、312 (0.547)、 423 (0.584)、493 (0.589)、503 (0.549)
	M8	-3 112.754 5	$p_0 = 0.918\ 05, p = 14.952\ 8$ $p_1 = 0.081\ 95, q = 99.000\ 00$ $\omega = 1.606\ 50$	79 (0.788)、111 (0.613)、116 (0.599)、 155 (0.565)、312 (0.604)、423 (0.637)、 493 (0.641)、503 (0.608)
全红 QH	M2a	-2 938.620 9	$\omega_0 = 0.034\ 11, p_0 = 0.913\ 76$ $\omega_1 = 1.000\ 0, p_1 = 0.083\ 04$ $\omega_2 = 6.737\ 39, p_2 = 0.003\ 21$	31 (0.676)、79 (0.859)、 155 (0.616)、157 (0.728)、 308 (0.591)、336 (0.641)、 505 (0.664)
	M8	-2 938.52	$p_0 = 0.996\ 20, p = 0.003\ 80$ $p_1 = 0.075\ 91, q = 0.607\ 54$ $\omega = 6.526\ 61$	31 (0.763)、79 (0.942)、 155 (0.711)、157 (0.806)、 308 (0.688)、336 (0.731)、 505 (0.751)
无黑斑 without black spots	粉玉 FY	M2a	$\omega_0 = 0, p_0 = 0.908\ 71$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.000\ 80$ $\omega_2 = 1.412\ 19, p_2 = 0.090\ 49$	223 (0.754)
		M8	$p_0 = 0.908\ 75, p = 0.005\ 00$ $p_1 = 0.091\ 25, q = 2.228\ 40$ $\omega = 1.408\ 71$	223 (0.800)
平均 mean	M2a	-3 228.068 7	$\omega_0 = 0.031\ 52, p_0 = 0.916\ 82$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.080\ 08$ $\omega_2 = 4.856\ 32, p_2 = 0.031\ 00$	31 (0.764)、79 (0.815)、155 (0.550)、 157 (0.679)、223 (0.524)、308 (0.513)、 336 (0.554)、499 (0.560)、 504 (0.563)、505 (0.609)
	M8	-3 227.826	$p_0 = 0.994\ 91, p = 0.079\ 94$ $p_1 = 0.005\ 09, q = 0.700\ 17$ $\omega = 4.453\ 47$	31 (0.905)、79 (0.937)、155 (0.659)、 157 (0.789)、223 (0.629)、308 (0.617)、 336 (0.662)、499 (0.667)、 504 (0.667)、505 (0.719)
总平均 mean	M2a	-3 216.247 7	$\omega_0 = 0.078\ 75, p_0 = 0.927\ 19$ $\omega_1 = 1.000\ 00, p_1 = 0.034\ 86$ $\omega_2 = 1.000\ 00, p_2 = 0.037\ 95$	31 (0.506)、79 (0.814)、111 (0.592)、 116 (0.519)、157 (0.604)、423 (0.555)、 493 (0.572)、502 (0.621)、503 (0.524)
	M8	-3 216.217	$p_0 = 0.997\ 69, p = 0.319\ 09$ $p_1 = 0.002\ 31, q = 1.973\ 03$ $\omega = 6.252\ 76$	31 (0.578)、 79 (0.954) 、111 (0.694)、 116 (0.596)、155 (0.517)、157 (0.718)、 312 (0.502)、423 (0.649)、493 (0.674)、 497 (0.518)、502 (0.779)、503 (0.604)

注:括号内值为经 BEB 检测的后验概率,加粗字体的位点表示其后验概率大于 95%。

Note: The posterior probabilities from BEB standard are presented in parenthesis. The bold letter showed the site with posterior probabilities more than 95%.

表 4 5 种体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因所受选择压力的氨基酸种类

Tab. 4 Positively selected amino acids in tyrosinase gene from the five color patterns of Oujiang color common carp

体色 body color		模型 model	正向选择压力位点 sites under positive selection																
			exon 1					exon 3			exon 4		exon 5						
			20	31	79	111	116	155	157	223	308	312	336	423	493	499	502	503	504
有黑斑 with black spots	大花 DH	M2a M8																	
	麻花 MH	M2a M8			R			T											T
	粉花 FH	M2a M8			R			T											T
	平均 mean	M2a M8			Q	N	Q				P		F		T			L	
					Q	N	Q	V			P		F		T			L	
					Q	N	R	V	S		N	S							L
无黑斑 without black spots	全红 QH	M2a M8		R	Q			V	S		N	S							L
	粉玉 FY	M2a M8		R	Q			V	S		N	S							L
	平均 mean	M2a M8	R		Q			V	S	I	N	S			E			R	L
			R		Q			V	S	I	N	S			T	E		R	L
总平均 mean	M2a	R		Q	N	R	V	S		N		F				R	L		
	M8	R		Q	N	R	V	S		N		F		T		R	L		

注:加粗字体的位点表示其后验概率大于 95%。

Note: The bold letter shows the sites have more than 95% posterior probabilities.

3 讨论

选择压力是驱使生物群体遗传进化的主要动力,不同的选择压力可能导致群体不同的进化方向。瓯江彩鲤在至今 1 200 余年的自然选择与人工选择过程中,形成了“全红”、“大花”、“麻花”、“粉玉”和“粉花”5 种基本体色。近 10 余年来,上海海洋大学与浙江龙泉省级瓯江彩鲤良种场合作对瓯江彩鲤这 5 种体色进行了有目的高强度的人工选育,形成了一定强度的选择压力。但通过本研究的结果看,不同体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因的变异率较为接近,特别是有黑斑体色和无黑斑体色的平均核苷酸差异指数和平均核苷酸多样性较为接近,表明人工选育对这 5 种体色类型的压力较为平均和平行。

基因编码区在生物的长期进化过程中可能存在一定差异^[17],基因不同外显子在进化过程中可能受到不同的选择压力^[18-20]。本研究首先采用瓯江彩鲤酪氨酸酶基因 5 个外显子的 d_N/d_S 值(ω 值)的方法来分析其所受选择压力情况。研究发现:5 个外显子的 ω 值均小于 1,说明 5 个外显子均处于净化选择。KAMATH 和 GETZ^[21] 研究指出:在长期的进化过程中选择压力不可能一直效应于整个基因中,而是作用于某些特殊效用位点上,如某个基因编码区域的部分位点。因

此,本研究采用位点特异模型对编码区序列进行正向选择压力位点检测,发现受正向选择压力的位点大多集中于外显子 1,表明酪氨酸酶基因的外显子 1 较容易受正向选择压力影响,这与胡建尊^[9]报道的结果一致。

通过比较有黑斑和无黑斑体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因 d_N/d_S 值,发现其均小于 1,且比值相近,主要表现为净化选择。通过位点模型检测选择压力位点显示:无黑斑体色瓯江彩鲤酪氨酸酶基因所受正向选择压力位点较多,表明无黑斑体色较容易受正向选择压力影响,这可能与酪氨酸酶基因在黑色皮肤中高表达^[22]有关。在 5 种体色中,只发现第 79 位氨基酸(Q,谷氨酸)位点为显著的正向选择压力位点,其他受正向选择压力的位点均未达到显著水平,表明瓯江彩鲤酪氨酸酶基因对人工选择的响应较低,原因可能有以下几个方面:一是酪氨酸酶基因的蛋白功能重要^[23-25],氨基酸序列比较保守^[26-28];二是瓯江彩鲤选育世代较短,人工选择压力力度不够大。此外,黑色素合成通路研究^[29]表明,体表黑斑由多基因控制,在黑色素合成中除作为限速基因的酪氨酸酶基因外,还包括起着类似开关作用的 *MC1R*^[30] 和 *agouti*^[31] 等黑色素相关基因,以及处于调控地位的小眼相关转录因子(*MITF*)^[32] 的共同参与,体色纯度为标准的人工选择压力可能未

集中于酪氨酸酶基因。

综上所述,瓯江彩鲤酪氨酸酶基因在人工选择条件下较保守,主要受净化选择作用,当前的人工选育未对该体色相关基因造成显著的选择压力。然而,本研究因样本数量有限,鱼类体色相关基因众多,有必要更系统地对不同体色瓯江彩鲤选择压力的差异开展研究。

参考文献:

- [1] 王成辉. 中国红鲤遗传多样性研究[D]. 上海:上海水产大学, 2002.
WANG C H. Study on genetic diversity of red common carps in China [D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2002.
- [2] 王成辉, 李思发, 曾伟光, 等. 瓯江彩鲤体色与生长的遗传—环境互作分析[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(2): 103–106.
WANG C H, LI S F, ZENG W G, et al. Genotype-environment interaction analysis from the body color and growth character in Oujiang color common carp, *Cyprinus carpio* var. *color* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2004, 13(2): 103–106.
- [3] 毕详, 项松平, 王剑, 等. 瓯江彩鲤配套选育系繁殖性状的配合力测定与杂交优势分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 775–783.
BI X, XIANG S P, WANG J, et al. Combining ability and heterosis analysis for reproductive traits of complete set selection lines in Oujiang color common carp, *Cyprinus carpio* var. *color*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(5): 775–783.
- [4] 吕耀平, 王成辉, 胡则辉, 等. “全红”瓯江彩鲤不同世代间的遗传结构及遗传分化初步分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 65–71.
Lü Y P, WANG C H, HU Z H, et al. Preliminary analysis of genetic structure and differentiation among the selected populations of “Whole Red” patterns of *Cyprinus carpio* var. *color*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 65–71.
- [5] 朱丽艳. 瓯江彩鲤配套选育系生长和生理性状的遗传效应研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2013.
ZHU L Y. Genetic effects analysis on growth and physiological traits in the complete set lines of Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [6] GIEBEL L B, STRUNK K M, SPRITZ R A. Organization and nucleotide sequences of the human Tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment[J]. Genomics, 1991, 9(3): 435–445.
- [7] KOGA A, HORI H. The Tol2 transposable element of the medaka fish: an active DNA-based element naturally occurring in a vertebrate genome [J]. Genes & Genetic Systems, 2001, 76(1): 1–8.
- [8] 杨新鑫, 王成辉, 马玉清, 等. 瓯江彩鲤酪氨酸酶基因的克隆与序列分析[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(1): 14–20.
YANG X X, WANG C H, MA Y Q, et al. Cloning and sequence analysis of tyrosinase gene in Oujiang color common carp[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(1): 14–20.
- [9] 胡建尊. 瓯江彩鲤体色相关基因 MC1R 的克隆, 表达和 TYR 的选择压力分析[D]. 上海:上海海洋大学, 2013.
HU J Z. Cloning, expression for pigmentation gene-MC1R and selection pressure analysis for pigmentation genes-TYR in Oujiang color common carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [10] LALITHA S. Primer premier 5 [J]. Biotech Software & Internet Report, 2000, 1(6): 270–272.
- [11] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95–98.
- [12] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [13] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [14] SUZUKI Y, GOJOBOR T. A method for detecting positive selection at single amino acid sites [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(10): 1315–1328.
- [15] YANG Z H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1586–1591.
- [16] ANISIMOVA M, BIELAWSKI J P, YANG Z H. Accuracy and power of Bayes prediction of amino acid sites under positive selection [J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(6): 950–958.
- [17] 梁春花, 刘霞, 罗玉柱, 等. 甘肃河西地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的遗传变异研究[J]. 华北农学报, 2015, 30(2): 22–27.
LIANG C H, LIU X, LUO Y Z, et al. Genetic variation study of *NGB* gene exon 4 of simmental cattle hybrid Taxon in Gansu Hexi Regions[J]. Acta Hydrobiologica Boreali-Sinica, 2015, 30(2): 22–27.
- [18] ANISTOROEI R, FREDHOLM M, CHRISTENSEN K, et al. Albinism in the American mink (*Neovison vison*) is associated with a *tyrosinase* nonsense mutation [J]. Animal Genetics, 2008, 39(6): 645–648.
- [19] 张浩, 王娟. 不同物种 TYR 基因外显子 1 序列的生物信息分析[J]. 中兽医学杂志, 2014, (7): 53–54.

- ZHANG H, WANG J. Biological information analysis of exon 1 of TYR gene in different species [J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2014, (7): 53 - 54.
- [20] 周贤龙, 王小兰, 王武源, 等. 荠菜 LEAFY 同源基因的克隆与进化分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14 (2): 113 - 119.
- ZHOU X L, WANG X L, WANG W Y, et al. Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of LEAFY gene in *capsella bursa-pastoris* (Cruciferae) [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2006, 14(2): 113 - 119.
- [21] KAMATH P L, GETZ W M. Adaptive molecular evolution of the major histocompatibility complex genes, DRA and DQA, in the genus *Equus* [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11(1): 128.
- [22] 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.
- 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.
- [23] NELSON J M, DAWSON C R. Tyrosinase [M]//NORD F F, WERKMAN C H. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 4. New York: Interscience Publishers, Inc., 1944: 99 - 152.
- [24] 刘丽, 席冬梅, 陈亮, 等. 酪氨酸酶基因遗传变异的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 115 - 120.
- LIU L, XI D M, CHEN L, et al. Genetic variations of the tyrosinase gene [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(12): 115 - 120.
- [25] WANG N, HEBERT D N. Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life [J]. Pigment Cell Research, 2006, 19(1): 3 - 18.
- [26] 李青芝, 陈宇旭, 周琳, 等. 脊椎动物 TYR 基因的序列特征与正选择位点鉴定 [J]. 广东农业科学, 2014, 41 (23): 131 - 137.
- LI Q Z, CHEN Y X, ZHOU L, et al. Sequence features and selective pressure of the TYR genes in vertebrates [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41 (23): 131 - 137.
- [27] 朱志明, 郑嫩珠, 缪中纬, 等. 鸭 TYR 基因序列的克隆与分析 [J]. 福建农业学报, 2008, 23(3): 247 - 250.
- ZHU Z M, ZHENG N Z, MIAO Z W, et al. Cloning and sequence analysis of duck TYR Gene [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2008, 23(3): 247 - 250.
- [28] 丁波, 张亚平. 灵长类酪氨酸酶基因外显子 1 序列进化研究 [J]. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(4): 524 - 526.
- DING B, ZHANG Y P. Molecular evolution of exon 1 of tyrosinase gene in primates [J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 1998, 37(4): 524 - 526.
- [29] HOEKSTRA H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates [J]. Heredity, 2006, 97 (3): 222 - 234.
- [30] 于云柱, 何奕多, 刘丽, 等. 黑素皮质素受体 1 (MC1R) 基因的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(6): 232 - 233.
- YU Y Z, HE Y D, LIU L, et al. Progress in the research on the gene of the MC1R gene [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(6): 232 - 233.
- [31] TAYLOR N J, REINER A S, BEGG C B, et al. Inherited variation at MC1R and ASIP and association with melanoma-specific survival [J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(11): 2659 - 2667.
- [32] HARTMAN M L, CZYZ M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(7): 1249 - 1260.

Selection pressure analysis of tyrosinase (*TYR*) gene in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)

GU Zhenzhen¹, YANG Xinxin¹, HU Jianzun¹, XIANG Songping², WANG Jian³, WANG Jun¹, XU Zhibin², WANG Chenghui¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Longquan Water Conservancy and Hydropower Bureau in Longquan City, Longquan 323700, Zhejiang, China; 3. The Provincial Farm of Oujiang Color Common Carp, Longquan 323700, Zhejiang, China)

Abstract: Tyrosinase (*TYR*) is a key and rate-limited enzyme in melanin synthesis pathway. Black spots are one of the main body color characteristics in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*). In this study, the total of the fifth generations of Oujiang color common carp (F_5) were used to observe the variation and selective pressure sensitivity of tyrosinase (*TYR*) gene among the five exons in this gene and among the five body color patterns in this fish. The results showed: the nucleotide variation rate and the number of their positive selection sites in exon 1 and exon 5 were higher than those of the other three exons, indicating these two exons were more easily subjected to selective pressure. The ratios (ω) of d_N/d_S of the five exons were all less than 1 (0.10 – 0.67), which demonstrated there was purifying selection conducted in tyrosinase gene. Similarly, the ratio ($\omega = 0.12 - 0.23$) illustrated there was also purifying selection in the five body color patterns of Oujiang color common carp. The amino acid site analysis of selection pressure using the Codeml models (M2a and M8) in the software PAML indicated that there were more positive selection sites in the fish without black spots than the fish with black spots, although there was no significant difference ($P > 0.05$). Furthermore, some amino acid sites were also found with more easily positive selection than the other acids in tyrosinase gene. Generally, tyrosinase gene was conservative in evolutionary process and mainly subjected to purifying selection in Oujiang color common carp, and no significant selection pressure on this gene was found under artificial selection in this fish.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *color*; tyrosinase gene; selection pressure; genetic variation