



青鱼线粒体 *ND4L* 的 SNP 筛选及在两种体色群体中的分布

毛思琦^{1,2}, 鲍生成^{1,2}, 徐晓雁^{1,2}, 李家乐^{1,2}, 沈玉帮^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为分析青鱼线粒体蛋白编码基因与体色性状的相关性, 筛选出与体色相关的 SNP 分子标记。本研究选取了 5 尾广东佛山灰色青鱼和 5 尾扬州邗江正常体色黑色青鱼的皮肤组织, 通过 qPCR 检测 13 个线粒体蛋白质编码基因在 2 种颜色群体皮肤组织中的相对表达量, 进行显著性分析。对表达差异最明显的蛋白编码基因 CDS 区设计引物, 并选取 78 尾佛山灰色青鱼样本和 92 尾邗江黑色青鱼样本进行测序, 根据测序峰图筛选出 SNP 位点。结果显示, 13 个线粒体蛋白质编码基因中, *COII* 基因相对表达量最高, *ND5* 基因最低, *ND4L* 基因在两种体色青鱼中的表达差异最为明显。在 170 尾青鱼线粒体 *ND4L* 基因上共检测到了 2 个 SNP 位点 C252T 和 A243G。佛山灰色群体 A243G 位点的 A、G 基因型频率为 96.2%、3.8%, C252T 位点的 T、C 基因型频率为 38.5%、61.5%。邗江正常体色群体 C252T 位点的 A、G 基因型频率为 100%、0%, C252T 位点的 T、C 基因型频率为 15.2%、84.8%。共检测到 3 种单倍型 AC、AT、GC, AC 频率最高, AC 和 AT 在两种体色中均有分布, GC 频率最低, 仅在正常体色中出现。本实验研究了与青鱼体色相关的线粒体 *ND4L* 基因上 2 个 SNP 位点的基因型和单倍型的分布情况, 为青鱼的体色和生长研究以及青鱼的育种工作提供理论指导。

关键词: 青鱼; 线粒体; *ND4L* 基因; 体色; SNP 位点

中图分类号: Q 786; S 965.111

文献标志码: A

影响鱼类体色的因素有内在和外因。内在因素包括遗传、自身健康、神经内分泌等, 外在因素包括光照、水温、摄取的食物、水深、水温等。在很多研究中表明, 水产动物的体色和生长性状差异存在着相关联现象^[1]。

Xing 等^[2]在对不同体色的海参研究中发现, 紫色仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 中多糖和皂苷含量最高, 白色仿刺参中多糖和皂苷含量最低。李清清等^[3]在对三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 的研究中发现, 供片蚌内壳色与无核珍珠颜色相关性极显著, 改良供片蚌内壳色可以改良珍珠颜色。

钱永生等^[4]研究发现, 4 种体色瓯江彩鲤 (*Cyprinus carpio* var. *color*) 间的生长、摄食率、消化酶活性和呼吸代谢率存在显著差异。You 等^[5]研究了金属卤化物灯 (MHL) 灯光照射对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的影响, 发现对虾虾青素浓度高, 有着鲜艳的体色且生长迅速。吴秀林等^[6]对不同体色的黄鳝 (*Monopterus albus*) 生物学特性进行了研究, 结果发现, 3 种体色黄鳝的生长速率、繁殖力和适应能力、养殖效果等存在明显差异。

分子标记辅助育种借助于性状紧密相关的分子标记, 可以对水产动物具有优良性状的等位基

收稿日期: 2021-08-11 修回日期: 2021-09-29

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45-03); 上海市工程中心提升项目 (19DZ2284300)

第一作者: 毛思琦 (照片), 从事水产动物种质资源与遗传育种研究, E-mail: 76044624@qq.com

通信作者: 沈玉帮, 从事水产动物种质资源与遗传育种研究, E-mail: ybshen@shou.edu.cn



因或基因型的个体进行选择育种^[7]。吕耀平等^[8]利用相关序列扩增多态性 (SRAP) 技术筛选与瓯江彩鲤体色相关的分子遗传标记, 最终发现 SC-3 标记可以用来区分“全红”和“粉玉”瓯江彩鲤这两种体色的群体。刘丽等^[9]应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术在两种不同体侧纵带颜色的纵带笛鲷 (*Lutjanus vitta*) 中筛选出了 OPP 14~629 bp 和 OPP 14~674 bp 等 11 个特异性分子标记, 可用于黄带纵带笛鲷和褐带纵带笛鲷的鉴定。线粒体基因组具有严格的母系遗传、能进行自我复制、进化速率比和遗传标记更快等优点, 因此被广泛用于分子标记辅助育种的研究^[10]。

青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 作为我国淡水养殖的四大家鱼之一, 由于其肉质好、生长快、营养价值高, 具有较高的市场需求和经济价值^[11], 在全国各地广泛养殖。青鱼养殖生产过程中, 出现了生长速率减慢, 抗逆性能下降等种质退化现象。目前国内外对青鱼的研究多集中于形态及生长发育^[12]、养殖技术^[13]、生长性能^[14]、分子标记开发^[15]和遗传多样性^[16]等方面, 对青鱼体色相关的基因以及青鱼体色相关分子标记的开发目前还未见报道。为了开发与体色相关的 SNPs 位点进行分子标记辅助育种, 本研究对青鱼线粒体 13 个蛋白质编码基因在皮肤组织中的表达量进行了分析, 选取在两种体色青鱼中的表达差异最为明显的基因, 进行 PCR 扩增和 SNP 基因分型。在后续的研究中, 可以将体色相关的 SNP 分子标记与不同体色生长性状差异相关联, 从而开发优良性状的特征分子标记, 为青鱼优良性状的选育以及杂交育种提供分子生物层面的理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本研究选取了 5 尾广东佛山灰色青鱼和 5 尾扬州邗江黑色青鱼群体的皮肤组织用于线粒体 13 个蛋白质编码基因的表达量分析, 然后选取了 78 尾佛山灰色青鱼和 92 尾邗江黑色青鱼的鳍条作为实验样本, 储存于无水乙醇中, 待进行 SNPs 位点的筛选与基因分型。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成、总 DNA 提取

总 RNA 提取与 cDNA 合成 选取了 5 尾佛山灰色青鱼和 5 尾邗江黑色青鱼群体的皮肤组织, 使用 TRIzol 对样品进行总 RNA 提取, 提取

得到的 RNA 样品使用分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测 260/280 值及浓度, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。按照 PrimeScript™ First-strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA 第一链。反转后的 cDNA 模板储存在 -20 °C, 以备后续实验。

总 DNA 提取 选取了 78 尾佛山灰色青鱼和 90 尾邗江黑色青鱼样本, 使用 PALL96 孔过滤板进行 DNA 的提取^[17], 使用分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测 260/280 值和浓度, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 的完整性。

1.3 Real-time PCR 检测

引物设计与合成 参照 NCBI 青鱼线粒体参考基因组 (GenBank 登录号: MT084757)^[18], 使用 NCBI 网站中 Primer-BLAST 设计 13 个线粒体蛋白质编码基因的引物 (表 1), 用 Get Primers 对其进行引物特异性验证。

Real-time PCR 以反转录的 cDNA 为模板, 使用 BIO-RAD CFX96™ 仪器和 SuperReal Premix Plus (SYBR Green) 荧光定量试剂盒检测 13 个蛋白质编码基因在皮肤组织中的表达量。反应体系包括 12.5 μL 2×SuperReal Premix Plus, 0.75 μL Primer F (10 μmol/L), 0.75 μL Primer R (10 μmol/L), 1 μL cDNA 和 10 μL ddH₂O, 共 25 μL。反应程序: 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次。

1.4 ND4L 基因 PCR 扩增及突变位点筛选

根据 NCBI 数据库中青鱼的 ND4L 基因数据 (GenBank 登录号: MT084757), 使用 NCBI 网站中 Primer-BLAST 设计 1 对引物, 并用 Get Primers 对其进行引物特异性验证。上游引物 F (5'-3') 为 CATTCCACCGTACCCACC, 下游引物 R (5'-3') 为 TGATTCAAATTGTAGAGCC。对 ND4L 基因进行 PCR 扩增序列, 用 Sequencher 5.4.6 软件比对测序结果筛选 SNP 单核苷酸变异位点。

1.5 数据分析

数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算内参基因与 13 个蛋白质编码基因的相对表达量^[19]。矩形图使用 SigmaPlot 软件进行绘制, SPSS 22.0 软件分析评估样本间的显著性差异。使用 SPSS 22.0 软件分析佛山灰色青鱼和邗江黑色青鱼群体突变位点和单倍型的分布特征, 并使用卡方检验分析差异显著性。

表 1 青鱼线粒体 DNA 13 个蛋白质编码基因引物

Tab. 1 Primers for 13 protein coding genes in mtDNA of *M. piceus*

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	退火温度/°C T_m
ND1-F	TCAGCACAGCCCAAGAAA	50
ND1-R	CTACGTTGAAGCCGGAGA	50
ND2-F	AAACCAAACCCAACTACGA	50
ND2-R	GCTGCGGATGTTATGAAG	50
ND3-F	TACTGGCAATCGTGTCTT	50
ND3-R	TTGGGTTGTGGAGTTGGTCT	56
CO I -F	TGGAGGATTCGAAACTG	51
CO I -R	AGATTGCCTGCGAGTGGT	57
CO II -F	CATAGAATCGCCAGTCCG	53
CO II -R	AGGCAATGAAGCAGTTT	52
COIII-F	TAGCACCAACACCAGAGC	55
COIII-R	CACCCTCTATGATGCTGT	51
ATP8-F	GAATCGTCTTCCTACCA	51
ATP8-R	CTCAGGGTCTGTTTGT	53
ATP6-F	TTATTGGAATGCGAAACC	47
ATP6-R	AATACGGCTGTGGCGATG	55
ND4-F	TAAGTCCCTAATCGCCTAC	50
ND4-R	TTCGGCTGTGGTTTCGTT	57
ND4L-F	CATTCCACCGTACCCACC	56
ND4L-R	TGATTCAAATTGTAGAGCC	46
ND5-F	ACCAGGGAATAGAAAGCA	49
ND5-R	ATGTTAGGGTTCGGAGTGT	52
ND6-F	CTAAACGGCACGAAGAGT	52
ND6-R	TTGTTGATGGGTTGAAGG	49
cytb-F	CGACCTCCAACACCATC	53
cytb-R	GGATGAGTCAGCCGTAAT	51

2 结果

2.1 线粒体 13 个蛋白质编码基因在佛山灰色青鱼以及邗江黑色青鱼群体中的表达

qRT-PCR 结果显示, 13 个蛋白质编码基因

在两个群体皮肤组织中都表达, *CO II* 基因表达量最高, *ND5* 基因表达量最低。根据显著性分析得知, *ND1*、*ND2*、*ND4* 和 *ND4L* 在两个群体的相对表达量为极显著, 分别为 0.0028、0.0018、0.0029 和 0.0010, *ND4L* 基因在两种体色青鱼中的相对表达差异最为明显 (图 1)。

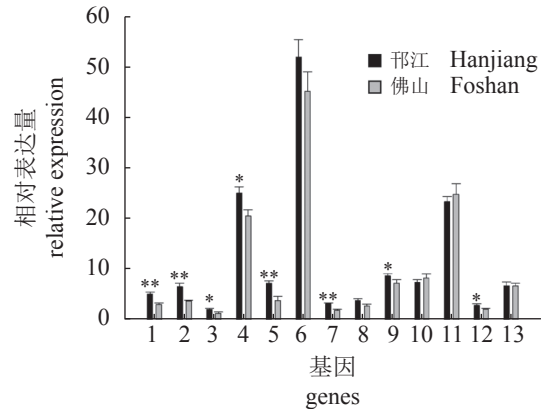


图 1 线粒体 13 个蛋白质编码基因在佛山灰色青鱼以及邗江青鱼群体中的表达

**表示差异极显著 ($P < 0.01$), *表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Expression of 13 mitochondrial protein coding genes in Foshan grey *M. piceus* and Hanjiang *M. piceus* populations

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), * indicates significant difference ($P < 0.05$); 1. *ND1*, 2. *ND2*, 3. *ND5*, 4. *CO I*, 5. *CO II*, 6. *ND4*, 7. *ND4L*, 8. *ATP8*, 9. *ND3*, 10. *ATP6*, 11. *COIII*, 12. *ND6*, 13. *cytb*

2.2 线粒体 *ND4L* 基因 SNP 位点筛选与分布统计

在两种体色线粒体 *ND4L* 基因中共检测到 2 个 SNP 位点。将这 2 个 SNP 位点分别命名为 A243G 和 C252T (表 2)。佛山灰色体色群体 A243G 位点的 A、G 基因型频率为 96.2% 和 3.8%, C252T 位点的 T、C 基因型频率为 38.5% 和 61.5%。邗江正常体色群体 C252T 位点的 A、G 基因型频率为 100% 和 0%, C252T 位点的 T、C 基因型频率为 15.2% 和 84.8%。

表 2 *ND4L* 基因在佛山群体以及邗江群体中的 SNPs 统计分析

Tab. 2 SNPs analysis of *ND4L* gene in Foshan population and Hanjiang population

位点 locus	基因型 genotype	样本(佛山)/尾 samples (Foshan)	频率(佛山)/% frequency (Foshan)	样本(邗江)/尾 samples (Hanjiang)	频率(邗江)/% frequency (Hanjiang)
A243G	G	3	3.8	0	0
	A	75	96.2	92	100
C252T	T	30	38.5	14	15.2
	C	48	61.5	78	84.8

2.3 ND4L 基因单倍型分布统计

在两种体色线粒体 *ND4L* 基因中共检测到 3 种单倍型, 分别为 Hap1(AC)、Hap2(AT)、Hap3(GC)

(表 3)。Hap1 出现的频率最高, Hap1 和 Hap2 在两种体色中均有分布, Hap3 的频率最低, 仅在正常体色中出现。

表 3 在两种体色的青鱼中检出的 3 种单倍型的分布

Tab. 3 Distribution of three haplotypes detected in two body colors of *M. piceus*

单倍型 haplotypes	组合 combination	样本(佛山)/尾 samples (Foshan)	频率(佛山)/% frequency (Foshan)	样本(邗江)/尾 samples (Hanjiang)	频率(邗江)/% frequency (Hanjiang)
Hap1	AC	77	84.6%	45	57.7%
Hap2	AT	14	15.4%	30	38.4%
Hap3	GC	0	0%	3	3.9%

2.4 ND4L 基因 CDS 与氨基酸序列结构的分析

ND4L 基因没有内含子, 其 CDS 序列长 297 bp, 以 ATG 开头, TAA 结尾。如图 2 所示, 297 bp 的 DNA 序列编码了 98 个氨基酸, CDS 序列来自登录号 MT084757。两个 SNPs 位点, A243G

为 A-G 的转换突变, C252T 为 C-T 的转换突变。A243G 位点编码苏氨酸, 位于密码子的第 3 位, 为同义突变。C252T 位点也是编码苏氨酸, 位于密码子的第 3 位, 为同义突变(表 4)。

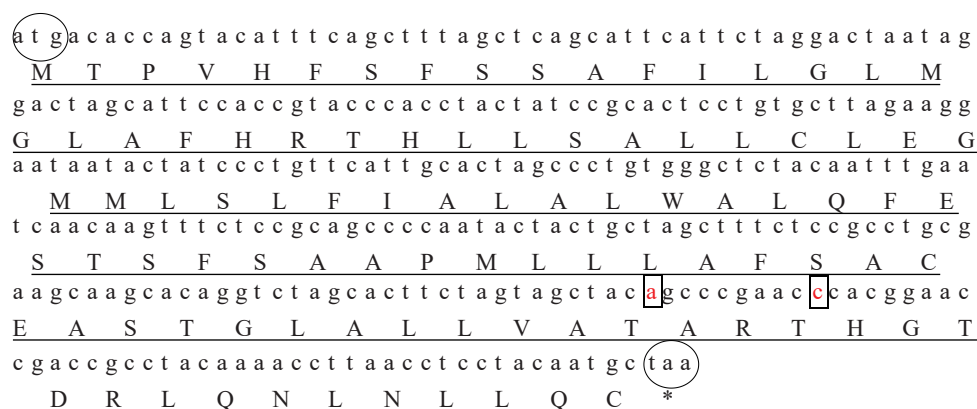


图 2 *ND4L* 基因 CDS 序列及氨基酸序列

椭圆. 起始密码子, 终止密码子; 方框. SNPs 位点 (a. A243G, c. C252T); 下划线. 氨基酸序列

Fig. 2 CDS sequence and amino acid sequence of *ND4L* gene

Ellipses indicate start codon/stop codon; boxes indicate SNPs (a. A243G, c. C252T); underscores indicate amino acid sequence

表 4 *ND4L* 基因 SNPs 位点对应的氨基酸变化

Tab. 4 Changes of amino acids in SNPs of *ND4L* gene

SNPs 位点 SNPs locus	对应氨基酸变化 mutant of amino acid residue	是否同义突变 synonymous mutation
A243G	苏氨酸 threonine (ACA)→苏氨酸 threonine (ACG)	是
C252T	苏氨酸 threonine (ACC)→苏氨酸 threonine (ACT)	是

3 讨论

线粒体 *ND4L* 基因编码的 *ND4L* 蛋白是呼吸复合物 I (NADH 脱氢酶) 亚基之一, 有研究表明, *ND4L* 基因与人类某些疾病有关联, 2 型糖尿病 (T2DM) 患者 T10609C 突变和白内障患者 C10676G 突变均发生在编码 *ND4L* 蛋白的 *mtDNA ND4L* 基

因上^[20], Leber 遗传性视神经病与在 *ND4L* 基因中同时发生的 10609T>C 和 10663T>C 突变相关^[21]。*ND4L* 基因在遗传育种与进化中更多的是用来研究系统发育关系^[22-24]。Guan 等^[25]的研究表明, 线粒体蛋白编码基因中, *ND4*、*ND4L* 基因在蜉蝣 (*Choroterpes yixingensis*) 中的稳态转录模式可以随着环境污染程度的不同而发生变化, 因此有可能

成为未来水生生态毒性监测的生物标志。杜民等^[26]对巨鲮(*Bagarius yarrelli*)线粒体 *ND3*、*tRNA-Arg* 和 *ND4L* 进行了测序, 发现 12 条巨鲮的 *ND4L* 基因序列仅存在 1 种单倍型, 说明 *ND4L* 基因的序列是高度保守的。

鱼类的体色由鱼体色素细胞的数量、分布的区域、色素细胞内色素颗粒的状态等决定^[27], 随生长发育及环境的改变而发生变化, 包括形态学体色变化和生理学体色变化^[28]。研究发现, 两个不同环境下的佛山灰色青鱼以及邗江黑色青鱼的线粒体 13 个蛋白质编码基因表达量有明显不同, *ATP6* 基因以及 *COIII* 基因在邗江黑色群体中的表达量要高于佛山灰色青鱼群体, 其余 11 个蛋白质编码基因则相反, *ND4L* 基因在两种体色青鱼中的表达差异最为明显。在 78 尾佛山灰色青鱼群体和 92 尾邗江黑色青鱼群体线粒体 *ND4L* 基因长为 297 bp 的 CDS 序列中共检测出 2 个 SNP 突变位点 A243G 和 C252T。研究发现青鱼线粒体 *ND4L* 基因上的 SNP 位点 (2 个) 占基因组碱基 (297 bp) 比例为 0.67%, 位于编码区, 且都为同义突变, 氨基酸的编码没有发生改变, 考虑到密码子存在偏好性, 本研究中检出的 *ND4L* 基因的同义突变密码子可能不是青鱼的最佳密码子, 甚至可能会突变成低效密码子, 而这也可能会影响苏氨酸的编码效率, 而后进一步对 *ND4L* 基因在青鱼生物体中的功能发挥产生影响, 这也可能影响佛山灰色青鱼群体表皮黑色素的数量和分布, 最终表现出较浅体色, 呈现灰色。在 2 种体色的群体中共发现了 3 种单倍型 Hap1 (AC)、Hap2 (AT)、Hap3 (GC), 其中 Hap1 (AC) 出现的频率最高, Hap1 (AC) 和 Hap2 (AT) 在两种体色中均有分布, Hap3 (GC) 的频率最低, 仅在正常体色中出现。

本研究筛选了两种体色青鱼线粒体 *ND4L* 基因并进行了 SNP 位点的筛选, 分析了两个 SNP 位点的基因型以及单倍型的分布。在后续的工作中可以进一步探究青鱼不同体色与生长性状之间的关系, 并与筛选到的 SNPs 分子标记相结合, 为青鱼优良品种选育及杂交育种提供理论依据, 促进青鱼养殖产业向健康、可持续、优质化方向发展。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 蒋焯, 黄权. 鱼类体色成因及影响因素研究进展[J]. 水产学报, 2019, 46(2): 110-113.

产科技情报, 2019, 46(2): 110-113.

Jiang Z, Huang Q. Research progress on the cause of formation of fish body color and its influencing factors[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2019, 46(2): 110-113 (in Chinese).

[2] Xing L L, Sun L, Liu S L, *et al.* Metabolomic analysis of white, green and purple morphs of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during body color pigmentation process[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 39: 100827.

[3] 李清清, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌生长性状和内壳色与所产无核珍珠质量的相关性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1631-1639.

Li Q Q, Bai Z Y, Liu X J, *et al.* Correlation analysis of non-nucleated pearl quality parameters with growth traits and inner shell color of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1631-1639 (in Chinese).

[4] 钱永生, 陈红林, 杜金星, 等. 4种体色瓯江彩鲤的生长、摄食和呼吸特性差异及其相关性分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(4): 695-702.

Qian Y S, Chen H L, Du J X, *et al.* Comparison of growth, feeding and respiration characteristics and their correlation among four color patterns in Oujiang color carp[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 695-702 (in Chinese).

[5] You K, Yang H S, Liu Y, *et al.* Effects of different light sources and illumination methods on growth and body color of shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 557-565.

[6] 吴秀林, 丁炜东, 曹哲明, 等. 不同体色黄鳝生物学特性的研究现状及前景[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2014, 23(3): 80-87.

Wu X L, Ding W D, Cao Z M, *et al.* Research status and prospects on biological characteristics of *Monopterus albus* with different colors[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2014, 23(3): 80-87 (in Chinese).

[7] 余成晨, 沈玉帮, 徐晓雁, 等. 草鱼生长相关的微卫星标记在选育群体中的验证[J]. 水产学报, 2021, 45(3): 321-332.

Yu C C, Shen Y B, Xu X Y, *et al.* Verification of microsatellite markers associated with growth traits in selected populations of grass carp (*Ctenopharyngodon*

- idella*][J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(3): 321-332 (in Chinese).
- [8] 吕耀平, 胡则辉, 王成辉, 等. 与"全红"瓯江彩鲤体色相关的SRAP及SCAR分子标记[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(1): 45-50.
Lü Y P, Hu Z H, Wang C H, *et al.* Srap and scar molecular marker related to body color of "whole red" patterns of *Cyprinus carpio* var. *color*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(1): 45-50 (in Chinese).
- [9] 刘丽, 刘楚吾, 岳文. 两种体色画眉笛雕的遗传多样性及分子标记[J]. *广东海洋大学学报*, 2008, 28(3): 12-15.
Liu L, Liu C W, Yue W. Genetic diversity and molecular markers of yellow and brown *Lutjanus vitta*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2008, 28(3): 12-15 (in Chinese).
- [10] 周传江, 马爱喆, 汪曦, 等. 鱼类线粒体基因组研究进展[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 47(2): 74-82.
Zhou C J, Ma A Z, Wang X, *et al.* Progress on fish mitochondrial genome[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 47(2): 74-82 (in Chinese).
- [11] 周丰林, 陶丽竹, 王安琪, 等. 养殖青鱼组织状态评估及肠道消化酶和抗氧化酶分布特征[J]. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(2): 205-213.
Zhou F L, Tao L Z, Wang A Q, *et al.* Evaluation of tissue status of cultured black carp and distribution characteristics of digestive enzyme and antioxidant enzyme in the intestine[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(2): 205-213 (in Chinese).
- [12] 丁淑荃, 祖国掌, 韦众, 等. 草-鲢-鳙和青鱼形态及其生长发育的比较研究[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(9): 1660-1662.
Ding S Q, Zu G Z, Wei Z, *et al.* Study on the growth and development of grass carp, silver carp, bighead and black carp[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2005, 33(9): 1660-1662 (in Chinese).
- [13] 徐长军. 青鱼鱼种养殖技术[J]. *科学养鱼*, 2018(11): 12.
Xu C J. Culture technique for black carp fingerling[J]. *Scientific Fish Farming*, 2018(11): 12 (in Chinese).
- [14] 苏玉红, 沈玉帮, 鲍生成, 等. 青鱼不同地理群体生长差异比较分析[J]. *淡水渔业*, 2021, 51(3): 20-26.
Su Y H, Shen Y B, Bao S C, *et al.* Comparative analysis on the growth difference of different geographic populations of *Mylopharyngodon piceus*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(3): 20-26 (in Chinese).
- [15] 王丰, 张猛, 沈玉帮, 等. 青鱼微卫星标记的开发与特性分析[J]. *动物学杂志*, 2019, 54(1): 57-65.
Wang F, Zhang M, Shen Y B, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers in black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2019, 54(1): 57-65 (in Chinese).
- [16] 王丰, 张家华, 沈玉帮, 等. 青鱼野生与养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(5): 939-944.
Wang F, Zhang J H, Shen Y B, *et al.* Microsatellite analysis of genetic variation of wild and cultural populations in black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(5): 939-944 (in Chinese).
- [17] Yue G H, Orban L. 2005. A simple and affordable method for high-throughput DNA extraction from animal tissues for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*. 26(16): 3081-3083.
- [18] Bao S C, Xie N, Xu X Y, *et al.* Complete mitochondrial genome of gray black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(3): 2076-2077.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Destiarani W, Mulyani R, Yusuf M, *et al.* Molecular dynamics simulation of T10609C and C10676G mutations of mitochondrial *ND4L* gene associated with proton translocation in type 2 diabetes mellitus and cataract patients[J]. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2020, 14: 1177932220978672.
- [21] Behbehani R, Melhem M, Alghanim G, *et al.* ND4L gene concurrent 10609T>C and 10663T>C mutations are associated with Leber's hereditary optic neuropathy in a large pedigree from Kuwait[J]. *British Journal of Ophthalmology*, 2014, 98(6): 826-831.
- [22] Dahlan I, Hanoon N A N. Chemical composition, palatability and physical characteristics of venison from farmed deer[J]. *Animal Science Journal*, 2008, 79(4): 498-503.
- [23] Ruiz-Vega M L, Hernández-Canchola G, León-Pan-

- iagua L. Molecular systematics and phylogeography of the endemic Osgood's deermouse *Osgoodomys banderanus* (Rodentia: Cricetidae) in the lowlands of western Mexico[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2018, 127: 867-877.
- [24] 牟少亮, 曾庆韬, 钱远槐. 线粒体*ND4-ND4L*基因在黑腹果蝇种组中的进化特征[J]. *实验生物学报*, 2004, 37(6): 456-460.
- Mou S L, Zeng Q T, Qian Y H. The evolutionary traits of mitochondrial *ND4-ND4L* in *Drosophila melanogaster* species group[J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2004, 37(6): 456-460 (in Chinese).
- [25] Guan J Y, Zhang Z Y, Cao Y R, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Choroterpes (Euthralus) yixingensis* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) and its mitochondrial protein-coding gene expression under imidacloprid stress[J]. *Gene*, 2021, 800: 145833.
- [26] 杜民, 叶德来, 牛宝珍, 等. 巨鲈线粒体*ND3, tRNA-Arg*和*ND4L*基因克隆及多态性分析[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(12): 32-37.
- Du M, Ye D L, Niu B Z, *et al.* Cloning and polymorphism analysis of mitochondrial *ND3, tRNA-Arg* and *ND4L* genes of *Bagarius yarrelli*[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2017, 39(12): 32-37 (in Chinese).
- [27] 余陆伟, 曹思雨, 王军, 等. 两种体色瓯江彩鲤黑色素形成比较[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 481-488.
- Yu L W, Cao S Y, Wang J, *et al.* Formation of melanin and *mitfa* in-situ in the Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 481-488 (in Chinese).
- [28] 贺国龙, 刘立鹤. 鱼类体色成因及其调控技术研究进展(上)[J]. *水产科技情报*, 2010, 37(2): 88-91.
- He G L, Liu L H. Advance of fish color mechanism and its control technology[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2010, 37(2): 88-91 (in Chinese).

Screening of SNP markers of mitochondrial *ND4L* gene in black carp (*Mylopharyngodon piceus*) and their frequencies in two different body color populations

MAO Siqi^{1,2}, BAO Shengcheng^{1,2}, XU Xiaoyan^{1,2}, LI Jiale^{1,2}, SHEN Yubang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to analyze the association between mitochondrial protein-coding genes and body color traits of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) and screen out SNP markers related to body color, this study selected the skin tissues of five Foshan gray black carp samples and five Hanjiang black *M. piceus* samples and detected the relative expression of 13 mitochondrial protein-coding genes in the skin tissues of the two color populations by qPCR, and then performed the significance analysis. The study designed primers for the CDS region sequence of the protein-coding gene with the most obvious expression difference, and then selected 78 Foshan gray *M. piceus* samples and 92 Hanjiang black *M. piceus* samples for sequencing, and screened out SNP markers based on the sequencing peak map. The results showed that among the 13 mitochondrial protein coding genes, the relative expression of *ND4L* gene is the most significant, the relative expression of *CO II* gene is the highest, and the relative expression of *ND5* gene is the lowest. Two SNPS (C252T and A243G) were detected in the mitochondrial *ND4L* gene of 170 *M. piceus* samples. The frequencies of A and G genotypes at A243G in Foshan gray body color population are 96.2% and 3.8%, while the frequencies of T and C genotypes at C252T are 38.5% and 61.5%. The frequencies of A and G genotypes of C252T locus in Han Jiang normal body color population are 100% and 0%, while the frequencies of T and C genotypes of C252T locus are 15.2% and 84.8%. Three haplotypes, AC, AT and GC were detected. AC shows the highest frequency; AC and AT are distributed in both body colors, while GC shows the lowest frequency and only appears in normal body colors. This study studied the distribution of genotypes and haplotypes of two SNPS in mitochondrial *ND4L* gene related to body color of *M. piceus* and provided theoretical guidance for the study of body color and growth traits of *M. piceus* as well as the breeding of *M. piceus*.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; mitochondria; *ND4L* gene; body color; SNP locus

Corresponding author: SHEN Yubang. E-mail: ybshen@shou.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45-03); Shanghai Engineering and Technology Center for Promoting Ability (19DZ2284300)