

文章编号: 1674-5566(2019)05-0708-08

DOI:10.12024/jsou.20190502632

黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞和鳞片形态的比较

彭康康, 张 博, 鲍宝龙, 龚小玲

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 牙鲆无眼侧色素沉着过多的黑化现象, 在人工养殖群体中普遍存在, 目前对于牙鲆黑化产生的机制尚不清楚。为了深入研究牙鲆黑化现象的作用机制, 对黑色素细胞和鳞片的形态描述和比较分析是必要的。通过对黑化牙鲆各部位皮肤的黑色素细胞和鳞片形态学观察发现: (1) 黑化牙鲆的无眼侧白色皮肤未发现黑色素细胞存在, 但无眼侧黑化皮肤出现了“成体型黑色素细胞”, 并存在“仔鱼型黑色素细胞”, 无眼侧黑色素细胞的密度显著低于有眼侧正常皮肤 ($P < 0.05$); (2) 黑化牙鲆的无眼侧黑化皮肤的鳞片为栉鳞, 无眼侧正常皮肤的鳞片为圆鳞; 黑化牙鲆有眼侧正常皮肤栉鳞栉齿数都在 5 栉齿以上, 而无眼侧黑化部位的栉鳞栉齿数都在 5 栉齿以下, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); (3) 黑色素细胞的密度和栉鳞栉齿数显著相关 ($P < 0.05$), 黑色素细胞密度越高, 栉齿数量越多; (4) 采用荧光定量的方法检测了黑化牙鲆无眼侧黑化皮肤和无眼侧正常皮肤中视黄酸合成酶相关基因 (*RALDH1*、*RALDH2*、*RALDH3*) 的表达, 发现 *RALDH1* 和 *RALDH3* 在无眼侧黑化部位的表达量显著高于无眼侧正常部位 ($P < 0.05$), *RALDH2* 则无显著性差异 ($P < 0.05$)。研究结果表明牙鲆黑色素细胞形成与栉鳞发生存在相关性, 与视黄酸合成酶 *RALDH1*、*RALDH2* 的表达有关。

关键词: 牙鲆; 黑化; 黑色素细胞; 鳞片; 视黄酸

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等比目鱼作为优质的海水经济鱼类已在我国北方规模化养殖, 但在比目鱼类人工繁育的群体中常发现部分体色异常的个体, 这已经成为我国乃至世界人工养殖牙鲆面临的一个重大的、也是亟待解决的问题。

牙鲆体色异常可划分为白化 (albinism) 和黑化 (hypermelanism) 两种主要类型: “白化”指的是有眼侧出现白斑即黑色素细胞或色素颗粒减少; “黑化”指的是无眼侧出现黑斑即黑色素细胞增加。近年来有关体色异常的研究很多, 牙鲆的养殖环境如光照强度、水流速度、水深、水温、养殖密度、底质等^[1-6], 还有营养因素对牙鲆体色异常有明显影响^[7-12]。这些研究对于改善牙鲆体色异常有一定的效果, 深入调研体色异常的形态学变化、机理是解决问题的基础。牙鲆在生长周期中会出现两种类型的黑色素细胞, 仔鱼型黑色素细胞 (变态前) 和成体型黑色素细胞 (变态后)。牙

鲆变态后, 色素前体细胞在有眼侧发育成成体型黑色素细胞, 而在无眼侧则会萎缩溶解使无眼侧皮肤呈白色。相较于仔鱼型黑色素细胞, 成体型黑色素细胞更小更圆润, 仔鱼型黑色素细胞有很多的树突^[13]; 有眼侧鳞片都为栉鳞, 无眼侧鳞片都为圆鳞^[14]。近年来研究表明在黑化牙鲆无眼侧的黑化区域中出现了成体型黑色素细胞以及栉鳞, 非黑化区域正常^[13]。在部分白化的牙鲆中, 有眼侧的白化区域中发现圆鳞代替栉鳞并且缺少成体型黑色素细胞^[15]。笔者对成年黑化牙鲆不同部位的黑色素细胞和鳞片进行更为详细的观察和统计, 一方面重新确认前人的研究成果并更加详细地检查黑色素细胞和鳞片的特征, 另一方面探寻黑色素细胞形成和鳞片发育的联系。由于视黄酸能促进牙鲆黑色素细胞的形成^[16], 通过荧光定量的方法调查了视黄酸合成酶相关基因在黑化牙鲆不同部位皮肤的表达, 了解视黄酸

收稿日期: 2019-04-05 修回日期: 2019-08-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31872546)

作者简介: 彭康康 (1993—), 男, 硕士生, 研究方向为鱼类生物学。E-mail: pengkkk@163.com

通信作者: 龚小玲, E-mail: xlgong@shou.edu.cn

在黑化过程中的作用。

1 材料与方法

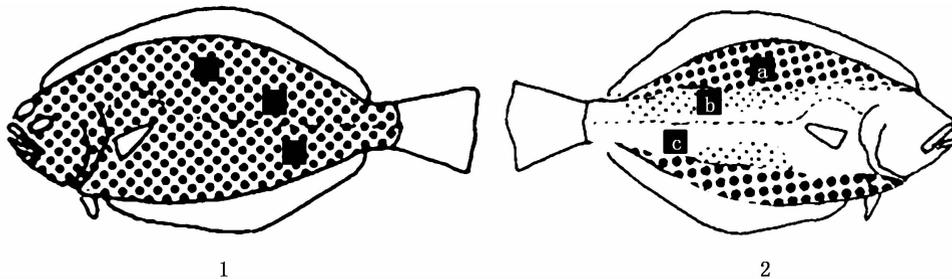
1.1 黑化牙鲆的采集

120 日龄的鲜活黑化牙鲆采集自唐山市维卓水产养殖有限公司, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 黑色素细胞临时装片的制作及观察

选择 3 尾规格一致、黑化部位相同的牙鲆样本解冻后,分别取 1 cm^2 大小的无眼侧黑化、无眼侧白色、无眼侧黑化过渡阶段(正常与黑化皮肤交界部位)以及对应无眼侧黑化的有眼侧黑色皮

肤(鳞片不去除)(图 1),用中性树脂制成临时装片^[17]。若皮肤不舒展,可将皮肤放在 0.9% 的生理盐水中舒展片刻,再制作临时装片。每尾鱼每个部位制作 3 张,将制好的装片放在 1×11.25 倍尼康体视显微镜下拍照,每平方厘米皮肤取 3 个视野进行黑色素细胞计数并进行统计分析。利用 SPSS 18.0 软件对每尾鱼背腹部黑色素细胞进行单因素方差分析,设定显著水平为 0.05,当 $P < 0.05$ 时为差异显著,当 $P < 0.01$ 时为差异极显著。



1. 有眼侧; 2. 无眼侧. a. 黑化皮肤; b. 黑化过渡皮肤; c. 正常皮肤

1. ocular side; 2. blind side. a. melanized skin; b. the skin near the melanized skin; c. the normal skin

图 1 黑化牙鲆有眼侧和无眼侧的采样部位

Fig. 1 Collecting positions on the ocular side and blind side of Japanese flounder

1.3 鳞片装片的制作及观察

用于黑色素细胞观察的临时装片直接染色后作为鳞片观察的装片,染色参照刘小玉等^[18],步骤如下:用磷酸缓冲液(PBS)浸洗 3 次,每次 15~20 min,然后用 0.1% 茜素红-Tris-Hcl 试剂(pH 8.3)染色 30 min,最后用 PBS 清洗 3 次,每次 20 min。染色后的样本置于 4 倍尼康体视显微镜下拍照。对鳞片类型、栉鳞的栉齿数进行比较。

1.4 检测视黄酸合成酶基因的表达

利用 Trizol 法提取黑化牙鲆样本无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常白皮肤、有眼侧正常皮肤组织 RNA,提取方法参见陈洁等^[19]的方法。以提取的 RNA 为模板,按反转录 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 说明书合成 cDNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。3 种视黄醛脱氢酶(*RALDH1*, *RALDH2*, *RALDH3*)的 RT-PCR 引物序列见表 1,以 β -actin 为参照基因。选择 BioLabs 公司的 Luna Universal qPCR Master Mix 试剂进行荧光定量 PCR 反应,PCR 反应体系 $20\text{ }\mu\text{L}$: Luna

Universal qPCR Mix $10\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $< 100\text{ ng}$, 加无 RNA 酶水到 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。每个基因每个样品做 3 组平行。PCR 程序:初始变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s,延伸 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(40 个循环),溶解 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s。采用 7500 Software v2.3 软件进行溶解曲线分析,计算 Ct 值。相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法,其数值用平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示, $n = 3$ 。

2 结果

2.1 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞类型

在黑化牙鲆的有眼侧只存在成体型黑色素细胞(细胞小且树突很少),未观察到仔鱼型黑色素细胞(细胞大且树突较多);无眼侧的黑化部位既存在成体型黑色素细胞也存在仔鱼型黑色素细胞,成体型黑色素细胞为主要类型;在无眼侧的黑化过渡部位(正常与黑化皮肤交界区域)也同时存在两种类型的黑色素细胞,仔鱼型黑色素细胞占主要类型;在黑化牙鲆无眼侧的正常部位

(皮肤白色)未发现任何类型的黑色素细胞。见图 版I。

表 1 RT-PCR 实验所用引物序列

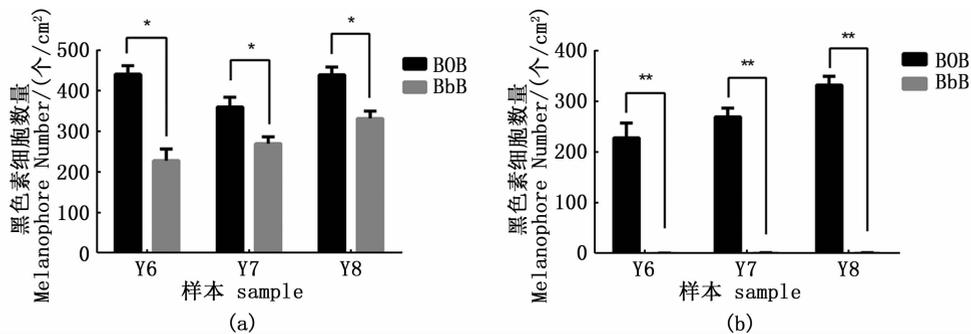
Tab.1 Nucleotide sequences of oligonucleotide primers for RT-PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	退火温度	片段 bp
Gene	Forward primer	Reverse primer	Tm/°C	Product
β -actin	GGAAATCGTGCCTGACATTAAG	CCTCTGGACAACGGAACCTCT	60	161
RALDH1	ACAAAATGGGAGGGGAAGAC	AGTTCACGGTATGATCTGTCC	60	121
RALDH2	GCAGACGACCTCTCTCCGATG	CCTCTCTGCAACCCAGCTACTG	60	151
RALDH3	GCCTCTTCATTCAACCCACCATCTT	CTCTCGTCCAATGCGCTGACATCTTAC	60	296

2.2 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞数量统计分析

通过对黑化牙鲆有眼侧正常黑色皮肤、无眼侧黑化皮肤、无眼侧正常白皮肤黑色素细胞的数量统计可以看出:有眼侧正常黑皮肤的黑色素细

胞数量比无眼侧黑化皮肤的多,且差异显著(图 2a; $P < 0.05$);无眼侧黑化皮肤的黑色素细胞比无眼侧正常白皮肤的多,且差异极显著(图 2b; $P < 0.01$)。



Y6, Y7, Y8 为黑化牙鲆样本编号; BOB. 黑化牙鲆有眼侧正常皮肤; BbB. 黑化牙鲆无眼侧黑化皮肤; BbC. 黑化牙鲆无眼侧正常白皮肤; *: 表示差异显著($P < 0.05$); **: 表示差异极显著($P < 0.01$)

Y6, Y7, Y8. the sample number of hypermelanosis specimens; BOB. normal skin on the ocular side; BbB. melanized skin on the blind side; BbC. normal skin on the blind side; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

图 2 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞数量统计

Fig. 2 The number of melanophore in different parts of the hypermelanosis specimens

2.3 黑化牙鲆不同部位鳞片的类型

对黑化牙鲆各部位鳞片进行观察和分类:有眼侧正常黑皮肤上均为栉鳞(图版 II-1);无眼侧黑化部位既有栉鳞又有圆鳞,栉鳞的数量多于圆鳞(图 II-2);在无眼侧过渡部位同样既有栉鳞又有圆鳞,但栉鳞数目比圆鳞少很多(图 II-3);在无眼侧正常白皮肤上均为圆鳞(图 II-4)。

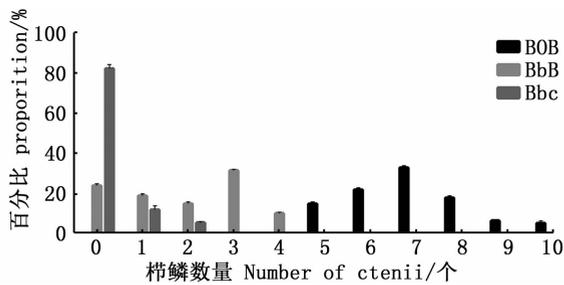
2.4 黑化牙鲆不同部位栉鳞栉齿

随机选取黑化牙鲆有眼侧正常、无眼侧黑化部位、无眼侧白化向黑化过渡部位的鳞片各 100 枚,对鳞片栉齿数目进行统计分析。可以发现,不同部位鳞片的类型和栉齿数目差别明显,有眼侧正常皮肤鳞片均为栉鳞,每枚鳞片栉齿数都在 5 个以上,7 栉齿的栉鳞数量占比最多(34%)。

无眼侧黑化部位中,存在圆鳞和栉鳞两种类型的鳞片,栉鳞占比 76%,圆鳞占比 24%;栉鳞中,栉齿数目均在 4 枚以下,栉齿为 3 枚的鳞片最多(32%);无眼侧黑化过渡部位,也存在圆鳞和栉鳞两种类型,栉鳞仅占 17%,圆鳞占比 83%,栉鳞栉齿的数目少且均不超过 2 枚(图 3)。

2.5 视黄酸合成酶基因的表达

检测 3 个视黄酸合成酶相关基因(*RALDH1*、*RALDH2*、*RALDH3*)在黑化牙鲆无眼侧黑化、无眼侧正常白色皮肤的表达,结果表明:*RALDH1* 和 *RALDH3* 的表达量无眼侧黑化部位高于无眼侧正常部位,且差异显著($P < 0.05$);*RALDH2* 的表达量无眼侧黑化部位与无眼侧正常部位无显著性差异($P > 0.05$,图 4)。

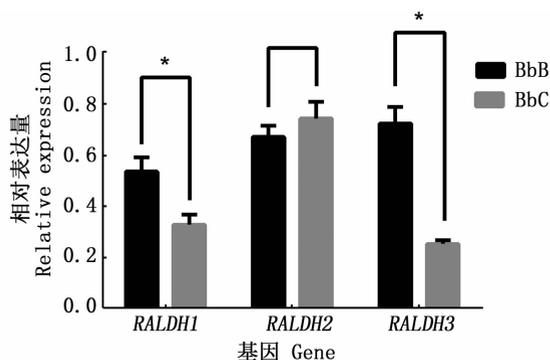


BOB. 黑化牙鲈有眼侧正常黑皮肤; BbB. 黑化牙鲈无眼侧黑化皮肤; BbC. 黑化牙鲈无眼侧正常皮肤

BOB. normal skin on the ocular side; BbB. melanized skin on the blind side; BbC. normal skin on the blind side

图3 黑化牙鲈各部位鳞片的栉齿数量占比

Fig. 3 The proportion of ctenii in the scales of the hypermelanosis specimens



BbB. 黑化牙鲈无眼侧黑化皮肤; BbC. 黑化牙鲈无眼侧正常皮肤。“*”:表示差异显著($P < 0.05$); “**”:表示差异极显著($P < 0.01$)

BbB. melanized skin on the blind side; BbC. normal skin on the blind side. “*”: $P < 0.05$; “**”: $P < 0.01$

图4 3个视黄酸合成酶基因的表达特征

Fig. 4 Expression characteristics of the RALDHs

3 讨论

3.1 黑化牙鲈不同部位黑色素细胞特征

正常牙鲈变态后,有眼侧是成体型黑色素细胞,无眼侧无黑色素细胞。通过对黑化牙鲈不同部位黑色素细胞的观察发现:在黑化牙鲈无眼侧的黑化部位出现成体型黑色素细胞;只在变态前出现的仔鱼型黑色素细胞,这一现象在黑化过渡部位更明显,此部位存在更多的仔鱼型黑色素细胞。HAGA等^[20]也在牙鲈无眼侧黑化部位观察到了这两种类型的黑色素细胞,并认为较大的黑色素细胞为仔鱼型黑色素细胞,但ISOJIMA等^[21]认为较大的黑色素细胞既不是成体型黑色素细

胞也不是仔鱼型黑色素细胞,而是一种发育异常的黑色素细胞,到目前为止对此还无定论。根据观察到的形态,笔者认为较大的树突明显的黑色素细胞是仔鱼型黑色素细胞。无眼侧黑化部位黑色素细胞的密度相较于有眼侧低,且具有显著性差异;无眼侧黑化过渡部位的黑色素细胞密度更低,无眼侧正常白皮肤未观察到黑色素细胞,表明黑化的基础可能是黑色素细胞的出现以及密度的增加,黑色素细胞在有眼侧和无眼侧黑化部位的发育模式并不一样。

3.2 黑化牙鲈不同部位鳞片的特征

在正常牙鲈中,有眼侧鳞片为栉鳞,无眼侧为圆鳞,栉鳞是在圆鳞的基础上长出栉齿然后变为栉鳞^[15]。在牙鲈无眼侧黑化部位鳞片类型发生了变化:牙鲈在无眼侧黑化部位既存在栉鳞,也存在一定比例的圆鳞,在无眼侧黑化过渡部位,也有少量的栉鳞存在,绝大部分都为圆鳞。有研究^[22]表明,栉鳞不会出现在白化牙鲈的白化部位,白化部位圆鳞替代栉鳞;另外,KIKUCHI等^[15]研究发现,在完全黑化的牙鲈中,有眼侧栉鳞的形成与正常牙鲈一样快,然而无眼侧的变化非常缓慢,另外无眼侧和有眼侧圆鳞向栉鳞变化的延伸方向也不同,有眼侧的延伸是从侧线开始的,逐渐向背腹侧延伸(从中间向两边),而无眼侧是从背腹侧边缘向侧线延伸(从两边向中间)。与正常和黑化牙鲈的有眼侧相比,无眼侧黑化部位栉鳞的发育模式与有眼侧栉鳞的发育模式明显不同,但目前是何种因素导致的无眼侧黑化部位栉鳞的意外发育模式还不清楚。

3.3 黑色素细胞密度与鳞片类型之间的关系

黑色素细胞和鳞片类型之间存在紧密联系:有眼侧全部都是栉鳞,无眼侧黑化部位出现栉鳞,无眼侧黑化与正常皮肤交界部位出现栉鳞,无眼侧正常白色皮肤无栉鳞,可以看出栉鳞只出现在有黑色素细胞的部位。黑色素细胞密度与栉鳞栉齿数也紧密相关:有眼侧正常皮肤中黑色素细胞密度最高,此部位全部为栉鳞,并且栉齿数量都在5以上;黑色素细胞密度略低的无眼侧黑化区域,栉鳞栉齿数均在5以下;黑色素细胞密度最低的黑化过渡区域,栉鳞只有1~2个栉齿;无黑色素细胞的无眼侧正常白色皮肤被鳞全部为圆鳞,无栉齿,表明黑色素细胞密度越高,栉鳞栉齿数越多。SEIKAI等^[22]也有类似研究结

果,发现在黑化区域的边缘附近,存在栉鳞并且栉齿数量很少,认为黑色素细胞发育与栉鳞形成之间有一定的联系,黑色素细胞发育为有眼侧状态是鳞片形状变化的前提条件,并提出栉鳞形成的猜想,即首先在牙鲆无眼侧某个区域发生黑色素细胞密度的增加,然后在圆鳞上形成栉齿,最后圆鳞变成栉鳞。KIKUCHI 等^[15]也认为,在无眼侧,导致栉鳞形成的因素只在黑化区域发挥作用。笔者的研究结果符合 ISOJIMA 等^[21]的猜测,证明黑色素细胞密度和鳞片类型之间存在紧密联系,存在共同的驱动力,驱动黑色素细胞密度的增加并导致栉鳞的形成。

3.4 视黄酸合成酶基因的表达分析

SHAO 等^[16]明确发现牙鲆成体型黑色素细胞形成受 9-顺-视黄酸调控, HAMRE 等^[23]也认为黑化可能受到维生素 A 代谢产物视黄酸的影响。检测黑化牙鲆无眼侧黑化和正常皮肤之间的 3 个视黄酸合成酶基因 *RALDH1*, *RALDH2* 和 *RALDH3* 的表达,发现 *RALDH1* 和 *RALDH3* 在黑化区域的表达量高于正常区域,而且差异显著。牙鲆是伏底生活,黑化主要出现在两侧与池底贴合不够紧密的部位,推测由于视黄酸的合成受光线的影响,牙鲆无眼侧黑化部位相较于正常部位可能接收了更多的光线导致视黄酸在两部位分布的浓度不同,进而引起局部黑化,而视黄酸是否调控栉鳞的形成,需要后续更多的研究验证。

参考文献:

- [1] MATSUMOTO J, SEIKAI T. Asymmetric pigmentation and pigment disorders in pleuronectiformes (flounders) [J]. *Pigment Cell Research*, 1990, 3(s2): 275-282.
- [2] IWATA N, KIKUCHI K. Effects of sandy substrate and light on hypermelanosis of the blind side in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1998, 52(1/3): 291-297.
- [3] OTTESEN O H, STRAND H K. Growth, development, and skin abnormalities of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles kept on different bottom substrates [J]. *Aquaculture*, 1996, 146(1/2): 17-25.
- [4] SEIKAI T. Influences of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture Science*, 1991, 39(2): 173-180.
- [5] TAKAHASHI Y I. Influence of stocking density and food at late phase of larval period on Hypermelanosis on the blind body side in juvenile Japanese Flounder [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1994, 60(5): 593-598.
- [6] KANG D Y, KIM H C. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 14-21.
- [7] SEIKAI T. Influence of feeding periods of Brazilian Artemia during larval development of hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* on the appearance of albinism [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1985, 51(4): 521-527.
- [8] MIKI N, TANIGUCHI T, HAMAKAWA H, et al. Reduction of albinism in hatchery-reared flounder hirame *Paralichthys olivaceus* by feeding on rotifer enriched with vitamin-A [J]. *Suisanzoshoku*, 1990, 38(2): 147-155.
- [9] TABATA K. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. *Bulletin of Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station*, 1991, 28: 1-134.
- [10] NAKAMURA K, IIDA H, NAKANO H. Riboflavin in the skin of albinic flatfish *Liopsetta obscura* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1986, 52(12): 2207.
- [11] KANAZAWA A. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1993, 24(2): 162-166.
- [12] DEVRESSE B, LÉGER P, SORGELOOS P, et al. Improvement of flat fish pigmentation through the use of DHA-enriched rotifers and *Artemia* [J]. *Aquaculture*, 1994, 124(1/4): 287-288.
- [13] SEIKAI T, MATSUMOTO J, SHIMOZAKI M, et al. An Association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Pigment Cell Research*, 1987, 1(3): 143-151.
- [14] 王晶, 高磊, 鲍宝龙. 牙鲆、大黄鱼和小黄鱼不同部位鳞片类型的比较 [J]. *动物学杂志*, 2017, 52(5): 850-856.
- [15] WANG J, GAO L, BAO B L. Comparative analysis on scale types from different body part in flounder, large yellow croaker and small yellow croaker [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2017, 52(5): 850-856.
- [16] KIKUCHI S I, MAKINO N. Characteristics of the progression of squamation and the formation of ctenii in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1990, 254(2): 177-185.
- [17] SHAO C W, BAO B L, XIE Z Y, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(1): 119-124.
- [18] 史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析 [J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 45-54.

- SHI X Y, XU Y J, WU N N, et al. Preliminary studies on blind-side Hypermelanosis of *Cynoglossus semilaevis*: chromatophores observation and expression of Proopiomelanocortin [J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 45-54.
- [18] 刘小玉, 刘志伟, 鲍宝龙. 细锯脂鲤背鳍和脂鳍的发育观察和转录组比较分析[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(6): 801-806.
- LIU X Y, LIU Z W, BAO B L. Observation and transcriptomic analysis of the development of dorsal fin and adipose fin in *Pristella maxillaris* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(6): 801-806.
- [19] 陈洁, 鲍宝龙. 牙鲆胚胎阶段 *pax6*, *tbx3* 和 *rx1* 基因的表达[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(3): 321-325.
- CHEN J, BAO B L. Expression of *pax6*, *tbx3* and *rx1* genes during embryonic development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(3): 321-325.
- [20] HAGA Y, NATAAMI K, TAKEUCHI T. Process of true ambicoloration in larval and juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*: an ultrastructural study [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2005, 71(5): 782-790.
- [21] ISOJIMA T, TSUJI H, MASUDA R, et al. Formation process of staining-type hypermelanosis in Japanese flounder juveniles revealed by examination of chromatophores and scales [J]. Fisheries Science, 2013, 79(2): 231-242.
- [22] SEIKAI T. Early development of squamation in relation to color anomalies in hatchery-reared flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1980, 27(3): 249-255.
- [23] HAMRE K, HOLEN E, MOREN M. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses [J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(1): 65-80.

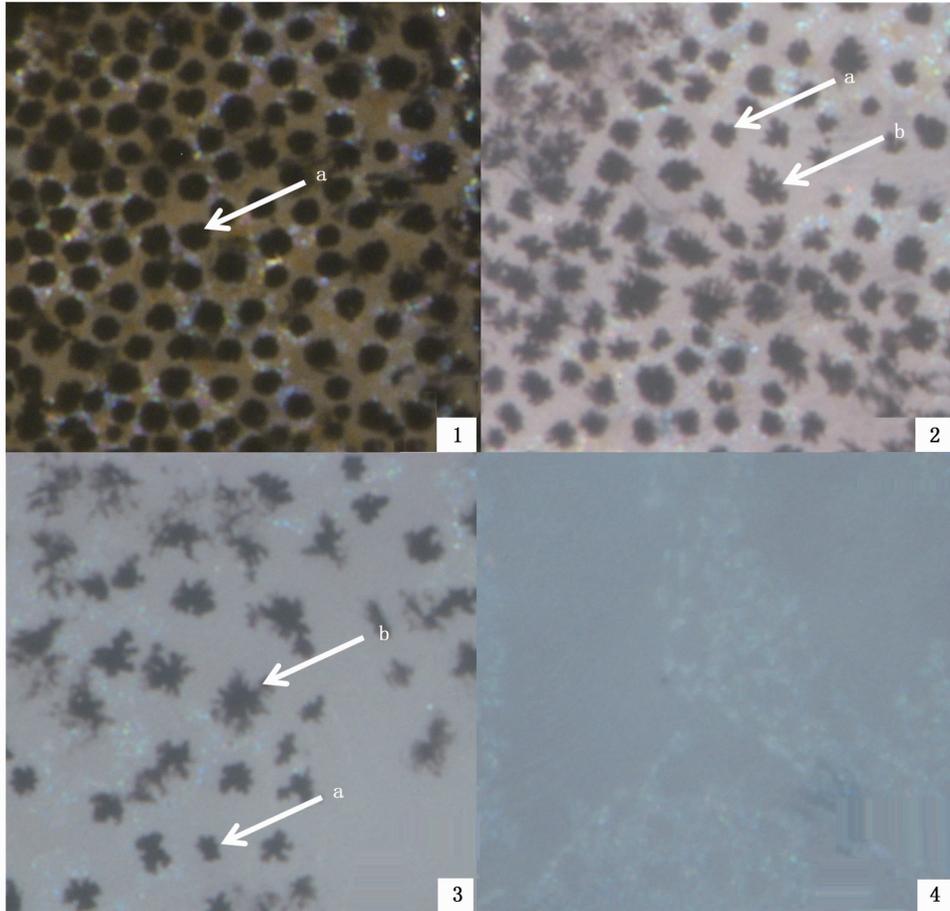
Comparative analysis of skin melanophore and scales in different parts of melanized Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

PENG Kangkang, ZHANG Bo, BAO Baolong, GONG Xiaoling

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Melanism caused by hypermelanosis on the blind side is common in artificial breeding of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). At present, the mechanism of melanism is not clear. This research found that no melanophore are found in the normal skin on blind side, adult melanophore appeared on the melanized blind side of hypermelanosis specimens and the larval-type melanophore were unexpectedly found, the density of melanophore is significantly lower than normal skin on the ocular side; ctenoid scales appear on hypermelanosis skin, and normal skin on the ocular side is still cycloid scales; The number of ctenii on the ocular side was all above 5 ctenii, while the number of ctenii on the melanized blind side was all below 5 ctenii, showing a significant difference. This research found that the density of melanophore was significantly correlated with the number of ctenii. The higher the density of melanophore, the greater number of ctenii. It is presumed that the formation of scales is based on the increase of the density of melanophore. This experiment examined the expression of RALDHs (*RALDH1*, *RALDH2*, *RALDH3*) in the melanized skin and normal skin on the blind side. The results showed that the expression of *RALDH1* and *RALDH3* in the melanized skin was higher than that in the normal skin, and the difference was significant ($P < 0.05$). The expression of *RALDH2* was not significantly different between the two part. The results suggest that there is a correlation between melanism and ctenoid scale in Japanese flounder, and may be related to the synthesis of retinoic acid.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; hypermelanosis; melanophore; scale; retinoic acid

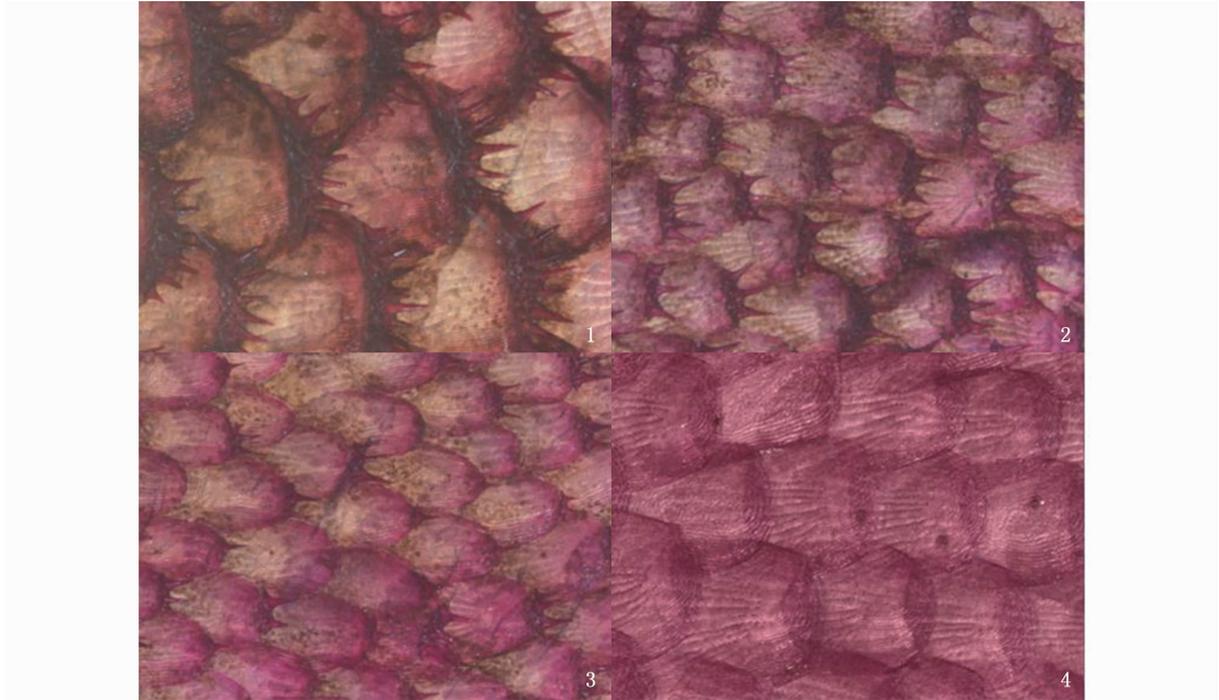


1. 黑化牙鲆有眼侧黑色素细胞; 2. 黑化牙鲆无眼侧黑化皮肤黑色素细胞; 3. 黑化牙鲆无眼侧黑化过渡皮肤黑色素细胞; 4. 黑化牙鲆无眼侧正常皮肤黑色素细胞; a. 成体型黑色素细胞; b. 仔鱼型黑色素细胞

1. melanophore on the ocular side; 2. melanophore on the melanized blind side; 3. melanophore near the melanized skin on the blind side; 4. melanophore on the normal blind side; a. adult-type melanophore; b. larval-type melanophore

图版 I 黑化牙鲆不同部位皮肤黑色素细胞类型

Plate I Melanophore types in different parts of skin in hypermelanosis Japanese flounder



1. 黑化牙鲈有眼侧鳞片; 2. 黑化牙鲈无眼侧黑化部位鳞片; 3. 黑化牙鲈无眼侧黑化过渡部位; 4. 黑化牙鲈无眼侧正常部位鳞片
1. scale on the ocular side; 2. melanophore on the melanized blind side; 3. scale near the melanized skin on the blind side; 4. scale on the normal blind side

图 II 黑化牙鲈不同部位皮肤鳞片类型

Plate II Scales type of skin in different parts of hypermelanosis specimens