

Genetika koi riba

Čorak Grdović, Tomas

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:050703>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tomas Čorak Grdović

Genetika koi riba

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Tomas Čorak Grdović

Koi fish genetics

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu prijediplomskog studija molekularne biologije na zavodu za molekularnu biologiju biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nenada Malenice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Genetika koi riba

Tomas Čorak Grdović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Koi ribe uzgojene su kao pasmine šarana u Japanu kroz zadnjih dvjesto godina. Unatoč njihovoj značajnoj komercijalnoj vrijednosti kao ukrasnih riba odlučujuće karakteristike za vrijednost pojedinih jedinki slabo su definirane te često ostavljene subjektivnoj procjeni sudaca. Kako bi se olakšao uzgoj te ujednačila karakterizacija traženih svojstava provode se istraživanja genetičke osnove istih. Neka od najznačajnijih fenotipskih svojstava uključuju obojenost, uzorke boje po tijelu, karakteristike ljuski, prekrivenost tijela ljuskama te veličinu peraja. Zbog velikog broja različitih pigmentiranih stanica te nedavne duplikacije genoma također služe kao odlični modeli za razna istraživanja u područjima evolucije genoma, embriologije, regulacije ekspresije gena te pigmentacije. U ovom radu napravljen je pregled strukture genoma koi šarana, diferencijalne ekspresije gena poput *Mclr*, *Foxd3* i *Scarbl* te njihove regulacije pomoću miRNA te lncRNA molekula, s naglaskom na *miR-206* za koju je ustanovljeno da diferencijalno regulira ekspresiju gena *Mclr*. Obrađeni su i poznati mehanizmi nasljeđivanja fenotipova te gene kojima su regulirani, negativan utjecaj stroge selekcije te letalnost homozigota za određena tražena svojstva. Napravljen je i pregled razvoja različitih pigmentiranih stanica tijekom embriogeneze te pripadajućih biokemijskih puteva pigmentacije.

Ključne riječi: miRNA, pigmentacija, koi, diferencijalna ekspresija gena
(25 stranica, 12 slika, 0 tablica, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: Hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Koi fish genetics Tomas Čorak Grdović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Koi fish have been developed as carp varieties in Japan throughout the past two hundred years via strict selective breeding. Despite their significant commercial value as ornamental fish, the decisive characteristics for the value of individuals are poorly defined and often left to the subjective assessment of different judges. In order to facilitate breeding and the uniformity of the characterization of valued traits, research on the genetic basis of these traits is being carried out. Some of the most significant traits include the coloration itself, colour patterns throughout the body, the characteristics of the scales, the coverage of the body with scales and the size of the fins. Due to the large number of different pigmented cells and the recent genome duplication event that koi are believed to be part of they also serve as excellent models for various research in the fields of genome evolution, embryology, gene expression regulation and pigmentation. This paper focuses on the overview of the structure of the koi carp genome, differential expression of genes such as *Mclr*, *Foxd3* and *Scarb1* and their regulation by miRNA and lncRNA molecules, especially *miR-206*, which was found to differentially regulate the expression of the *Mclr* gene. The known mechanisms of trait inheritance and the genes by which they are regulated, the negative impact of strict selection and the lethality of homozygotes for certain sought after traits are also discussed, as well as an overview of the development of various pigmented cells during embryogenesis and the associated biochemical pathways of pigmentation.

Keywords: miRNA, pigmentation, koi, differential gene expression
(25 pages, 12 figures, 0 tables, 44 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Nenad Malenica, PhD

Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	Povijest koi riba.....	1
1.2	Priznate koi pasmine.....	1
1.3	Komercijalni značaj koi riba.....	4
2	Genetika koi riba.....	4
2.1	Duplikacija genoma	4
2.2	Nasljeđivanje fenotipskih svojstava tipičnih za šarane	5
2.2.1	Nasljeđivanje crvenog i bijelog fenotipa.....	5
2.2.2	Nasljeđivanje crnog obojenja i pigmentiranih sektora	6
2.2.3	Nasljeđivanje <i>Ginrin</i> fenotipa (svjetlucah ljuski).....	8
2.2.4	Nasljeđivanje dugih peraja	8
2.2.5	Nasljeđivanje pokrivenosti ljuskama.....	9
2.3	Analize transkriptoma.....	10
2.4	Genetičko inženjerstvo.....	11
3	Kromatofori	12
3.1	Embrionalni razvoj kromatofora.....	12
3.2	Pigmentirani kromatofori.....	14
3.3	Nepigmentirani kromatofori	16
4	Zaključak	19
5	Životopis	20
6	Literatura	21

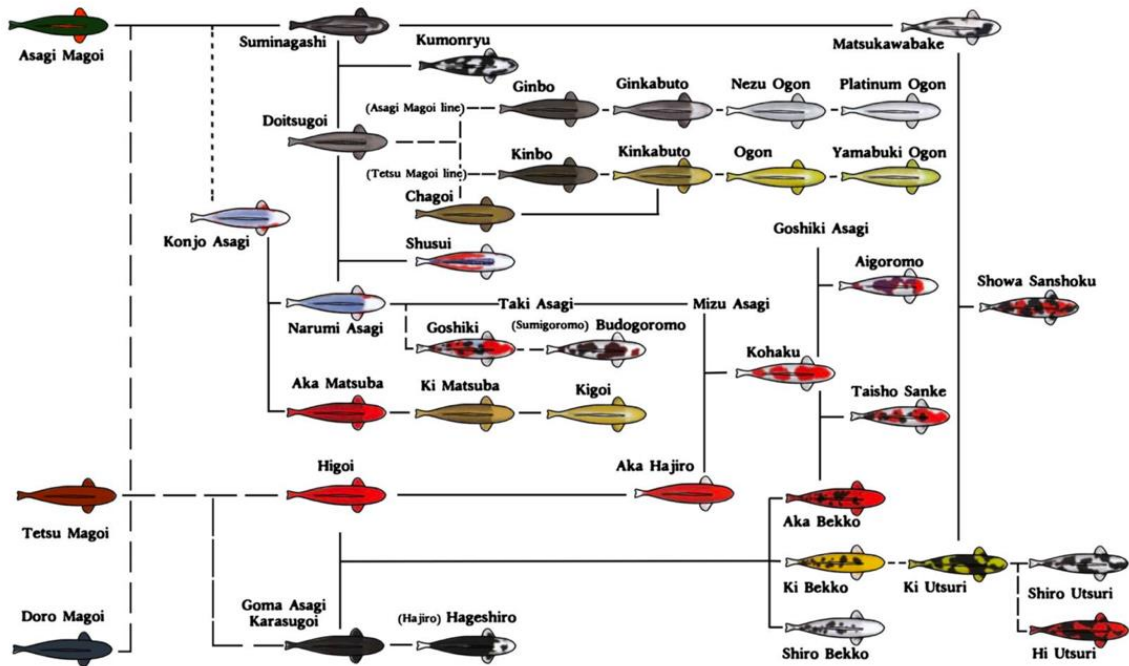
1 Uvod

1.1 Povijest koi riba

Koi ribe koje danas poznajemo pasmine su šarana dobivene strogim selektivnim uzgojem kroz dvije stotine godina u Japanu. Velik kulturološki značaj imaju naročito u Japanu, zemlji od kuda potječu, gdje se povezuju s blagostanjem i uspjehom. Prvo uzgajanje šarana je zabilježeno u Kini prije preko dvije tisuće godina kada su se šarani uzgajali isključivo za prehranu. Japanski trgovci su u 18. stoljeću kupovali mlade šarane kako bi ih uzgajali u unutrašnjosti zemlje te poslužili kao dodatan izvor hrane tijekom zime. Vjeruje se da je period suše oko 1785. godine poslužio kao selektivno usko grlo koje je znatno smanjilo gensku raznolikost populacije šarana u Japanu, te su uzgoj u bliskom srodstvu te naknadne mutacije uzrokovale pojavu različito pigmentiranih fenotipova (de Kock i Gomelsky 2015). Nedugo potom koi šarani počeli su se uzgajati iz estetskih razloga, kako kod samih uzgajivača tako i postepeno u bogatijim slojevima društva te su se takvi pigmentirani šarani nazivali *kawarigo* (promijenjeni šarani). *Magoi* je bio generalni naziv za šarane, no danas se taj naziv odnosi na fenotipski divlji tip šarana. Među prvim fenotipskim varijacijama selektirani su *Higo* (crvene boje), *Shirogo* (bijele boje), *Asagi* (plave boje) te *Moyogoi* (različiti uzorci obojenja) (de Kock i Gomelsky 2015). Još nije u potpunosti razjašnjeno kojoj vrsti šarana pripadaju koi ribe. Uvriježeno mišljenje bilo je da pripadaju običnom šaranu (*Cyprinus carpio*), no neki noviji radovi koi ribe svrstavaju vrsti *Cyprinus rubrofuscus* (Domasevich, Hasegawa, i Yamazaki 2022).

1.2 Priznate koi pasmine

Kako su se s vremenom pojavljivale i usavršavale druge pasmine (Slika 1) te je koi šaran postao važnim dijelom Japanske kulture, 1914. godine održala se prva japanska izložba koi riba u Tokiju (Domasevich i ostali 2022). Popularnost koi riba se s vremenom proširila po cijelom svijetu te se danas održavaju brojna natjecanja uzgajivača riba. Generalno je za sve koi ribe poželjno da budu zdrave, bez razvojnih poremećaja, što veće, intenzivnih boja te smirenog karaktera. Zbog izrazito velike varijacije u postojećim fenotipovima sve pasmine nisu strogo karakterizirane, ali njih 17 je za potrebe natjecanja formalno definirala svjetska organizacija za koi šarane, Zen Nippon Arinkai (ZNA) (Zen Nippon Arinkai 2024).



Slika 1: Prikaz rodoslovnog stabla *Nishikigoi*-a (de Kock i Gomelsky 2015).

Jedna od danas najpoznatijih te najviše usavršenih pasmina jest *Kohaku* (Slika 2). Čista *Kohaku* pasmina koju danas poznajemo nastala je relativno kasno, u periodu između 1914.-1952. godine križanjem *Sakura* te trobojne *Sanshoku* pasmine (bijelo tijelo s crvenim pjegama (*Hi*) i crnim točkama (*Sumi*)) koi šarana (de Kock i Gomelsky 2015).

Taisho sanke (*Sanshoku*) pasmina karakterizirana je bijelom podlogom tijela s crvenim pjegama te crnim točkama po leđima. *Sumi* se ne smije nalaziti na glavi.

Showa sanshoku nalik je *Sanke* pasmini no *Sumi* se pojavljuje na glavi te je puno izraženiji po cijelom tijelu.

Ki utsuri pasmina dobivena je iz *Tetsu magoi* pasmine 1898. godine (de Kock i Gomelsky 2015). Danas poznajemo *Utsurimono* kao pasminu sa *Showa* tipom *Sumi*-ja na bijelom (*Shiro utsuri*), žutom (*Ki utsuri*) ili crvenom tijelu (*Hi utsuri*). Ako je prisutna i najmanja količina treće boje svrstava se pod *Showa sanshoku* pasminu.

Kinginrin generalni je naziv koji se daje svakoj koi ribi koja ima sjajne ljuske. Za to su odgovorni iridofori koji sadrže kristale gvanina (de Kock i Gomelsky 2015).

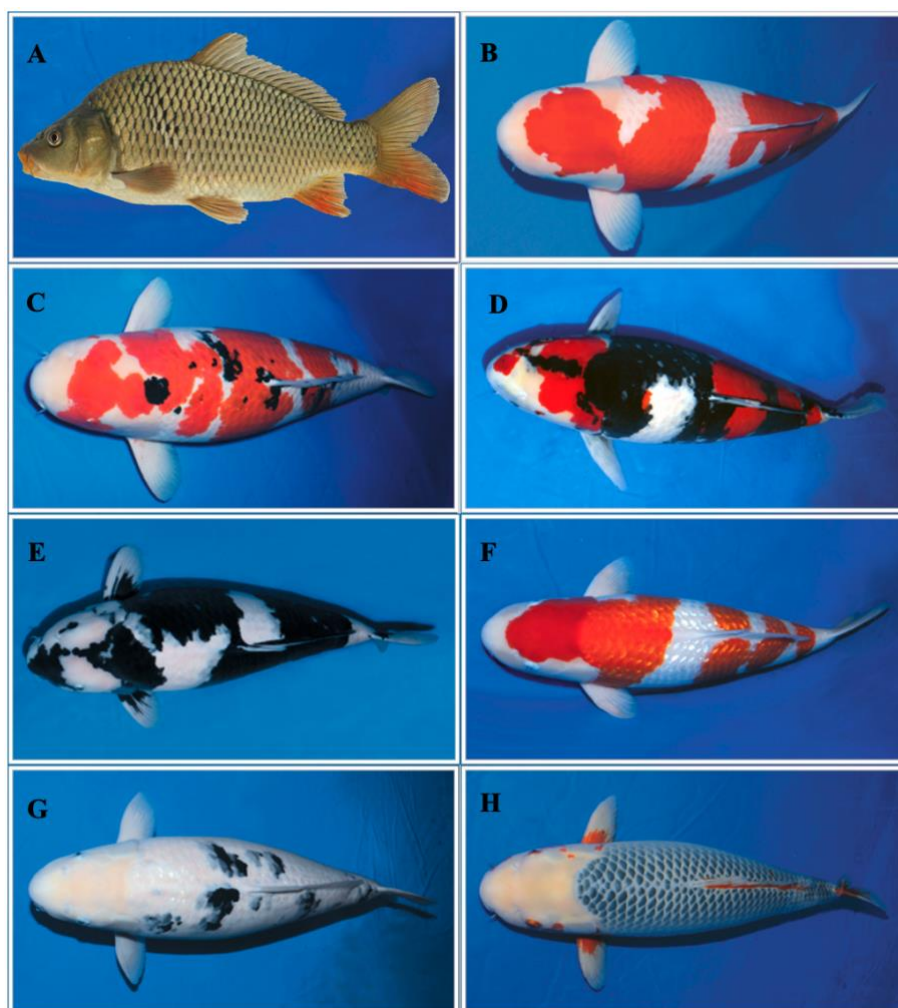
Prije *Utsuri* postojala je i starija *Bekko* pasmina koja postoji i danas. Prepoznatljiva karakteristika ove pasmine jest tijelo u jednoj od od tri boje: žutoj (*Ki bekko*), crvenoj (*Hi bekko*) ili bijeloj (*Shiro bekko*), sa *Sanke* tipom *Sumi*-ja na leđima, dakle ukupno dvije boje na

tijelu. Također, ako je prisutna treća boja na tijelu svrstava se pod *Taisho sanshoku* (*Sanke*) pasminu.

Postupnim usavršavanjem *Asagi magoi*-a dobili smo danas prepoznatu *Asagi* pasminu, koju karakteriziraju generalno ne prejako crvene peraje, trbuh i bočne strane tijela, a leđa su plavkaste boje s ljuskama dijamantnog uzorka.

Doitsu je generalni naziv koji se daje koi ribama čije tijelo nije prekriveno ljuskama. Iako je to poželjno zbog boljeg isticanja boja, takve jedinke su zakržljalog rasta.

Chagoi jedna je od starijih pasmina koja nije na popisu ZNA. Ne karakteriziraju je žarke i upadljive boje već pitomost te znatno veća veličina od ostalih pasmina. Smatra se da su uzgajivači odabirali velike i zdrave jedinke koje su bile najpitomije (a samim time i najlakše za uzgajanje) te su ih nakon nekog vremena počeli držati kao ljubimce zbog iznimne pitomosti ovih riba. Danas su najpoželjniji *Chagoi* blijede bež boje.



Slika 2: Prikaz divljeg tipa šarana (A) te priznatih koi fenotipa: *Kohaku* (B), *Sanke* (C), *Showa sanshoku* (D), *Shiro utsuri* (E), *Ginrin* fenotip (svjetlucave ljuske, neovisno o boji podloge, F), *Shiro bekko* (G) te *Asagi* (H) (Zen Nippon Arinkai 2024).

1.3 Komercijalni značaj koi riba

Kako se danas održavaju brojna natjecanja uzgajivača koi riba, jedinke koje stručni suci ocijene kao najbolje u svojoj kategoriji dobivaju na tržišnoj cijeni te se takvi koi šarani prodaju i za nekoliko stotina tisuća američkih dolara (G 2021).

Za standardizaciju ocjenjivanja Domasevich i ostali (2022) razvili su model za kompjutersku karakterizaciju kvalitete koi šarana, doduše za sada samo *Kohaku* pasmine. Unatoč velikoj raširenosti ovih natjecanja te posljedično velikoj tržišnoj cijeni pobjedničke jedinke te njegovih potomaka, kriteriji ocjenjivanja nisu jako precizno definirani, te nisu u cijelosti dostupni javnosti. Suci za ocjenu fenotipa koriste skalu do 100 bodova, pri čemu oblik tijela nosi 50, boja 20, uzorak 10, te „gracioznost“ 20 bodova (de Kock i Gomelsky 2015). Upravo zbog neprecizno definiranih poželjnih karakteristika, industrija uzgoja koi riba profitirala bi od dubljeg poznavanja genetičke osnove nasljeđivanja prethodno navedenih fenotipova, te pogotovo od razvitka molekularnih metoda manipulacije istima.

2 Genetika koi riba

2.1 Duplikacija genoma

Za razliku od biljaka, kod životinja su vijabilne poliploidne jedinke izrazito rijedak događaj s iznimkom riba i žaba. Predak koštunjača prošao je duplikaciju cijelog genoma te danas većina koštunjača sadrži 24 do 25 kromosoma u haploidnom genomu. Za šarane se smatra da je došlo do dodatnog događaja duplikacije genoma. Kako kariotipizacijom nisu uočene kvadrivalentne strukture te nije došlo do gubitka kromosoma dalo se naslutiti kako je došlo do alotetraploidizacije a ne autotetraploidizacije (David i ostali 2003; Li i ostali 2021). Detaljnijim genetičkim analizama sličnosti mikrosatelita unutar genoma te pojedinih gena izrađena su filogenetska stabla. Na filogenetskom stablu dobivenom iz analize sekvence gena tirotropina divergencija *C. carpio* i *C. auratus* procijenjena je prije 11 milijuna godina, a divergencija njihovog zajedničkog pretka od srodnih skupina prije 21 milijuna godina. Ovaj period poklapa se s dobivenim prosječnim vremenom divergencije temeljenom na analizi sekvenci genomskih mikrosatelita (David i ostali 2003). Na temelju svega se pretpostavlja da je došlo do alotetraploidizacije dviju srodnih vrsta no jasno kako vrijeme prolazi i novonastala vrsta dalje evoluirala sve je teže razlikovati alotetraploidizaciju od autotetraploidizacije (Wolfe 2001). Upravo zato koi ribe mogu služiti kao dobar model za istraživanje evolucije genoma kao vrsta koja je relativno nedavno divergirala nakon duplikacije genoma. Dodatno ovu tvrdnju

potkrjepljuje činjenica da šaran ima dvostruki broj Hox regija u odnosu na *Danio rerio* (ribu zebricu) te jednak broj kao Atlantski losos (*Salmo salar*), koji je autotetraploid (Xu i ostali 2014).

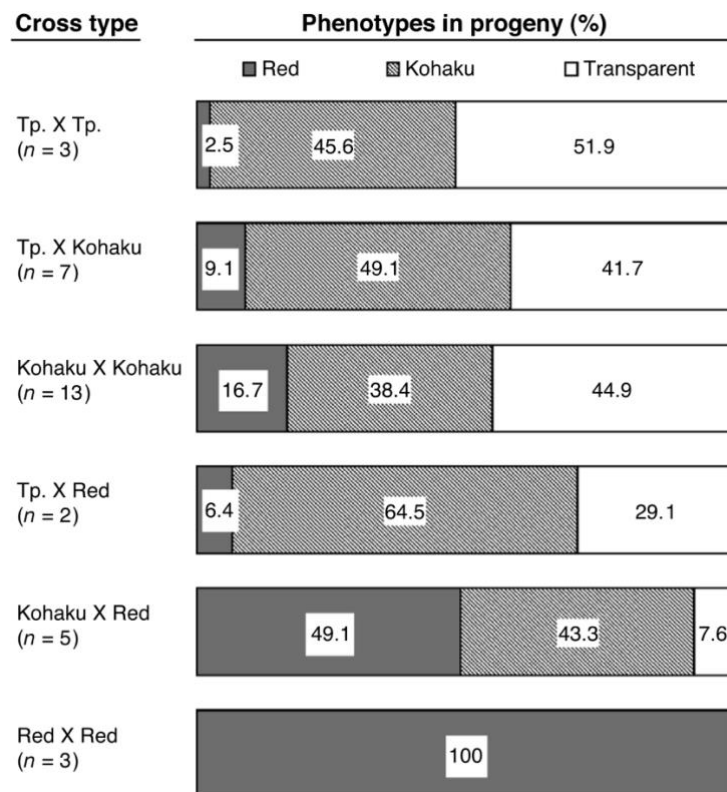
2.2 Nasljeđivanje fenotipskih svojstava tipičnih za šarane

Kako je koi šaran pasmina, a ne zasebna vrsta te razmnožavanjem svi potomci ne zadovoljavaju kriterije pasmine, a nasljeđivanje boje je kompleksno regulirano te razvoj specifičnih uzoraka pak isključivo nasumičan te ovisi o razvoju pojedine jedinke bez konkretne genetske podloge, pri ciljanom uzgajanju specifičnih fenotipova mora se vršiti stroga selekcija. Ovisno o pasmini, selekcija se vrši u različitim razvojnim stadijima; kod uzgoja *Kohaku* pasmine 60-65% potomaka se uklanja oko četrdesetog dana nakon izlijeganja, kod *Showa* nastavljaju se uzgajati samo potomci koji posjeduju crnu pigmentaciju do petog dana nakon izlijeganja, njih 5-50%. Bez ovako stroge selekcije populacija bi kroz nekoliko generacija revertirala na fenotip divljeg tipa (de Kock i Gomelsky 2015).

2.2.1 Nasljeđivanje crvenog i bijelog fenotipa

Kako bi se ispitalo nasljeđivanje crveno bijelih fenotipova, što je od velikog značaja za uzgoj *Kohaku* pasmine, kroz godine su se provodila kontrolirana križanja. Gomelsky i ostali (1996) su s relativno malim brojem križanja roditelja *Kohaku* fenotipa dobili potomke izrazito varijabilnih obojenja, s većim postotkom bijelih potomaka ukoliko je jedan ili oba roditelja bio bijelog fenotipa. Također, uočili su da se pokrivenost potomaka crvenom bojom povećava proporcionalno pokrivenošću roditelja crvenom bojom. Kako ovakvi rezultati isključuju mogućnost da je nasljeđivanje crvene boje kontrolirano jednim genom te ukazuju na potencijalno kompleksnije mehanizme regulacije, David i ostali (2004) ponovno su proveli znatno veći broj kontrolnih križanja te analizirali dobivene rezultate. Među potomcima svih križanja ponovno su bila zastupljena sva tri fenotipa, bijeli, *Kohaku* te crveni u izrazito varijabilnim omjerima osim kod križanja dvaju jedinki crvenog fenotipa, koje je dalo isključivo crveno potomstvo (Slika 3). Također nije uočena ovisnost pokrivenosti *Kohaku* roditelja crvenom bojom s učestalošću crvenih potomaka kao što je bilo u prethodno provedenim istraživanjima s manjim brojem križanja. Pretpostavljeno je postojanje *Tp* lokusa koji dominantno određuje bijeli fenotip (u radu nazvan "transparent"), tj. nedostatak crvene boje. Heterozigotni *Tp/tp* roditelji mogu imati potomke s prisutnom crvenom bojom. Predloženo je da R^a i R^b lokusi određuju količinu crvene boje. Kompletно crveni roditelji bi tako bili homozigoti za jedan ili oba lokusa te mogli imati samo crvene potomke. Također se predlaže

postojanje bijelog fenotipa određenog R^a i R^b lokusima u homozigotno recesivnim jedinkama za Tp lokus, koje bi objasnilo dodatnu gradaciju omjera fenotipova uočenih tijekom križanja (David i ostali 2004).



Slika 3: Prikaz ishoda različitih kontroliranih križanja. Postotci potomaka različitih fenotipova dobivenih križanjem roditelja definiranog fenotipa. Tp - (*transparent*) odnosi se na jedinke samo bijele boje (David i ostali 2004).

2.2.2 Nasljeđivanje crnog obojenja i pigmentiranih sektora

Što se tiče nasljeđivanja tamnog obojenja u odnosu na svijetlo (bijelo ili narančasto), razlikuje se nasljeđivanje crne boje cijelog tijela i karakterističnog *Bekko* uzorka, tj. crnih točaka po leđima (*Sumi*). Križanjem fenotipova s *Bekko* uzorkom (*Taisho sanke*, *Tancho sanke*, *Shiro bekko*) dobiveni su potomci koji tek nakon tjedan dana nakon izlijeganja razvijaju crnu pigmentaciju (Slika 4), koja se daljnjim rastom razvija u karakterističan *Bekko* uzorak (de Kock i Gomelsky 2015). Potomci dobiveni križanjem roditelja fenotipa *Taisho sanke* x *Taisho sanke* te *Shiro bekko* x *Shiro bekko* (oba fenotipa karakterizira *Sumi* na tijelu) nisu značajno odstupali od omjera 3:1. Nadalje, potomci križanja jednog roditelja s crnim točkama na leđima (*Bekko* fenotip) i jednog roditelja bez crnih točaka na leđima nisu odstupali od omjera 1:1. Iz toga je izveden zaključak da je prisutnost *Bekko* fenotipa kontrolirana dominantnim alelom te



Slika 4: Prikaz potomaka dobivenih križanjem roditelja fenotipa *Utsuri* x *Utsuri* slikanih treći dan nakon izlijeganja. Vidljiva je razlika između jedinki kod kojih dolazi do razvitka pigmentacije netom nakon izlijeganja te jedinki kod kojih se pigmentacija pojavljuje tek od sedmog dana nakon izlijeganja na dalje (de Kock i Gomelsky 2015).

da su jedinke genotipa *Bl/bl* (David i ostali 2004; de Kock i Gomelsky 2015). Doduše, naknadnim križanjima uočene su neke pojave koje ukazuju da vjerojatno postoji još jedan dodatni element kod nasljeđivanja *Bekko* fenotipa. David i ostali (2004) uočili su nedostatak homozigota *Bl/Bl* u odrasloj populaciji, te da u križanjima *Bekko* x *Bekko* roditelja distribucija *Bekko* fenotipa bolje odgovara 2:1 omjeru, što bi ukazivalo na postojanje negativnog selekcijskog pritiska za *Bl/Bl* homozigote, tj. da je naveden homozigotni genotip letalan. Kako su postoci dobivenih *Kohaku* potomaka (crveno obojenje bez *Bekko* uzorka) te *Sanke* potomaka (crveno obojenje s *Bekko* uzorkom) podjednaki, pretpostavljeno je da se crveno i crno obojenje nasljeđuju odvojeno, što bi sugeriralo da su ta dva fenotipa kontrolirana različitim te nevezanim genima. Uočeno je također da dolazi do segregacije crvenog obojenja te *Bekko* uzorka kod bijelih potomaka, što bi upućivalo da je *Tp* lokus epistatski u odnosu na oba gena koja odvojeno kontroliraju crnu i crvenu boju (David i ostali 2004). Pod tom pretpostavkom, *Kohaku* pasmina bila bi recesivni homozigot za *bl* alel, te *Shiro bekko* pasmina ne eksprimira crveno obojenje zato što je recesivni homozigot za r^a te r^b alel, a ne zbog *Tp* lokusa. Predloženo je kako dobiveni rezultati nalikuju segregaciji fenotipova koji su kontrolirani *melanokortin receptorom 1* (*Mclr*). Riječ je o intenzivno istraženom genu, odgovornom za razvoj pigmentacije u sisavaca i ptica. Istraživanje koje je testiralo hipotezu postoji li veza između pigmentacije i *Mclr* gena kod riba nije utvrdilo ikakvu značajnu korelaciju (Bar i ostali 2013).

Što se tiče tamnog obojenja cijele jedinke tj. *Utsuri* fenotipa, ono se dobije samo križanjem *Utsuri* x *Utsuri* roditelja što ukazuje na gensku kontrolu ovog fenotipa. Među potomcima tog križanja pojavljuju se željeni *Utsuri* fenotip, ali i jedinke divljeg tipa, smeđe te zeleno obojene jedinke. Udio *Utsuri* fenotipa bio je izrazito varijabilan, od 0% do 16% uz još veću varijabilnost pigmentacije potomaka odmah potom izlijevanja što upućuje na kompleksniju višegensku kontrolu nasljeđivanja ovog fenotipa (David i ostali 2004).

2.2.3 Nasljeđivanje *Ginrin* fenotipa (svjetlucavih ljuski)

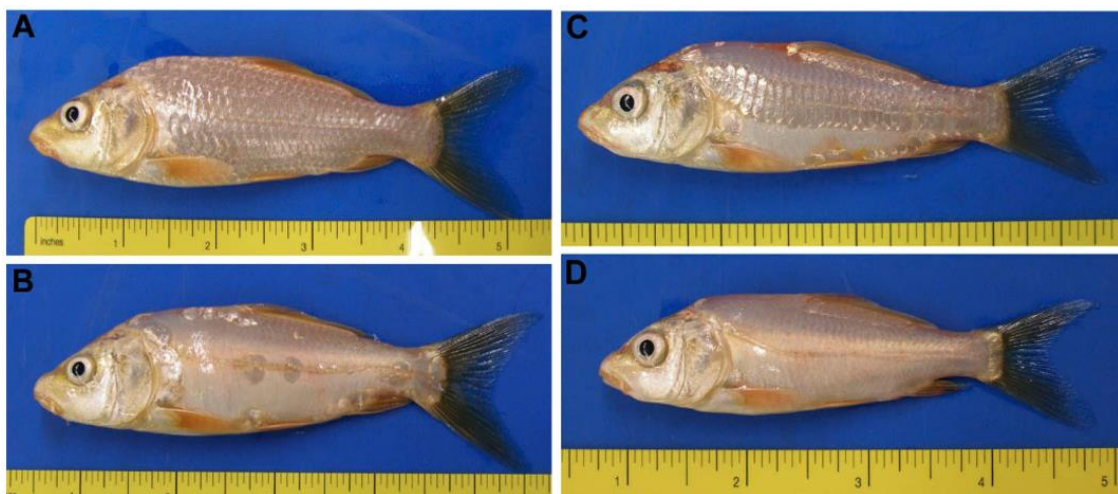
Kako bi se ispitalo nasljeđivanje *Ginrin* fenotipa, točnije *Diagin* varijante *Ginrin* fenotipa u koi šarana, Gomelsky i ostali (2015) proveli su testno križanje *Ginrin* jedinki s jedinkama bez tog fenotipskog obilježja. Potom su bilježili omjere potomaka *Ginrin* te non-*Ginrin* fenotipa u tri F1 te 16 F2 generacija. Kako su jedine dvije fenotipske varijante u potomstvu bile prisustvo ili odsustvo *Ginrin* fenotipa te su omjeri u F1 generaciji približno odgovarali omjeru 1:1, što je karakteristično za križanje heterozigota s recesivnim homozigotom, zaključeno je kako je *Ginrin* fenotip određen jednim *Gr* genom. Kako bi se ispitalo je li alel koji određuje *Ginrin* fenotip dominantan, provedeno je križanje non-*Ginrin* jedinki F1 generacije, te su dobiveni potomci isključivo non-*Ginrin* fenotipova, što ukazuje na to da je *Ginrin* fenotip određen dominantnim *Gr* alelom. Kada su provedena križanja jedinki F1 generacije *Ginrin* fenotipa, samo u dva križanja od 14 provedenih je omjer *Ginrin* te non-*Ginrin* jedinki odgovarao omjeru 3:1 (u slučaju da su svi aleli jednako vijabilni) te 2:1 (u slučaju da je *Gr* homozigot nevijabilan). U ostalih 12 provedenih križanja omjeri su statistički odstupali od prethodno navedenih, s konstantnim deficitom *Ginrin* fenotipa. Na temelju tih rezultata zaključeno je da je *Ginrin* fenotip znatno manje vijabilan od non-*Ginrin* fenotipa, što dodatno potkrepljuje činjenica da su jedinke non-*Ginrin* fenotipa bile u prosjeku duplo teže od jedinki *Ginrin* fenotipa iste dobi.

2.2.4 Nasljeđivanje dugih peraja

Kontroliranim križanjima utvrđeno da je mutacija odgovorna za fenotip dugih peraja (*Lf*) dominantna te nije povezan s karakteristikama boje. Pregledom distribucije duljine peraja kod potomaka utvrđeno je također da je riječ o potpunoj dominaciji (Gomelsky, Schneider, i Alsaqfi 2011). Ovo je jedno od prvih provedenih ispitivanja nasljeđivanja ovog fenotipa, vjerojatno zato što je ovaj fenotip, takozvani *Butterfly* koi relativno nov te po kriterijima svjetske koi organizacije još nije službeno definiran. Unatoč tome, ovaj fenotip danas je vrlo popularan diljem svijeta te najrepresentativnije jedinke uredno postižu jako visoke cijene (G 2021).

2.2.5 Nasljeđivanje pokrivenosti ljuskama

Casas i ostali (2013) ispitivali su nasljeđivanje te regulaciju pokrivenosti tijela koi šarana ljuskama. Već je bila predložen mehanizam nasljeđivanja koji se temelji na dva gena s po dva alela (S/s te N/n) koji međusobnom interakcijom određuju hoće li tijelo biti prekriveno ljuskama, te u kojoj mjeri. S lokus je identificiran, Ma i Raible (2009) odredili su da je to gen *Fgrfla* (receptor za fibroblastni regulator rasta 1). N lokus još nije identificiran, ali se smatra da ima veze s razvitkom embrionskog mezenhima. Od fenotipova reguliranih S i N lokusom razlikujemo potpunu pokrivenost ljuskama (divlji tip), *Linear* (bočna pruga na tijelu kojoj nedostaju ljuske), *Mirror* (nasumično locirane ljuske) te *Leather* (jedinke s potpunim nedostatkom ljusaka) (Slika 5). *Leather* fenotip ima smanjen broj crvenih krvnih stanica i slabiji rast od divljeg tipa. Na temelju već poznatog modela nasljeđivanja, homozigotni mutant za prvi lokus (ss) određuje klasični *Mirror* fenotip, te ukoliko se naslijedi s jednim mutiranim N lokusom (Nn) određuje *Leather* fenotip. Divlji tip za S alel s mutiranim n alelom daje *Linear* fenotip, dok je genotip homozigota za mutiran n alel (nn) letalan. Križanjem *Leather* x *Leather* te *Leather* x *Mirror* fenotipa prema prethodnim istraživanjima očekuje se 25% smrtnosti, zbog izrazite nevjabilnosti nn mutiranih homozigota. U ovom istraživanju doduše, ovakva stopa smrtnosti uočena je kod jedinki koi šarana azijskog podrijetla, za koje se čini da nose mutirani n alel s jače izraženim negativnim posljedicama, no i kod tih jedinki stopa preživljavanja bila je veća jer su tijekom provođenja eksperimenta deformirane te manje kompetentne jedinke (zbog posljedica n alela) odvojili u zasebne spremnike kako bi preživjele prvih nekoliko mjeseci te se razvili dostatno za analizu.



Slika 5: Prikaz koi riba različite pokrivenosti ljuskama po tijelu. A - jedinka divljeg tipa (u potpunosti prekrivena ljuskama), B - jedinka *Linear* fenotipa (nedostaju ljuske u crti po boku tijela), C - jedinka *Mirror* fenotipa (nasumična raspoređenost ljuski) te D - jedinka *Leather* fenotipa (potpuno nedostaju ljuske po tijelu) (Gomelsky 2011).

2.3 Analize transkriptoma

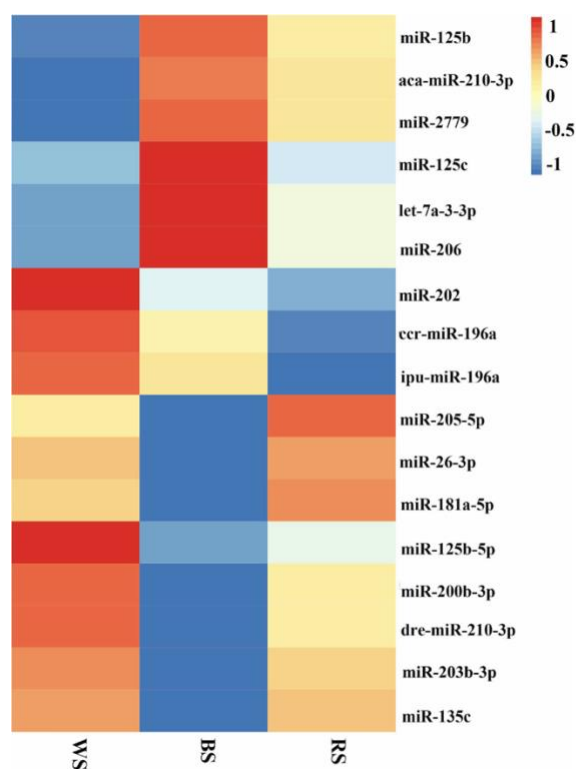
Luo i ostali (2018) prikupili su uzorke različitih boja kože koi šarana *Sanshoku* pasmine kako bi izolirali te sekvencirali transkriptom, specifično istražujući diferencijalnu ekspresiju miRNA molekula. Kako *Sanshoku* jedinke imaju trobojno tijelo (crno, bijelo i crveno) svaki set uzoraka potjecao je od jedne jedinke, a sveukupno ih je devet uzorkovano. Nakon odbacivanja predugačkih sekvenci te onih ispod 18 pb duljine oko 75% preostalih slijedova bilo je dužine 22-23 pb, što je karakteristično za produkte DICER proteina te je bio podjednak broj očitavanja sekvenci istih duljina za svaku boju kože. Potom su računalnom analizom identificirali potencijalne gene koje sekvencirane miRNA reguliraju.

Mc1r jedan je od ključnih gena uključenih u sintezu eumelanina i feomelanina unutar melanofora te samu pigmentaciju kod koi šarana. Pronađeno je da je on meta *miR-200a*, *miR-200b* i *miR-206* za koje je također utvrđeno da su eksprimiraniji u uzorcima crne kože u odnosu na bijelu i crvenu kožu, što ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u pigmentaciji kože šarana. Uočeno je također da je gen za melanocit-stimulirajući hormon (*Msh*) potencijalna meta *miR-200a*, *miR-206*, *miR-142b-3p*, i *miR-26a-3p*, te *Mitf* *miR-133c*, *miR-26a-3p*, *miR-196a* te *miR-181a-5p*. *Forkhead box 3 (Foxd3)* jedan je od prvih otkrivenih markera u biosintetskom putu gvanina te također određuje hoće li se stanice neuralnog grebena diferencirati u neuralne glija stanice ili u kromatofore, kao što je pokazano supresijom *Mitf* gena tijekom neurulacije (Thomas i Erickson 2009; mehanizam detaljnije opisan u poglavlju 3.1). Pronađeno je da je on meta *miR-429b*, *miR-26a-3p*, *miR-200b*, *miR-10b-5p*, te *miR-181a-5p*. Diferencijalna ekspresija navedenih miRNA vizualizirana je toplinskom kartom (Slika 6).

Luo i ostali (2019) sljedeće godine proširili su istraživanje na duge nekodirajuće molekule RNA (lncRNA). Naime lncRNA utječu na ekspresiju gena kroz nekoliko mehanizama, naročito degradacijom transkripata (nalik miRNA molekulama), restrukturiranjem kromatina te direktno *cis* ili *trans* regulacijom gena (Statello i ostali 2021). Otkrili su brojne diferencijalno eksprimirane lncRNA molekule te potencijalne interakcije s poznatima mRNA transkriptima. Među njima, identificirali su *Ccr_lnc5622421* molekulu koja može regulirati ekspresiju mRNA gena *Tyk2*, *Mc1r*, *Tyrp1* te ostalih za koje se zna da su uključeni u procese pigmentacije.

Kako bi produbili prethodna saznanja, Dong i ostali (2020) fokusirali su se na ulogu prethodno otkrivene *miR-206* u razvitku pigmentacije kod koi šarana. Potvrdili su kako *miR-206* ostvaruje interakciju s *Mc1r* 3'-UTR, te kako se pri utišavanju *miR-206* pomoću antagomira (RNA molekula komplementarna *miR-206*) dolazi do značajnog povećanja ekspresije *Mc1r*

gena *in vivo*. Utvrđeno je također kako je ekspresija *miR-206* najizraženija u stadiju neurule. S obzirom na tu spoznaju te na to da *Mclr* interagira s α -melanocit stimulirajućim hormonom (α -MSH) kako bi aktivirao adenilat ciklazu koja potom pak potiče ekspresiju brojnih gena uključenih u sintezu melanina, razumno je zaključiti da *miR-206* doista ima važnu ulogu u regulaciji pigmentacije kod koi šarana.



Slika 6: Prikaz 17 poznatih diferencijalno eksprimiranih miRNA pomoću toplinske karte u uzorcima tkiva bijele kože (WS), crne kože (BS) te crvene kože (RS) *Sanshoku* pasmine koi šarana (Luo i ostali 2018).

2.4 Genetičko inženjerstvo

Sa porastom spoznaja o vezama između konkretnih gena i samog fenotipa otvaraju se vrata malo direktnijoj manipulaciji fenotipovima koi riba od samo selektivnog parenja i uzgajanja. Jedna od metoda koja bi mogla biti komercijalno lakše primjenjiva je *knock-down* pojedinih gena RNAi tehnologijom. Kod ove tehnologije problem je upravo što je najčešća metoda unosa dsRNA mikroinjektiranje, što zahtjeva dostatno znanje i vještinu te je vremenski zahtjevno. Kao daleko jednostavnija alternativa pokazala se prehrana mladih riba hranom koja sadrži kompetentan soj *E. coli* koji sintetizira dsRNA odgovarajuću genu kojega želimo utišati. Ta metoda eksperimentalno je ispitana na ličinkama *S. schlegelii* koje se hrane jedinkama roda *Artemia* tretiranim kompetentnim sojem *E. coli*. (Gao i ostali bez dat.) Pokazalo se da su ličinke

Artemia za koi šarane odlična hrana (Hekimoğlu i ostali 2014; Tillner i ostali 2015), tako da postoji mogućnost primjene ove metodologije u kombinaciji sa sojem *E. coli* koji sintetizira dsRNA od interesa.

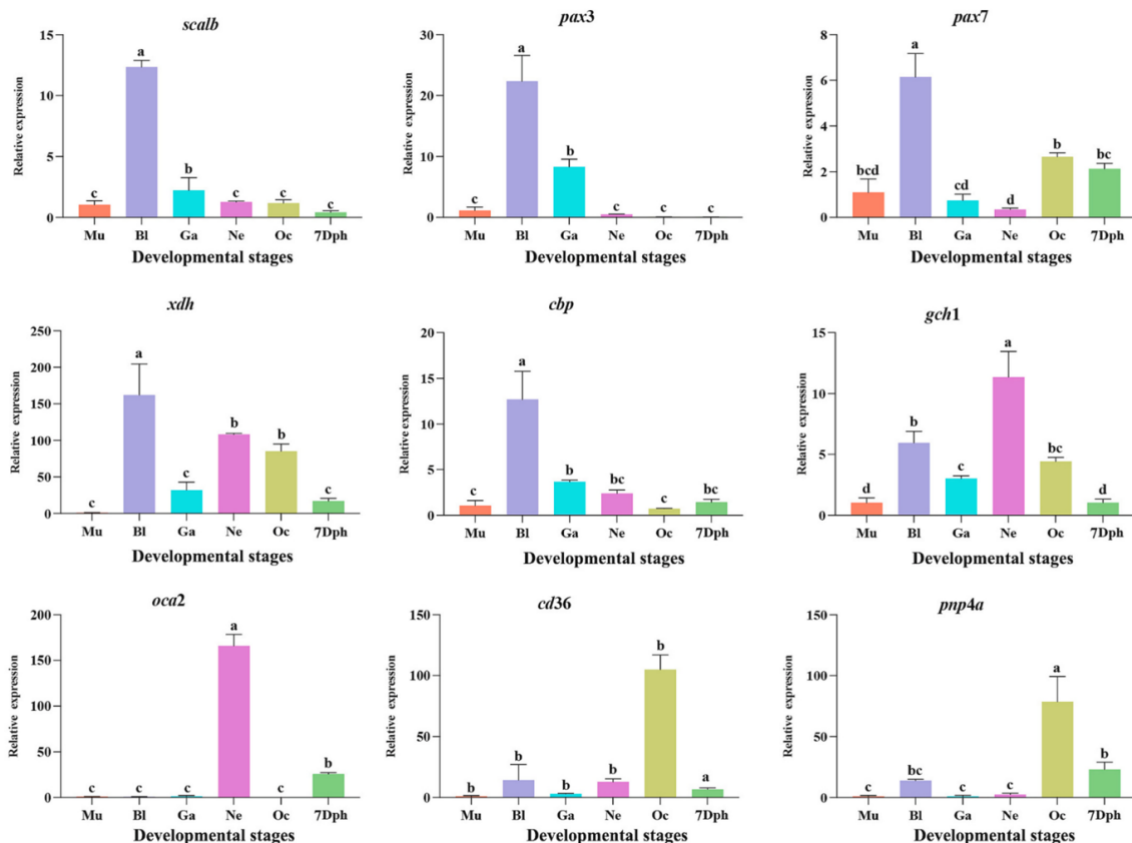
3 Kromatofori

3.1 Embrionalni razvoj kromatofora

Melanofori, ksantofori te eritrofori su dendritičke stanice prisutne kod koi riba porijeklom iz neuralnog grebena (Leclercq, Taylor, i Migaud 2010; Parichy i Spiewak 2015). Odgovorne su za sintezu te prijenos i razmještaj pigmenata (melanofori melanina, ksantofori i eritrofori pteridina i karotenoida). Cijanofori su novopriznate pigmentne stanice te su odgovorne za plavo obojenje kod nekih riba no dostupno je jako malo podataka te nisu provedena gotovo nikakva istraživanja fokusirana na cijanofore. Nije poznato koje pigmente cijanofori sadrže (Leclercq i ostali 2010). Iridofori se razlikuju od ostalih pigmentnih stanica po tome što ne sadrže obojene pigmente već kristale gvanina koji ovisno o unutarstaničnom rasporedu reflektiraju različite valne duljine upadne svjetlosti (Funt i ostali 2017). Glavni faktor u diferencijaciji stanica neuralnog grebena u pigmentne stanice jest *Foxd3* koji se veže na *Pax3* aktivator te sprječava njegovo vezanje na *Mitf* promotor, te samim time inhibira ekspresiju *Mitf* gena. Stanice neuralnog grebena u kojima nije eksprimiran *Mitf* usmjeravaju se u diferencijaciju prema pigmentnim stanicama, specifično melanocite, umjesto u neuralne glija stanice (Thomas i Erickson 2009). Dokazano je također i u ribi zebrici (*D. rerio*) kako kod *Sox* mutanata ne dolazi do ekspresije *Mitf* gena te ne dolazi do diferencijacije melanofora (Elworthy i ostali 2003). Curran i ostali (2010) predložili su dodatan mehanizam diferencijacije između melanofora te iridofora, koji potječu iz iste stanične linije također interakcijom *Foxd3* te *Mitf* gena. Kod gubitka ekspresije *Mitf* gena došlo je do pojave mnogobrojnih ektopičnih iridofora, dok je gubitkom ekspresije *Foxd3*, njegovog supresora došlo do smanjenja broja iridofora.

Luo i ostali (2023) proveli su detaljno istraživanje u prostorno-vremenske uzorke transkriptoma koi šarana kroz različite razvojne stadije. Otkriveno je da su geni *Scarb1*, *pax3*, *pax7*, *xdh* te *cbp* geni uključeni u biosintetski put melanogeneze te diferencijaciju stanica neuralnog grebena, značajno jače eksprimirani u stadiju blastociste u odnosu na druge razvojne stadije (Slika 7). Njihova ekspresija kao i ekspresija gotovo svih drugih gena značajno se povećala u stadiju blastule, što se vremenski poklapa s vremenom tranzicije s majčinskog na zigotni transkriptom (MZT) kod šarana (Fu i ostali 2019). Prije MZT-a mRNA koja je već bila

prisutna u oociti i dalje je prisutna u citoplazmi te je odgovorna za gotovo sve stanične funkcije (uz minimalnu transkripciju zigotnog genoma), tako da je za očekivati kako je za daljnju diferencijaciju i razvitak zigote, a samim time i kromatofora, potrebno uspostaviti novu i specifično reguliranu ekspresiju mRNA. Kod ribe zebrice konkretno *pax3* mutanti pokazali su kompletan izostanak diferenciranih ksantofora. Mutanti *pax7* imali su diferencirane ksantofore, no u manjoj mjeri od divljeg tipa (Minchin i Hughes 2008). Na grafičkom prikazu rezultata (Slika 7) vidljivo je kako je ekspresija *pax3* najizraženija u stadiju blastule te već u stadiju neurule gotovo nema ekspresije, dok *pax7* ostaje značajno eksprimiran do kraja uzorkovanja, što ukazuje na potencijalno sličan mehanizam diferencijacije ksantofora kod koi šarana. Značajna je ekspresija također i *pnp4a* tijekom organogeneze u odnosu na druge razvojne stadije, gena koji često služi kao marker iridofora te kodira purinsku nukleozid fosforilazu. Kod ribe *Oryzias latipes* uočeno je da *pnp4a* mutanti imaju značajno smanjeno skladištenje gvanina te smanjenje broja iridofora kroz život (Kimura, Takehana, i Naruse 2017). Crveno i narančasto obojenje kod životinja uglavnom je uzrokovano karotenoidima, koji se apsorbiraju isključivo prehranom. Kako su karotenoidi relativno velike hidrofobne molekule, potrebni su membranski transporteri za unos u citoplazmu eritrofora i ksantofora. *Scarb1* i *cd36* oba pripadaju porodici membranskih receptora te su asocirani upravo s transmembranskim prijenosom karotenoida (Luo i ostali 2023). Oba gena imaju razvojne stadije u kojima su izrazito eksprimirani, što ukazuje na moguću ulogu u razvoju eritrofora i ksantofora kod koi šarana.

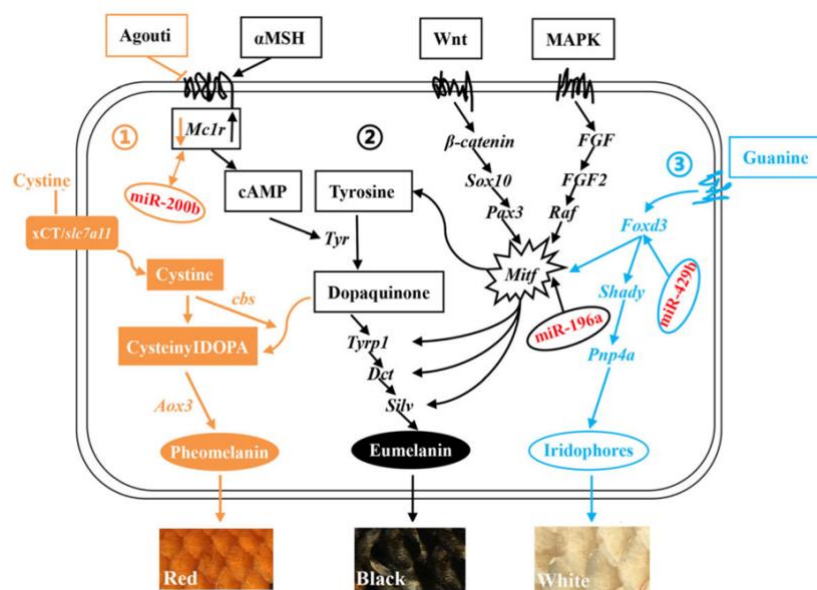


Slika 7: Prikaz ekspresijskih profila devet gena (*Scarb1*: scavenger receptor class B member 1, *pax3*: paired box 3, *pax7*: paired box 7, *xdh*: ksantin dehidrogenaza, *cbp*: CREB vezujući protein, *gch1*: GTP ciklohidrolaza I, *oca2*: okulakotani albinizam II, *cd36*: cluster of differentiation 36, *pnp4a*: purin nukleozid fosfohidrolaza 4a) u šest razvojnih stadija (Mu: morula, Bl: blastocista, Ga: gastrula, Ne: neurulacija, Oc: organogeneza, 7Dph: sedam dana nakon izlijevanja) *Kohaku* pasmine koi šarana (Luo i ostali 2023).

3.2 Pigmentirani kromatofori

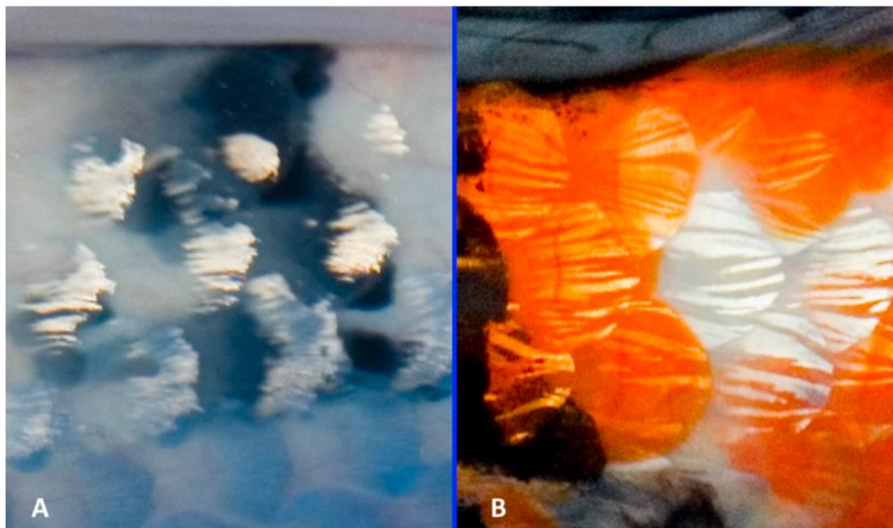
Melanofori su pigmentirane stanice koje sintetiziraju pigment eumelanin, odgovoran za crno i tamno smeđe obojenje te feomelanin, odgovoran za narančasto do crveno obojenje (Xu i ostali 2014). Ustanovljeno je da je *xCT/slc7a11* gen odgovoran za unos cistina (oksidiran oblik aminokiseline cisteina) u citoplazmu melanofora. Melanofori u biosintetskom putu melanogeneze tirozin oksidiraju u dopakvinon (L-DOPA), koji potom polimerizira u eumelanin (Slika 8). Ono što je dodatno uočeno jest da povećane koncentracije cistina te dopakvina mogu inhibirati sintezu eumelanina te potaknuti sintezu feomelanina, što će rezultirati narančastom pigmentacijom (Hoekstra 2006). Eksperimentalno je uočeno da je kod jedinki šarana svjetlije boje ekspresija *slc7a11* gena pojačana u odnosu na jedinke tamnije boje, što bi sugeriralo da veće koncentracije cistina u citoplazmi melanofora potiču njihovo narančasto, umjesto crnog obojenja. Genetska osnova same diferencijalne ekspresije još nije

razjašnjena (Xu i ostali 2014), te nije niti povezanost ovakve regulacije melanogeneze s crvenim fenotipovima koi šarana. Postoje i dokazi koegzistencije biosintetskih puteva melanina te obojenih pteridina u melanoformima te ksantoforima, što dodatno ukazuje na njihov potencijalan zajednički doprinos narančastom obojenju (Leclercq i ostali 2010). Također, Tian i sur. (2024) ispitali su utjecaj sepiapterin reduktaze na narančasto obojenje kod koi šarana. Koi šarani posjeduju dvije kopije gena koji kodira sepiapterin reduktazu, *Spra* te *Sprb*, koji su diferencijalno eksprimirani ovisno o tkivu te stadiju razvoja ribe. Nakon *Spr* inhibicije, broj ukupnih ksantofora se smanjio te su znatno izbledjeli. Mjerena količina ukupnih karotenoida je također bila statistički značajno manja nego u kontrolnoj skupini, dok je količina luteina bila povećana u skupini kojoj se inhibirao *Spr*. Smanjenje količine ksantofora te karotenoida uz povećanje količine luteina rezultiralo je ribama slabijeg ukupnog obojenja, više žute boje od netretirane skupine. I dalje vidljivo narančasto obojenje potencijalno ukazuje na doprinos melanofora ukupnom crvenom obojenju koi šarana. Za razliku od melanofora koji sintetiziraju pigmente koje skladište, crveno i narančasto obojenje za koje su odgovorni eritrofori i ksantofori rezultat je nakupljanja karotenoida, koji se apsorbiraju isključivo prehranom. Kako su karotenoidi relativno velike hidrofobne molekule, potrebni su membranski transporteri za unos u citoplazmu eritrofora i ksantofora. *Scarbl* i *cd36* oba pripadaju porodici membranskih receptora te su asocirani upravo s transmembranskim prijenosom karotenoida te je uočena diferencijalna ekspresija u tkivima ovisno o crvenom obojenju uzorkovanog tkiva (Luo i ostali 2023).



Slika 8: Shematski prikaz biosintetskih i signalnih puteva odgovornih za pigmentaciju koi šarana (Luo i ostali 2018).

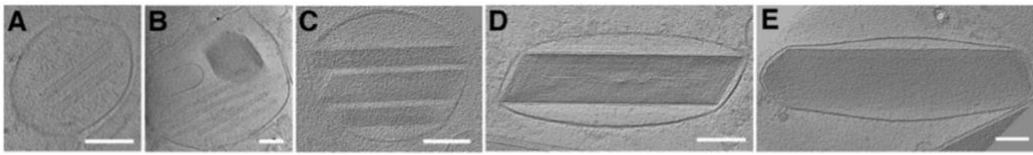
Iridofori su kod nekih riba izravno odgovorni za njihovo obojenje (Kelsh 2004). Iako kod koi šarana znatno manje utječu na samu boje jedinke, predstavljaju vrijedan i tražen fenotip u kombinaciji s raznim bojama tijela. Fenotipski raspoznajemo dva tipa reflektirajućih ljuski: *Beta-gin* i *Dia-gin* (Slika 10). *Beta-gin* karakteriziraju manja pokrivenost ljusaka iridoforima koji su nepravilnije orijentirani te samim time "mutnije" reflektiraju svjetlost. Nasuprot njima, iridofori *Dia-gin* fenotipa tvore strukture više nalik ogledalu po površini čitave ljuske (de Kock i Gomelsky 2015). Genetska te molekularna pozadina različitih varijanti *Ginrin* fenotipa još nije istražena.



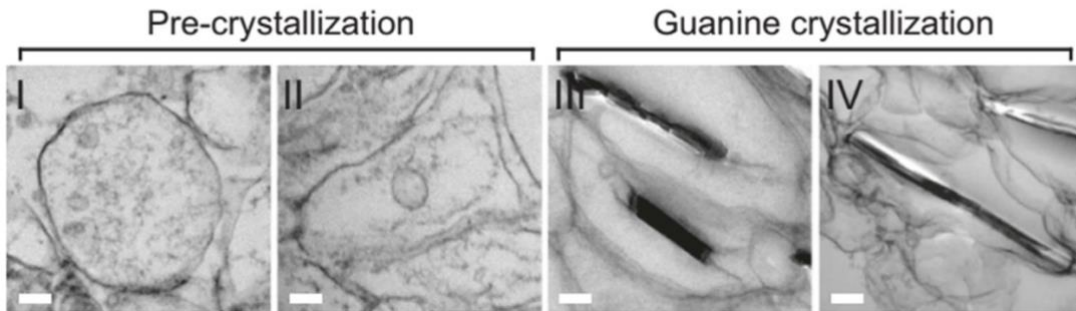
Slika 10: Prikaz ljuski *Beta-gin* (A) te *Dia-gin* (B), dvaju oblika *Ginrin* fenotipa (de Kock i Gomelsky 2015).

Paralelan položaj kristala unutar iridofora nije slučajnost, već je pokazano kako iridofori kontroliraju orijentaciju kristala gvanina kontroliranom biokristalizacijom na proteinskim vlaknima (Gur i ostali 2013; Hu i ostali 2023). Kristalizacija započinje izduženjem iridofora te formacijom proteinskih fibrila koji služe kao orijentirane jezgre nukleacije oko kojih će citoplazmatski gvanin kristalizirati (Slika 11). Smatra se da kristalizaciji prethodi amorfni oblik gvanina koji je sadržan u gustim vezikulama unutar iridofora (Slika 12). Tako stanice kontrolirano rekristalizacijom amornog gvanina određuju orijentaciju te prostorni raspored konačnih kristala unutar iridofora, što omogućava toliku raznolikost u karakteristikama loma svjetlosti ovih organela (Hu i ostali 2023).

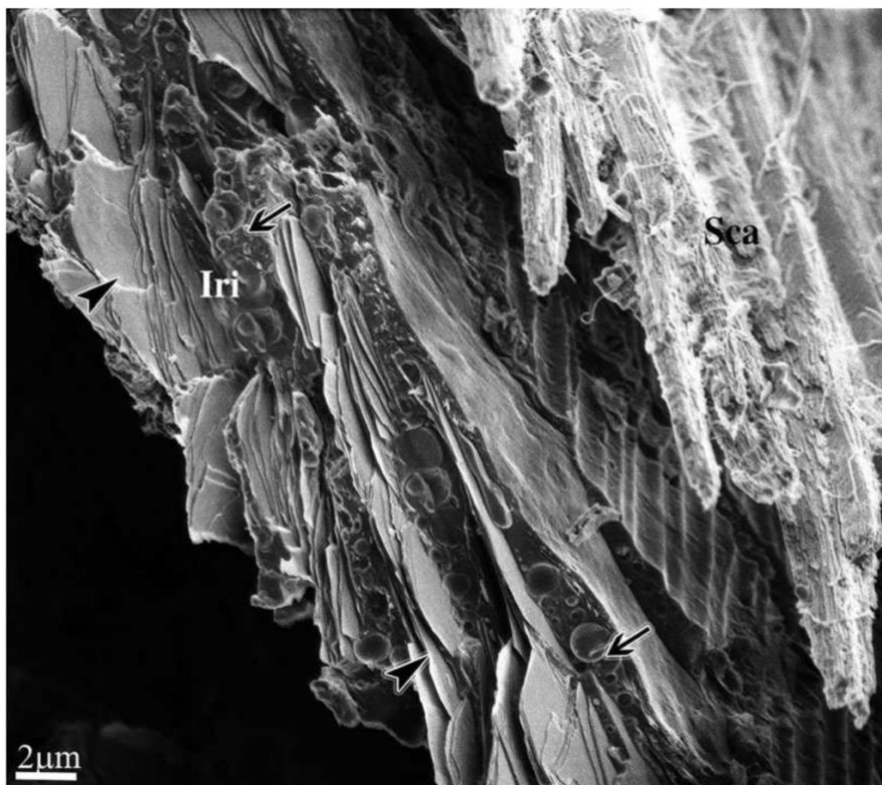
iridophores from zebrafish larvae



iridosomes from juvenile scallop eyes



Slika 11: Prikaz kristala gvanina unutar iridofora slikanih elektronskim mikroskopom: Vrh: iridofori iz ribe zebrice (*Danio rerio*) koji sadrže proteinska vlakna koja služe za usmjerenu biokristalizaciju gvanina u kristale specifične orijentacije. Vidljive su faze kontrolirane kristalizacije gvanina (Hu i ostali 2023). Dno: iridosomi iz očiju školjkaša snimljeni TEM mikroskopijom u različitim stadijima kristalizacije. Vidljiv je okruglasti iridosom (I) u kojem nije došlo do organizacije fibrila, potom se izdužuje (II), proteinski fibrili služe kao jezgre nukleacije za nastanak kristala (III), te nakon konačne kristalizacije citoplazmatska membrana pranja uz kristal (IV) (Wagner i ostali 2023).



Slika 12: Slika dobivena krio-SEM mikroskopijom poprečnog presjeka ljuske (Sca) te iridofora (Iri) u kojima su vidljivi kristali gvanina (označeni širokim strelicama) položeni u istoj ravnini kao i ljuske te guste vezikule ispunjene amorfnim gvaninom (označene uskim strelicama) (Gur i ostali 2013)

4 Zaključak

Koi ribe sa svojom dugom povijesti uzgajanja u Japanu, te potom popularizacijom kao ukrasne ribe u cijelom svijetu danas predstavljaju veliko globalno tržište. Unatoč tome, od 17 službeno priznatih koi pasmina, opisano je nasljeđivanje s predloženim lokusima za pet fenotipskih svojstava, te ni za jedno svojstvo nisu identificirani svi geni koji određuju fenotip. Određen je jedan od gena koji sudjeluje u nasljeđivanju pokrivenosti tijela ljuskama, *Fgrfla*. Brojni biosintetski te signalni putevi uključeni u pigmentaciju koi riba već su identificirani u mnogim organizmima, gdje ih je većina i pomnije istražena. Sekvencirane su i brojne miRNA koi riba (od kojih je *miR-206* detaljnije istražena, te je zaključeno kako je jedna od mehanizama odgovornih za diferencijalnu ekspresiju *Mclr* gena) te lncRNA molekule za koje se zna da su uključene u kompleksne mehanizme regulacije gena. Neki od gena za koje je utvrđeno da su diferencijalno eksprimirani, naročito u koži različite boje, su *Mclr*, *Foxd3*, *Scarb1* te *Pnp4a*. Detaljnije istraživanje ovih mehanizama dalo bi veoma vrijedan uvid u mnoge procese koji nisu jedinstveni samo za koi šarane. Također, kako je za neke fenotipove zbog nevijabilnosti homozigota nemoguće uspostaviti čiste populacije, daljnja identifikacija gena te regulatornih mehanizama, a potom i razvitak alata za manipulaciju genomom ili ekspresijom gena značajno bi povećao isplativost te olakšao uzgoj koi šarana.

5 Životopis

Tomas Čorak Grdović rođen je 1. travnja 2003. godine u Zagrebu. Po završetku XV gimnazije 2021. godine upisuje prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2022. godine aktivan je član udruge BIUS te sudjeluje na projektima *Speleobacilli* i *Noćni letači Tounja*. 2024. godine sudjeluje u projektu popularizacije znanosti Dan i noć PMF-a. U sklopu izbornog kolegija Stručna praksa 2023. godine obavlja praksu na Zavodu za molekularnu biologiju pod mentorstvom izv.prof.dr.sc Tomislava Ivankovića. U sklopu prakse sudjeluje u izradi znanstvenog rada o zeolitu kao bakterijskom bionosaču.

6 Literatura

- Bar, Ido, Ethan Kaddar, Ariel Velan, i Lior David. 2013. „Melanocortin receptor 1 and black pigmentation in the Japanese ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. Koi)“. *Frontiers in Genetics* 4(JAN). doi: 10.3389/fgene.2013.00006.
- Casas, Laura, Réka Szucs, Shubha Vij, Chin Heng Goh, Purushothaman Kathiresan, Sándor Németh, Zsigmond Jeney, Miklós Bercsényi, i László Orbán. 2013. „Disappearing scales in carps: Re-visiting Kirpichnikov’s model on the genetics of scale pattern formation“. *PLoS ONE* 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0083327.
- Curran, Kevin, James A. Lister, Gary R. Kunkel, Andrew Prendergast, David M. Parichy, i David W. Raible. 2010. „Interplay between *Foxd3* and *Mitf* regulates cell fate plasticity in the zebrafish neural crest“. *Developmental Biology* 344(1):107–18. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.023.
- David, Lior, Shula Blum, Marcus W. Feldman, Uri Lavi, i Jossi Hillel. 2003. „Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) Genome as revealed by analyses of microsatellite loci“. *Molecular Biology and Evolution* 20(9):1425–34. doi: 10.1093/molbev/msg173.
- David, Lior, Shmuel Rothbard, Israel Rubinstein, Hila Katzman, Gideon Hulata, Jossi Hillel, i Uri Lavi. 2004. „Aspects of red and black color inheritance in the Japanese ornamental (Koi) carp (*Cyprinus carpio* L.)“. *Aquaculture* 233(1–4):129–47. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.033.
- Domasevich, Mikhail A., Hideo Hasegawa, i Tatsuya Yamazaki. 2022. „Quality Evaluation of Kohaku Koi (*Cyprinus rubrofuscus*) Using Image Analysis“. *Fishes* 7(4). doi: 10.3390/fishes7040158.
- Dong, Zaijie, Mingkun Luo, Lanmei Wang, Haoran Yin, Wenbin Zhu, i Jianjun Fu. 2020. „MicroRNA-206 Regulation of Skin Pigmentation in Koi Carp (*Cyprinus carpio* L.)“. *Frontiers in Genetics* 11. doi: 10.3389/fgene.2020.00047.
- Elworthy, Stone, James A. Lister, Tom J. Carney, David W. Raible, i Robert N. Kelsh. 2003. „Transcriptional regulation of *mitfa* accounts for the *sox10* requirement in zebrafish melanophore development“. *Development* 130(12):2809–18.
- Frohnhofer, Hans Georg, Jana Krauss, Hans Martin Maischein, i Christiane Nüsslein-Volhard. 2013. „Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe

- formation in zebrafish“. *Development (Cambridge)* 140(14):2997–3007. doi: 10.1242/dev.096719.
- Fu, Jianjun, Wenbin Zhu, Lanmei Wang, Mingkun Luo, Feibiao Song, i Zaijie Dong. 2019. „Dynamic transcriptome sequencing and analysis during early development in the bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)“. *BMC Genomics* 20(1). doi: 10.1186/s12864-019-6181-4.
- Funt, Nir, Benjamin A. Palmer, Steve Weiner, i Lia Addadi. 2017. „Koi fish-scale iridophore cells orient guanine crystals to maximize light reflection“. *ChemPlusChem* 82(6):914–23. doi: 10.1002/cplu.201700151.
- G, Chris. 2021. „How Much Are Koi Fish Worth?“ <https://pondinformer.com/how-much-are-koi-fish/>.
- Gao, Xiangyu, Ruiyan Yang, Weihao Song, Yiyang Shen, Hao Sun, Tianci Nie, Xinlu Yue, Zongcheng Song, Jie Qi, Quanqi Zhang, i Yan He. bez dat. „Non-Invasive dsRNA Delivery via Feeding for Effective Gene Silencing in Teleost 1 Fish: A Novel Approach in the Study of Gene Function Analysis“. doi: 10.1101/2024.02.19.580956.
- Gomelsky, B., NB. Chermas, N. BenDom, i G. Hulata. 1996. „Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* l.) inferred from color variability in normal and gynogenetic progenies.“ *Israeli Journal of Aquaculture* 48(4):219–30.
- Gomelsky, Boris. 2011. *Fish Genetics Theory and Practice*.
- Gomelsky, Boris, Thomas A. Delomas, Kyle J. Schneider, Ammu Anil, i Jeffrey L. Warner. 2015. „Inheritance of Sparkling Scales (Ginrin) Trait in Ornamental Koi Carp“. *North American Journal of Aquaculture* 77(3):312–17. doi: 10.1080/15222055.2015.1029174.
- Gomelsky, Boris, Kyle J. Schneider, i Ahmed S. Alsaqufi. 2011. „Inheritance of long fins in ornamental koi carp“. *North American Journal of Aquaculture* 73(1):49–52. doi: 10.1080/15222055.2011.544942.
- Gur, Dvir, Yael Politi, Berta Sivan, Peter Fratzl, Steve Weiner, i Lia Addadi. 2013. „Guanine-based photonic crystals in fish scales form from an amorphous precursor“. *Angewandte Chemie - International Edition* 52(1):388–91. doi: 10.1002/anie.201205336.
- Hekimoğlu, Müge Aliye, Cüneyt Suzer, Şahin Saka, i Kürşat Firat. 2014. „Artemia Nauplii ve kisti ile beslenen koi (*Cyprinus carpio* var. koi) larvaları {dotless}nda enzimatik özellikler ve büyüme parametrelerinin İncelenmesi“. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14(1):125–33. doi: 10.4194/1303-2712-v14_1_14.
- Hoekstra, H. E. 2006. „Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates“. *Heredity* 97(3):222–34.

- Hu, Haoxin, Rongrong Xue, i Fenghua Chen. 2023. „Biom mineralization and Properties of Guanine Crystals“. *Molecules* 28(16). doi: 10.3390/molecules28166138.
- Kelsh, Robert N. 2004. „Genetics and evolution of pigment patterns in fish“. *Pigment Cell Research* 17(4):326–36.
- Kimura, Tetsuaki, Yusuke Takehana, i Kiyoshi Naruse. 2017. „Pnp4a Is the causal gene of the medaka iridophore Mutant guanineless“. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7(4):1357–63. doi: 10.1534/g3.117.040675.
- de Kock, Servaas, i Boris Gomelsky. 2015. „Japanese Ornamental Koi Carp: Origin, Variation and Genetics“. Str. 27–53 u *Biology and Ecology of Carp*. CRC Press.
- Leclercq, Eric, John F. Taylor, i Hervé Migaud. 2010. „Morphological skin colour changes in teleosts“. *Fish and Fisheries* 11(2):159–93.
- Li, Jiong Tang, Qi Wang, Mei Di Huang Yang, Qing Song Li, Ming Shu Cui, Zai Jie Dong, Hong Wei Wang, Ju Hua Yu, Yu Jie Zhao, Chen Ru Yang, Ya Xin Wang, Xiao Qing Sun, Yan Zhang, Ran Zhao, Zhi Ying Jia, i Xi Yin Wang. 2021. „Parallel subgenome structure and divergent expression evolution of allo-tetraploid common carp and goldfish“. *Nature Genetics* 53(10):1493–1503. doi: 10.1038/s41588-021-00933-9.
- Luo, Mingkun, Xiulan Shi, Jun Guo, Kai Lin, Wenbin Zhu, Jianjun Fu, Lanmei Wang, i Zaijie Dong. 2023. „Deep spatiotemporal transcriptome analysis provides new insights into early development of koi carp (*Cyprinus carpio* var. *koi*)“. *Aquaculture* 575. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739767.
- Luo, Mingkun, Lanmei Wang, Haoran Yin, Wenbin Zhu, Jianjun Fu, i Zaijie Dong. 2019. „Integrated analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in different colored skin of koi carp“. *BMC Genomics* 20(1). doi: 10.1186/s12864-019-5894-8.
- Luo, Mingkun, Lanmei Wang, Wenbin Zhu, Jianjun Fu, Feibiao Song, Min Fang, Juanjuan Dong, i Zaijie Dong. 2018. „Identification and characterization of skin color microRNAs in Koi carp (*Cyprinus carpio* L.) by Illumina sequencing 06 Biological Sciences 0604 Genetics 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology“. *BMC Genomics* 19(1). doi: 10.1186/s12864-018-5189-5.
- Ma, Eva Y., i David W. Raible. 2009. „Signaling Pathways Regulating Zebrafish Lateral Line Development“. *Current Biology* 19(9).
- Minchin, James E. N., i Simon M. Hughes. 2008. „Sequential actions of Pax3 and Pax7 drive xanthophore development in zebrafish neural crest“. *Developmental Biology* 317(2):508–22. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.058.

- Parichy, David M., i Jessica E. Spiewak. 2015. „Origins of adult pigmentation: Diversity in pigment stem cell lineages and implications for pattern evolution“. *Pigment Cell and Melanoma Research* 28(1):31–50.
- Patterson, Larissa B., i David M. Parichy. 2013. „Interactions with Iridophores and the Tissue Environment Required for Patterning Melanophores and Xanthophores during Zebrafish Adult Pigment Stripe Formation“. *PLoS Genetics* 9(5). doi: 10.1371/journal.pgen.1003561.
- Statello, Luisa, Chun Jie Guo, Ling Ling Chen, i Maite Huarte. 2021. „Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22(2):96–118.
- Thomas, Aaron J., i Carol A. Erickson. 2009. „FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism“. *Development* 136(11):1849–58. doi: 10.1242/dev.031989.
- Tian, X., Y. S. Shan, N. N. Peng, X. Ma, X. Shi, H. Li, X. J. Li, i X. L. Meng. 2024. „Sepiapterin reductase (SprA and SprB) regulate carotenoid and pteridine metabolism influencing the koi carp (*Cyprinus carpio* L.) coloration“. *Aquaculture Reports* 34. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101900.
- Tillner, R., T. Assheuer, B. Rennert, A. Trubiroha, C. Clemmesen, i S. Wuertz. 2015. „Evaluation of an improved RNA/DNA quantification method in a common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758) larval feeding trial with *Artemia*, two nematodes (*Panagrellus redivivus* Linnaeus 1758, *Panagrolaimus* sp. Fuchs 1930) and dry feed“. *Journal of Applied Ichthyology* 31(3):466–73. doi: 10.1111/jai.12715.
- Wagner, Avital, Alexander Upcher, Raquel Maria, Thorolf Magnesen, Einat Zelinger, Graça Raposo, i Benjamin A. Palmer. 2023. „Macromolecular sheets direct the morphology and orientation of plate-like biogenic guanine crystals“. *Nature Communications* 14(1). doi: 10.1038/s41467-023-35894-6.
- Wolfe, Kenneth H. 2001. *YESTERDAY'S POLYPLOIDS AND THE MYSTERY OF DIPLOIDIZATION*.
- Xu, Peng, Xiaofeng Zhang, Xumin Wang, Jiongtang Li, Guiming Liu, Youyi Kuang, Jian Xu, Xianhu Zheng, Lufeng Ren, Guoliang Wang, Yan Zhang, Linhe Huo, Zixia Zhao, Dingchen Cao, Cuiyun Lu, Chao Li, Yi Zhou, Zhanjiang Liu, Zhonghua Fan, Guangle Shan, Xingang Li, Shuangxiu Wu, Lipu Song, Guangyuan Hou, Yanliang Jiang, Zsigmond Jeney, Dan Yu, Li Wang, Changjun Shao, Lai Song, Jing Sun, Peifeng Ji, Jian Wang, Qiang Li, Liming Xu, Fanyue Sun, Jianxin Feng, Chenghui Wang, Shaolin Wang,

Baosen Wang, Yan Li, Yaping Zhu, Wei Xue, Lan Zhao, Jintu Wang, Ying Gu, Weihua Lv, Kejing Wu, Jingfa Xiao, Jiayan Wu, Zhang Zhang, Jun Yu, i Xiaowen Sun. 2014. „Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*“. *Nature Genetics* 46(11):1212–19. doi: 10.1038/ng.3098.

Zen Nippon Arinkai. 2024. „Varieties of Nishikigoi“. <https://zna.jp/en/keep-nishikigoi/varieties-of-nishikigoi>.