

DOI: 10.12264/JFSC2023-0139

Cyt *b* 和 12S rRNA 基因条形码在灯笼鱼科鱼类物种鉴定中的应用

刘乙蒙¹, 刘洋^{1, 2, 3, 4, 5}, 刘必林^{1, 2, 3, 4, 5}, 俞晔伟¹, 宋成辉¹, 王丛丛^{1, 2, 3, 4, 5}

1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306;
2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室, 上海 201306;
3. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306;
4. 农村农业部大洋渔业开发重点实验室, 上海 201306;
5. 农村农业部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306

摘要: 灯笼鱼科鱼类种类繁多, 且同属鱼类形态学相近, 因此利用分子标记对灯笼鱼进行准确的物种鉴定具有重要价值。为探讨线粒体细胞色素 *b* 基因(Cyt *b*)和 12S rRNA 基因在灯笼鱼科物种鉴定中的适用性, 对西北太平洋采集的 56 尾灯笼鱼进行扩增, 并进行序列对比与系统发育分析。研究表明, 采集的样本包括 6 种灯笼鱼, 分别为瓦氏角灯鱼(*Ceratoscopelus warmingii*)、长体标灯鱼(*Symbolophorus californiensis*)、粗鳞灯笼鱼(*Myctophum asperum*)、细泰勒灯鱼(*Tarletonbeania crenularis*)、日本背灯鱼(*Notoscopelus japonicus*)以及某背灯鱼属鱼类(*Notoscopelus* sp.)。核苷酸多态性分析显示, 基于 Cyt *b* 基因的种内与种间遗传距离比基于 12S rRNA 基因的更大。比较灯笼鱼科 2 种基因序列的结构特征, 发现 Cyt *b* 基因的种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 25 倍, 12S rRNA 基因的种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 26 倍, 均符合作为 DNA 条形码的基本要求。系统进化分析显示, 每种灯笼鱼均能形成独立分支, 2 个基因均能对 6 种灯笼鱼类进行鉴别; 但在 Cyt *b* 基因构建的进化树中, 每种鱼类能更好与数据库中已有的序列进行聚类。综上所述, Cyt *b* 和 12S rRNA 作为 DNA 条形码可以有效地对灯笼鱼科鱼类物种进行鉴定, 且 Cyt *b* 基因在系统进化关系的研究上具有更高的适用性。

关键词: 灯笼鱼科; Cyt *b* 基因; 12S rRNA 基因; 物种鉴定; 系统进化分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)09–1112–15

灯笼鱼科(Myctophidae)鱼类包含 34 属 225 种。在世界各大洋广泛分布^[1], 主要分布于大洋的中深层^[2], 具有垂直迁移的生活特性^[3]。白天灯笼鱼栖息于水下 100~200 m 处, 夜晚浮出水面捕食桡足类等小型无脊椎动物^[4–6]。同时, 灯笼鱼也是大洋高经济价值鱼类的重要食物来源^[7–8], 位于大洋食物网的中生态位, 起着重要的生态作用。灯笼鱼作为传统商业捕捞中常见的兼捕种^[9], 由于个体较小, 经济价值较低, 全球范围体系化的捕捞活动较少, 商业化进展缓慢。随着高价值鱼类的过度捕捞, 研究者将焦点放到以往被忽视的低价值

鱼类和水生生物中, 如灯笼鱼与深海头足类^[2]。西北太平洋海域属于高生产力海洋系统, 也是亲潮寒流与黑潮暖流交汇区域^[10], 虽是多种经济鱼类的渔场, 但生物多样性水平较低。灯笼鱼科鱼类作为西北太平洋海域优势种^[9], 由于资源量大, 蛋白质含量高, 被人们逐渐重视。为了更好地实现灯笼鱼科鱼类资源的可持续利用和开发, 应对灯笼鱼科鱼类进行正确的物种鉴定及更深入的系统进化研究。

传统的灯笼鱼科鱼类物种鉴定方法主要为形态学鉴定, 依赖于灯笼鱼发光器的数目与排

收稿日期: 2023-06-13; 修订日期: 2023-08-15.

基金项目: 农业农村部全球渔业资源调查监测评估(公海渔业资源综合科学调查)专项; 国家远洋渔业工程技术研究中心、大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室、农业农村部大洋渔业可持续利用重点实验室开放基金项目(A1-2006-23-200210).

作者简介: 刘乙蒙(1999–), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 1073217790@qq.com

通信作者: 王丛丛, 讲师, 研究方向为海洋生物学. E-mail: ccwang@shou.edu.cn

列, 以及鳍条数目进行辨别^[11-12]。由于灯笼鱼科鱼类种类繁多, 且同属鱼类形态学相近, 在捕捞过程中作为鉴定依据的发光器容易损坏与脱落, 形态学鉴定易出现误差^[1]。而分子生物学鉴定不依赖于样本的完整性, 可通过 DNA 对样本进行精确鉴定^[13]。DNA 条形码是生物体内能够代表该物种的, 标准的、具有一定变异的、易扩增的 DNA 片段^[14], 已成功在海洋鱼类物种鉴定与系统进化分析中运用, 弥补了传统形态学鉴定的不足^[15-18]。Batta-Lona 等^[3]利用 CO I 基因对形态学难以准确识别的灯笼鱼稚鱼进行鉴别, 结果表明形态学与分子鉴定结合所得到的鉴定结果更加精确。Lee 等^[1]利用 16S rRNA 基因对灯笼鱼进行物种鉴定, 发现了韩国海域以往从未出现的喀氏眶灯鱼(*Diaphus garmani*), 结果表明 16S rRNA 基因可有效分辨灯笼鱼科鱼类隐存种。Gallet 等^[4]利用 CO I 基因对大西洋石油泄漏区的灯笼鱼遗传多样性进行研究, 发现 CO I 基因可有效进行灯笼鱼科鱼类遗传多样性研究。可见以往使用 DNA 条形码对灯笼鱼进行物种鉴定主要以 CO I 和 16S rRNA 基因为主, 鲜少将 Cyt *b* 和 12S rRNA 基因用于灯笼鱼科鱼类的物种鉴定中。

细胞色素 *b* 基因(cytochrome *b*, Cyt *b*)是线粒体基因的 13 个蛋白质编码基因之一, 且进化速率适中, 相对保守, 是合适的物种鉴定标记^[19-20]。杨天燕等^[19]利用 Cyt *b* 基因对龙头鱼科及其近缘的灯笼鱼科等物种进行系统发育分析, 结果表明灯笼鱼属(*Myctophum*)与底灯鱼属(*Benthosema*)间具有较近亲缘关系。王利华等^[21]利用 CO I 与 Cyt *b* 基因对 6 种鲷属(*Culter*)鱼类的遗传距离与系统进

化关系进行分析, 探讨了这两种基因在鲷属鱼类分子鉴定中的可行性, 发现 Cyt *b* 基因可以对 6 种鲷属鱼类进行更有效的区分。李楠等^[22]利用形态学鉴定与分子进化树分析对 CO I 基因与 Cyt *b* 基因在中国常见河豚物种鉴定中的适用性进行研究, 研究表明 CO I 基因与 Cyt *b* 基因均可对河豚鱼进行有效区分。12S rRNA 属于不编码蛋白质, 大部分变异为中性突变, 进化速率较快, 因此能够有效地对物种间的同源性进行比较, 已被广泛应用于鱼类系统进化分析中^[23-25]。张凌^[26]利用 12S rRNA 基因构建系统进化树, 研究湖鲚(*Coilia macrognathos*)、短颌鲚(*Coilia brachygnathus*)是否属于刀鲚(*Coilia macrognathos*)新亚种, 研究表明湖鲚、短颌鲚实为刀鲚的淡水生态型种群, 并非新的有效物种。於俊琦等^[27]利用 12S rRNA 基因对浙南海域舌鳎属(*Cynoglossidae*)鱼类系统进化关系进行研究, 结果表明, 12S rRNA 基因可对除长吻红舌鳎外(*Cynoglossus lighti*)其他舌鳎属鱼类进行有效系统进化分析。

本研究基于 Cyt *b* 基因和 12S rRNA 基因对西北太平洋采集的 56 尾灯笼鱼科鱼类进行物种鉴定以及系统发育分析, 同时对这 2 种分子标记在灯笼鱼科鱼类物种鉴定的适用性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本实验灯笼鱼样本由上海海洋大学“淞航”号科考船于 2022 年 6—7 月采集于西北太平洋海域, 随后立即保存于 -80 °C 冰箱运回实验室。随机从 5 个灯笼鱼种类丰富的站点选取 56 尾样本, 详细采样信息见表 1。

表 1 本研究采样站点信息
Tab. 1 Sampling sites information in the study

站点名	site name	取样日期	sampling date	经度	longitude	纬度	latitude	取样数量	sample data	样本编号	sample number
T5		6.18		152°03'32"E		38°02'15"N		9		T5-1、T5-3-T5-10	
T14		6.29		158°20'00"E		43°04'00"N		15		T14-1-T14-15	
T15		6.3		158°31'00"E		40°08'12"N		15		T15-1-T15-15	
T33		7.24		162°00'23"E		41°59'48"N		12		T33-1-T33-12	
T34		7.25		159°54'31"E		39°56'37"N		5		T34-1-T34-5	

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增与测序

取灯笼鱼样本尾部肌肉组织 20 mg, 采用生工 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取样本基因组 DNA。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 存储于-20 °C 冰箱备用。

选取 Cyt *b* 通用引物 H14724、H15149^[28]以及 12S rRNA 通用引物 M13Li^[29]扩增线粒体 DNA Cyt *b*、12S rRNA 基因, 引物序列如表 2。PCR 总反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L 2X SanTaq PCR Mix, 正反向引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, 超纯水 9.5 μ L。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往上海生工生物

公司进行测序。

1.3 数据处理

使用 NCBI Blast 工具对所得样本序列进行物种鉴定。由于 NCBI 数据库中缺乏灯笼鱼科 Cyt *b* 基因与 12S rRNA 序列, 选择下载灯笼鱼科 19 属 29 种鱼类的线粒体全基因组序列, 选取翘嘴鲇 (*Culter alburnus*) 作为外群, 详见表 3, 并于线粒体全基因组序列截取相应的 Cyt *b* 基因与 12S rRNA 基因序列。使用 MEGA 7.0 软件进行剪切比对, 统计基因序列以及相应核苷酸序列变异情况。使用 K2P 模型对灯笼鱼科鱼类基于 Cyt *b* 基因及 12S rRNA 基因的种内、种间以及属内、属间遗传距离进行计算, 并使用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建分子系统进化树。

表 2 引物信息

Tab. 2 PCR primer information

引物 primer	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	目标产物长度/bp amplicon length
12S rRNA	M13Li-F	TGTAACACGACGGCCAGTGYCGGTA AAAAYTCGTGCCAG	760
	M13Li-R	CAGGAAACAGCTATGACYCCAAGYGCACCTCCGGTA	
Cyt <i>b</i>	L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG	480
	H15149	CCTCAGAAGGATATTGTCCTC	

表 3 用于构建系统进化树的物种序列来源

Tab. 3 Sequences resources used in phylogenetic tree construction

科 family	属 genus	物种 species	序列号 NCBI no.
灯笼鱼科 Myctophidae	炬灯鱼属 <i>Lampadena</i>	杨氏炬灯鱼 <i>Lampadena yaquinae</i>	AP012257.1
	珍灯鱼属 <i>Lampanyctus</i>	鳄珍灯鱼 <i>Lampanyctus crocodilus</i>	AP012258.1
		麦氏珍灯鱼 <i>Lampanyctus macdonaldi</i>	AP012241.1
	叶灯鱼属 <i>Lobianchia</i>	日本叶灯鱼 <i>Lobianchia gemellarii</i>	AP012242.1
	灯笼鱼属 <i>Myctophum</i>	金光灯笼鱼 <i>Myctophum affine</i>	AP002922.1
		粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	AP012234.1
		东方灯笼鱼 <i>Myctophum orientale</i>	AP012254.1
		斑点灯笼鱼 <i>Myctophum punctatum</i>	AP012239.1
	短鳃灯鱼属 <i>Nannobranchium</i>	宽鳍短鳃灯鱼 <i>Nannobranchium ritteri</i>	AP012247.1
	背灯鱼属 <i>Notoscopelus</i>	尾棘背灯鱼 <i>Notoscopelus caudispinosus</i>	AP012256.1
		日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	AP012252.1
	原灯笼鱼属 <i>Protomyctophum</i>	北极原灯笼鱼 <i>Protomyctophum arcticum</i>	AB648910.1
	臂灯鱼属 <i>Stenobranchius</i>	白身臂灯鱼 <i>Stenobranchius leucopsarus</i>	AP012245.1
	标灯鱼属 <i>Symbolophorus</i>	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	AP012246.1
	太宁灯鱼属 <i>Taaningichthys</i>	后臀太宁灯鱼 <i>Taaningichthys minimus</i>	AP012244.1
	泰勒灯鱼属 <i>Tarletonbeania</i>	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	NC_068844.1
尾灯鱼属 <i>Triphoturus</i>	墨西哥尾灯鱼 <i>Triphoturus mexicanus</i>	MG321596.1	
	黑尾灯鱼 <i>Triphoturus nigrescens</i>	AP012243.1	

(待续 to be continued)

(续表 3 Tab. 3 continued)

科 family	属 genus	物种 species	序列号 NCBI no.
灯笼鱼科 Myctophidae	虹灯鱼属 <i>Bolinichthys</i>	后光虹灯鱼 <i>Bolinichthys distofax</i>	AP012232.1
		眶暗虹灯鱼 <i>Bolinichthys pyrsobolus</i>	AP012261.1
	锦灯鱼属 <i>Centrobranchus</i>	椭锦灯鱼 <i>Centrobranchus choerocephalus</i>	AP012237.1
		眶灯鱼属 <i>Diaphus</i>	相模眶灯鱼 <i>Diaphus chrysorhynchus</i>
		亮眶灯鱼 <i>Diaphus splendidus</i>	NC_003164.1
		加州眶灯鱼 <i>Diaphus theta</i>	ON005612.1
	明灯鱼属 <i>Diogenichthy</i>	西明灯鱼 <i>Diogenichthys atlanticus</i>	AP012233.1
		底灯鱼属 <i>Benthoosema</i>	带底灯鱼 <i>Benthoosema fibulatum</i>
		七星底灯鱼 <i>Benthoosema pterotum</i>	NC_047480.1
		电灯鱼属 <i>Electrona</i>	卡氏电灯鱼 <i>Electrona carlsbergi</i>
	裸灯鱼属 <i>Gymnoscopelus</i>	尼氏裸灯鱼 <i>Gymnoscopelus nicholsi</i>	AP012250.1
	鲤科 Cyprinidae	鲃属 <i>Culter</i>	翘嘴鲃 <i>Culter alburnus</i>

2 结果与分析

2.1 灯笼鱼基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

从灯笼鱼样本中提取片段完整的基因组 DNA。利用 Cyt *b* 和 12S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 获得特异性条带, 产物电泳结果如图 1 所示。

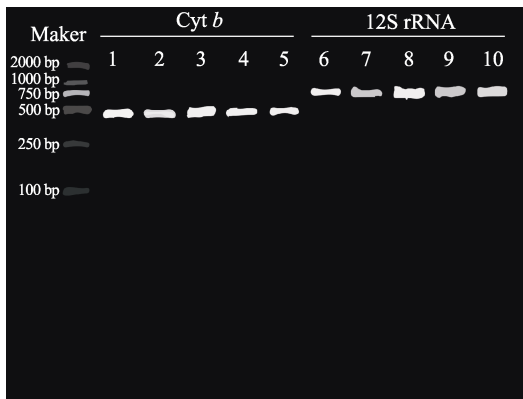


图 1 灯笼鱼科鱼类 Cyt *b* 基因及 12S rRNA 基因 PCR 产物

Fig. 1 PCR profile of Cyt *b* and 12S rRNA genes of Myctophidae

2.2 物种鉴定

56 尾灯笼鱼 Cyt *b* 和 12S rRNA 的序列比对和物种鉴定结果见表 4。除 T33-1、T5-1 及 T14-8 这 3 尾灯笼鱼应用 12S rRNA 鉴定为日本背灯鱼 (*Notoscopelus japonicus*), Cyt *b* 鉴定为长体背灯鱼 (*Notoscopelus elongatus*) 外, 其余样本两基因鉴定结果一致。此前经形态学初步分类为粗鳞灯笼鱼 (*Myctophum asperum*) 的灯笼鱼中, T33 站点的在

本研究中鉴定为粗鳞灯笼鱼; T14 站点的在本研究中鉴定为细泰勒灯鱼 (*Tarletonbeania crenularis*); T15 站点的形态如图 2a 的灯笼鱼被鉴定为粗鳞灯笼鱼, 形态如图 2b 的被鉴定为细泰勒灯鱼。经形态学鉴定初步分类为白皮灯笼鱼的灯笼鱼样本中, 在 T33、T15、T14 3 个站点中均被鉴定为瓦氏角灯鱼 (*Ceratoscopelus warmingii*), 而在站点 T5 中形态如图 2c 的被鉴定为瓦氏角灯鱼, 形态如图 2d 的被鉴定为长体标灯鱼 (*Symbolophorus californiensis*)。黑眼灯笼鱼经分子生物学鉴定为日本背灯鱼 (*Notoscopelus japonicus*)。

2.3 灯笼鱼 Cyt *b* 和 12S rRNA 序列特征分析

56 尾灯笼鱼序列特征如表 5 所示。Cyt *b* 基因中包含 81 个保守位点, 326 个变异位点, 171 个简约信息位点及 155 个单突变位点; 12S rRNA 基因中包含 145 个保守位点, 629 个变异位点, 588 个简约信息位点及 40 个单突变位点。Cyt *b* 基因的颠换值为 1.55, 12S rRNA 基因的颠换值为 1.01。

Cyt *b* 基因的平均碱基组成为 C 31.2%、T 27.2%、A 24.9%、G 16.7%, 12S rRNA 基因的平均碱基组成为 T 26.3%、G 26.1%、C 24.7%、A 22.9%, Cyt *b* 基因 A+T (52.1%) 含量高于 C+G (47.9%) 含量, 表现出 A+T 的偏倚性; 12S rRNA 序列 A+T (49.2%) 含量稍小于 C+G (50.8%) 含量。且 Cyt *b* 序列中第三密码子呈明显反 CG 偏倚, CG 含量为 42.5%。而 12S rRNA 序列中反 CG 偏倚则体现在第一密码子中, 为 47.1%。

表 4 2 种鱼类 DNA 条形码序列在 56 尾灯鱼中的物种鉴定结果
 Tab. 4 Species identification of two candidate barcode sequences in 56 fishes of Myctophidae

样本名称 sample code	12S rRNA gene		Cyt b gene	
	比对结果 matched species	BLAST 相似度/% similarity	比对结果 matched species	BLAST 相似度/% similarity
T33-1	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	92.68	长体背灯鱼 <i>Notoscopelus elongatus</i>	87.41
T33-2	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.13	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	94.07
T33-3	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.13	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.09
T33-4	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.27	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	92.84
T33-5	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.27	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.09
T33-6	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.71	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.17
T33-7	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.71	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.62
T33-8	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	97.73
T33-9	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.57	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.64
T33-10	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.71	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.40
T33-11	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.57	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	98.82
T33-12	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.43	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.09
T15-1	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.28	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	97.96
T15-2	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.29	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.54
T15-3	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.00	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.32
T15-4	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.43	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	98.65
T15-5	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.14	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	93.56
T15-6	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.13	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.56
T15-7	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.42	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.56
T15-8	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.14	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.32
T15-9	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.27	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.33
T15-10	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.27	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	91.18
T15-11	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.29	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.76
T15-12	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.43	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	98.86
T15-13	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.57	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.09
T15-14	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.57	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	98.19
T15-15	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.43	粗鳞灯笼鱼 <i>Myctophum asperum</i>	99.32
T5-1	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	92.68	长体背灯鱼 <i>Notoscopelus elongatus</i>	87.30
T5-3	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.27	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.09
T5-4	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.41	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	92.41
T5-5	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.41	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.07
T5-6	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.71	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	98.41
T5-7	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.11	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	98.18
T5-8	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.71	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.53
T5-9	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.86	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	98.19
T5-10	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	99.42	长体标灯鱼 <i>Symbolophorus californiensis</i>	97.95
T34-1	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	97.49
T34-2	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.57	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.17
T34-3	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	97.51
T34-4	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.57	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	97.94

(待续 to be continued)

(续表 4 Tab. 4 continued)

样本名称 sample code	12S rRNA gene		Cyt <i>b</i> gene	
	比对结果 matched species	BLAST 相似度/% similarity	比对结果 matched species	BLAST 相似度/% similarity
T34-5	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.71	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.17
T14-1	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.14	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	98.64
T14-2	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.43	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.09
T14-3	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.28	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	98.86
T14-4	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.43	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.31
T14-5	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	99.14	细泰勒灯鱼 <i>Tarletonbeania crenularis</i>	98.87
T14-6	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.41	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.32
T14-7	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.41	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.58
T14-8	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	92.83	长体背灯鱼 <i>Notoscopelus elongatus</i>	87.56
T14-9	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.41	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.33
T14-10	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	98.56	瓦氏角灯鱼 <i>Ceratoscopelus warmingii</i>	93.32
T14-11	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.63
T14-12	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.57	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.63
T14-13	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.85
T14-14	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	98.17
T14-15	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	99.86	日本背灯鱼 <i>Notoscopelus japonicus</i>	97.71

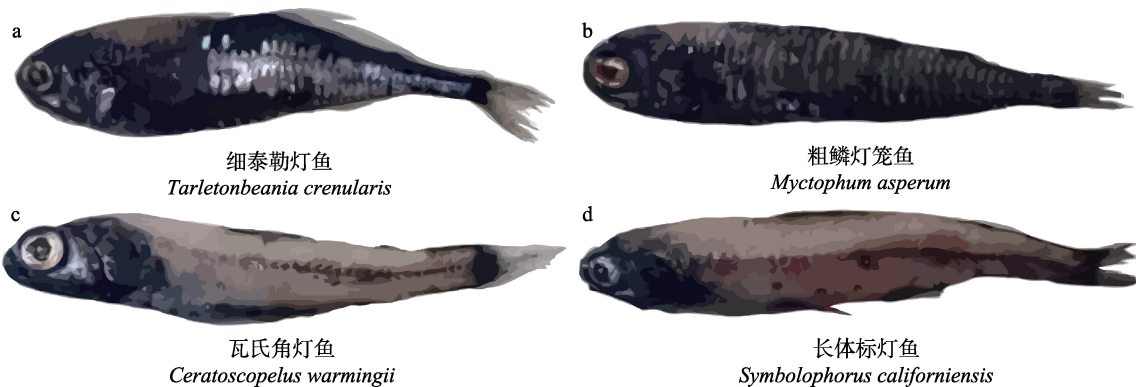


图 2 灯笼鱼部分样本图片
Fig. 2 Partial sample photos of fishes in Myctophidae

表 5 碱基平均分布频率
Tab. 5 Average nucleotide frequencies

基因 gene	碱基 base	T (U)	C	A	G	转换/颠换 conversion/transversion
Cyt <i>b</i>	总频率 frequency	27.2	31.2	24.9	16.7	1.55
	第一密码子 1st site of codon	23	42.7	23.6	10.5	1.66
	第二密码子 2nd site of codon	25	23.5	26.6	24.5	1.62
	第三密码子 3rd site of codon	33	27.2	24.6	15.3	1.17
12S rRNA	总频率 frequency	26.3	24.7	22.9	26.1	1.01
	第一密码子 1st site of codon	28	26.4	24.5	20.7	1.05
	第二密码子 2nd site of codon	26	20.9	23.9	29.5	0.95
	第三密码子 3rd site of codon	25	26.9	20.3	28.1	1.03

比较分析基于 *Cyt b* 和 12S rRNA 2 种基因序列的 6 种灯笼鱼种内种间核苷酸多态性, 以 100 bp 核苷酸开口中点为横坐标, 并分别以核苷酸多态性指数和核苷酸多态位点个数为纵坐标, 绘制 *Cyt b* 基因与 12S rRNA 基因的核苷酸多态性指数分析图(图 3)及核苷酸多态位点数图(图 4)。

图 3a 显示灯笼鱼科鱼类总体 *Cyt b* 基因核苷酸多态性较高, 鉴定得出的 6 种灯笼鱼科鱼类种内核苷酸多态性均在较低水准, 且高变区域多在 300~400 bp 处。由图 3b 可知 5 种 12S rRNA 基因鉴定得出的灯笼鱼高变区域为 500~650 bp, 尤其是日本背灯鱼的核苷酸多态性明显高于其他物种。

由图 4 可知 12S rRNA 基因相较于 *Cyt b* 基因种内突变更高, 且日本背灯鱼 12S rRNA 基因中 430~650 bp 间出现两个高变区, 粗鳞灯笼鱼高变区则出现在 250~300 bp 间。而 *Cyt b* 基因则表现出较低的种内突变, 以及较高的种间突变。

2.4 灯笼鱼种内种间遗传距离和 barcoding gap 检验

基于 *Cyt b* 与 12S rRNA 基因的灯笼鱼科鱼类遗传距离分析结果见表 6。在 12S rRNA 基因中, 笔者剔除了 T33-1、T5-1、T14-8 3 个鉴定为背灯鱼属的样本后进行遗传距离分析, 得到种内遗传距离为 0.003~0.012 (平均为 0.006), 种间遗传距

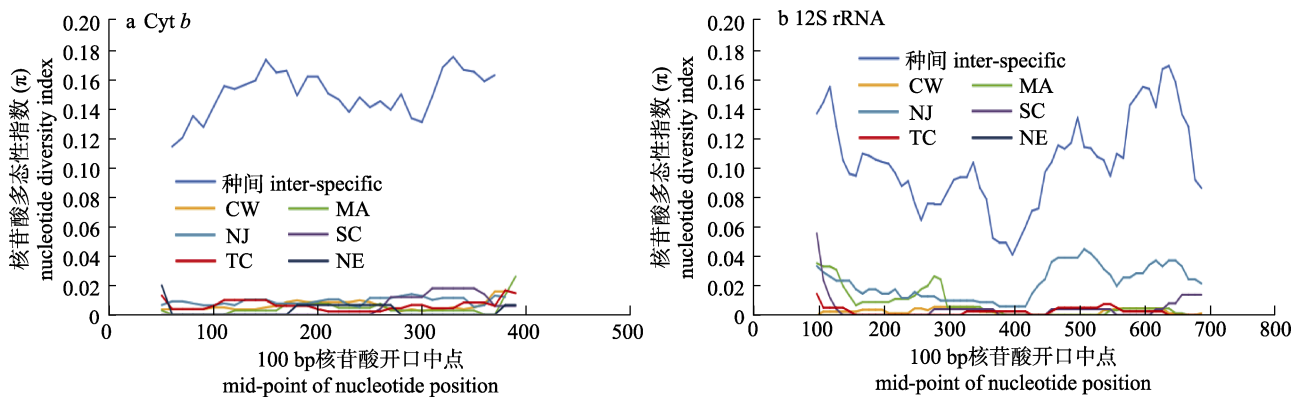


图 3 基于 *Cyt b* (a)和 12S rRNA (b)的 6 种灯笼鱼种内种间核苷酸多态性比较

CW: 瓦氏角灯鱼; MA: 粗鳞灯笼鱼; NJ: 日本背灯鱼; SC: 长体标灯鱼; TC: 细泰勒灯鱼; NE: 长体背灯鱼。

Fig. 3 Comparison of intra-specific and inter-specific nucleotide polymorphism based on *Cyt b* (a) and 12S rRNA (b) sequences of 6 Myctophidae species

CW: *Ceratoscopelus warmingii*; MA: *Myctophum asperum*; NJ: *Notoscopelus japonicus*;

SC: *Symbolophorus californiensis*; TC: *Tarletonbeania crenularis*; NE: *Notoscopelus elongatus*.

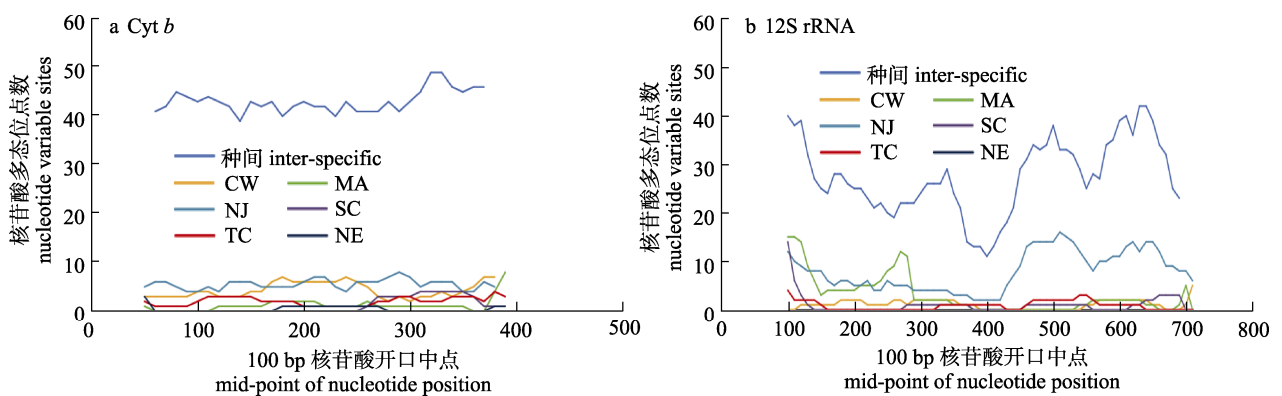


图 4 基于 *Cyt b* (a)、12S rRNA (b)的 6 种灯笼鱼种内种间核苷酸多态位点比较

CW: 瓦氏角灯鱼; MA: 粗鳞灯笼鱼; NJ: 日本背灯鱼; SC: 长体标灯鱼; TC: 细泰勒灯鱼; NE: 长体背灯鱼。

Fig. 4 Comparison of intra-specific and inter-specific of nucleotide variable sites based on *Cyt b* (a) and 12S rRNA (b) sequences of 6 Myctophidae species

CW: *Ceratoscopelus warmingii*; MA: *Myctophum asperum*; NJ: *Notoscopelus japonicus*;

SC: *Symbolophorus californiensis*; TC: *Tarletonbeania crenularis*; NE: *Notoscopelus elongatus*.

表 6 灯笼鱼科 *Cyt b* 及 12S rRNA 序列不同分类水平遗传距离

Tab. 6 Genetic distances according to different taxonomic levels within Myctophidae based on *Cyt b* and 12S rRNA sequences

变异来源 variation source	12S rRNA			<i>Cyt b</i>		
	最大值 maximum	最小值 minimum	平均值 average	最大值 maximum	最小值 minimum	平均值 average
种内 intra-specific	0.012	0.003	0.006±0.003	0.029	0.001	0.009±0.009
种间 inter-specific	0.184	0.108	0.155±0.022	0.273	0.145	0.224±0.033
属内 within genus	0.675	0.012	0.226±0.212	0.177	0.005	0.078±0.056
属间 between genus	1.528	0.027	0.597±0.54	0.281	0.113	0.210±0.034

离为 0.108~0.184 (平均为 0.155), 种间平均遗传距离是种内遗传距离的 26 倍。在 *Cyt b* 基因中, 种内遗传距离为 0.001~0.029 (平均为 0.009), 种间的平均遗传距离为 0.224, 是种内遗传距离的 25 倍。

Barcoding gap 是理想遗传变异条件下, 种内与种间遗传距离之间明显的非重叠间隔区(图 5a)^[30-32]。由图 5 可得 *Cyt b* 基因与 12S rRNA 基因均存在明显的条形码间隙, 不存在重叠区, 以证实各物种的有效性。

2.5 灯笼鱼系统进化关系

为进一步验证分子鉴定结果的准确性, 采用邻接法构建基于 12S rRNA (图 6)和 *Cyt b* 基因(图 7)序列的灯笼鱼科鱼类进化树。基于 *Cyt b* 和 12S rRNA 基因序列的 NJ 进化树自测序列结果基本一致, 同种个体均先聚集成一个单系, 且具有较高的支持率。基于 12S rRNA 基因绘制的 NJ 进化树中, 本研究自测序列与 NCBI 数据库中同种灯笼鱼序列并未聚为一支, 而是分为两个大支。

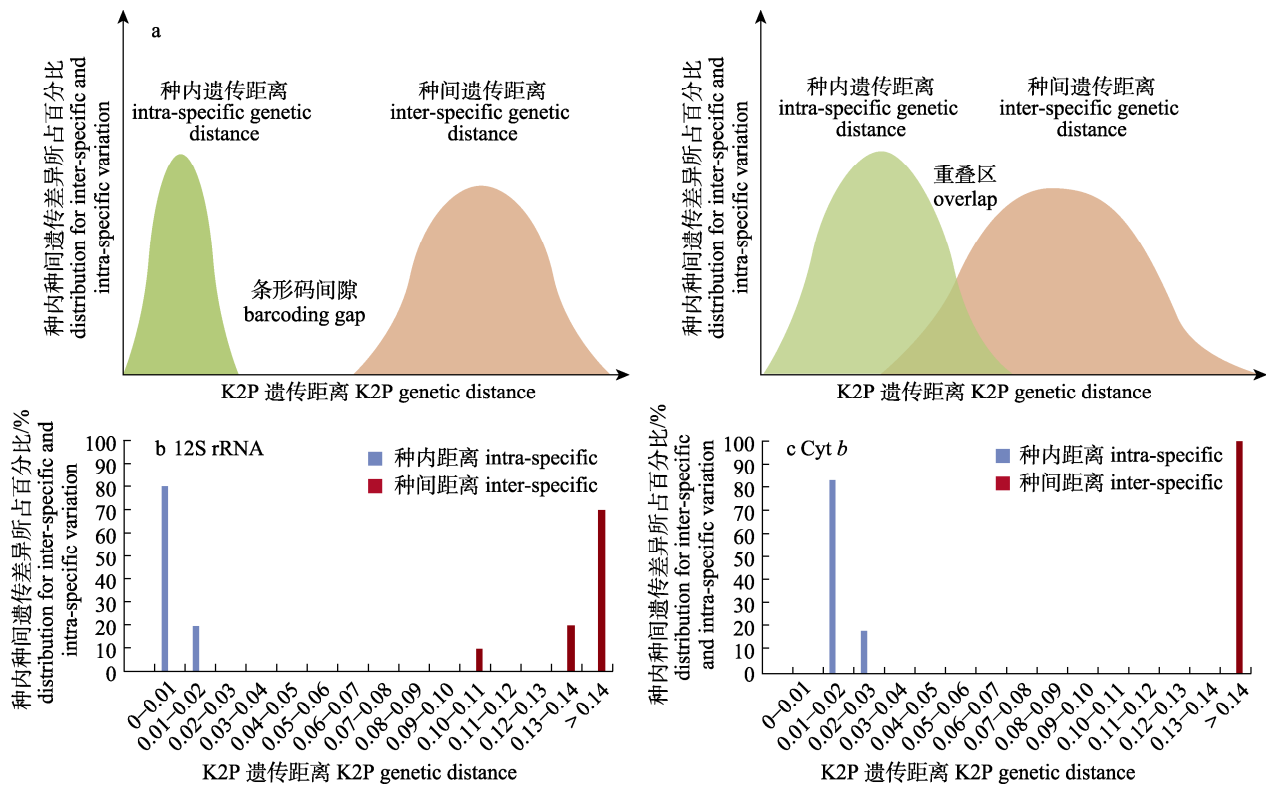


图 5 不同 DNA 条形码候选序列遗传距离分析图

条形码间隙演示图(a), 12S rRNA (b), *Cyt b* (c)序列的 K2P 遗传距离分布。

Fig. 5 Genetic distance distribution of different DNA candidate bar codes Schematic of the barcoding gap(a), K2P genetic distance of 12S rRNA (b) and *Cyt b* (c) sequences.

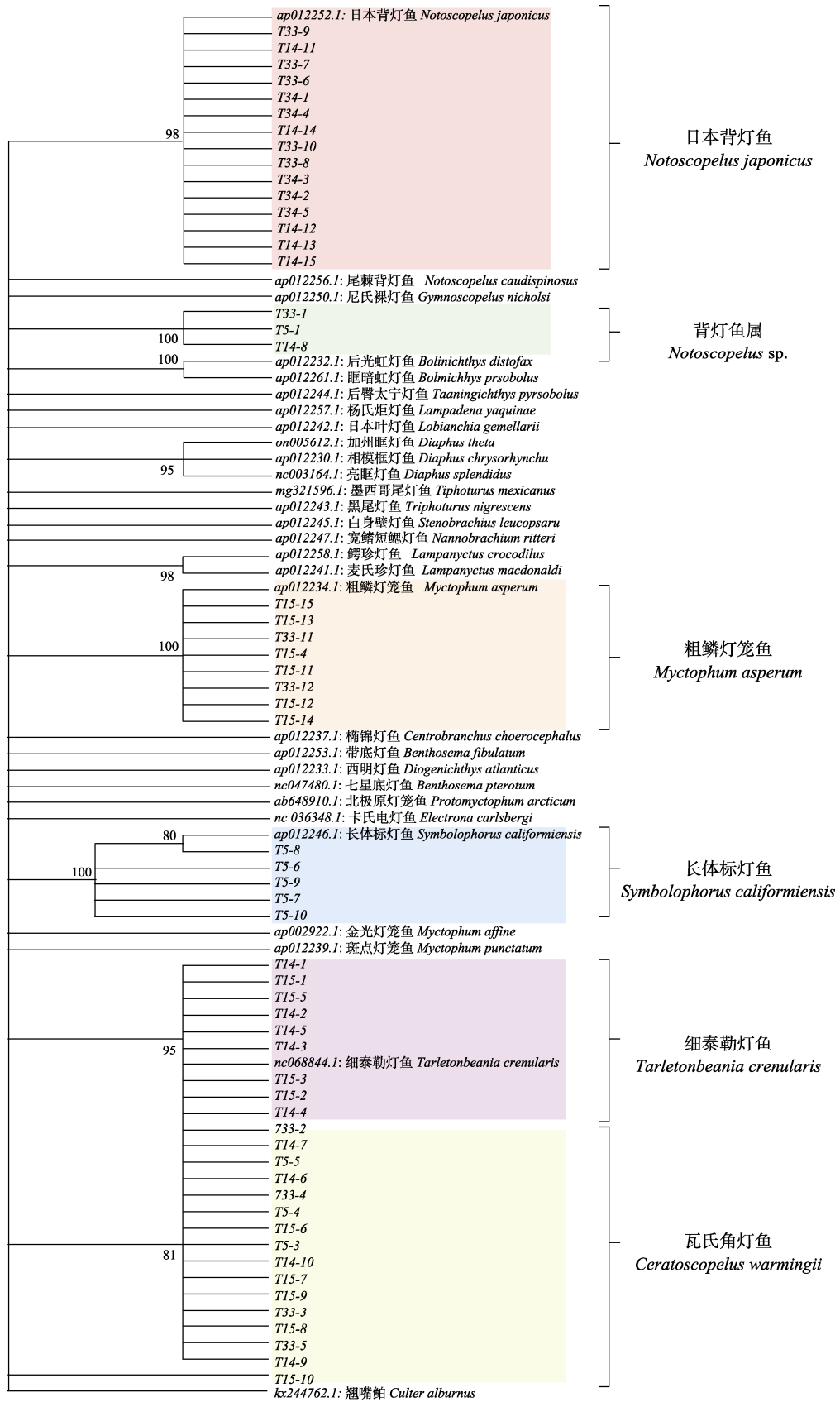


图 6 基于 Cyt b 基因的灯笼鱼科鱼类 NJ 进化树
 Fig. 6 NJ tree based on Cyt b sequence of Myctophidae

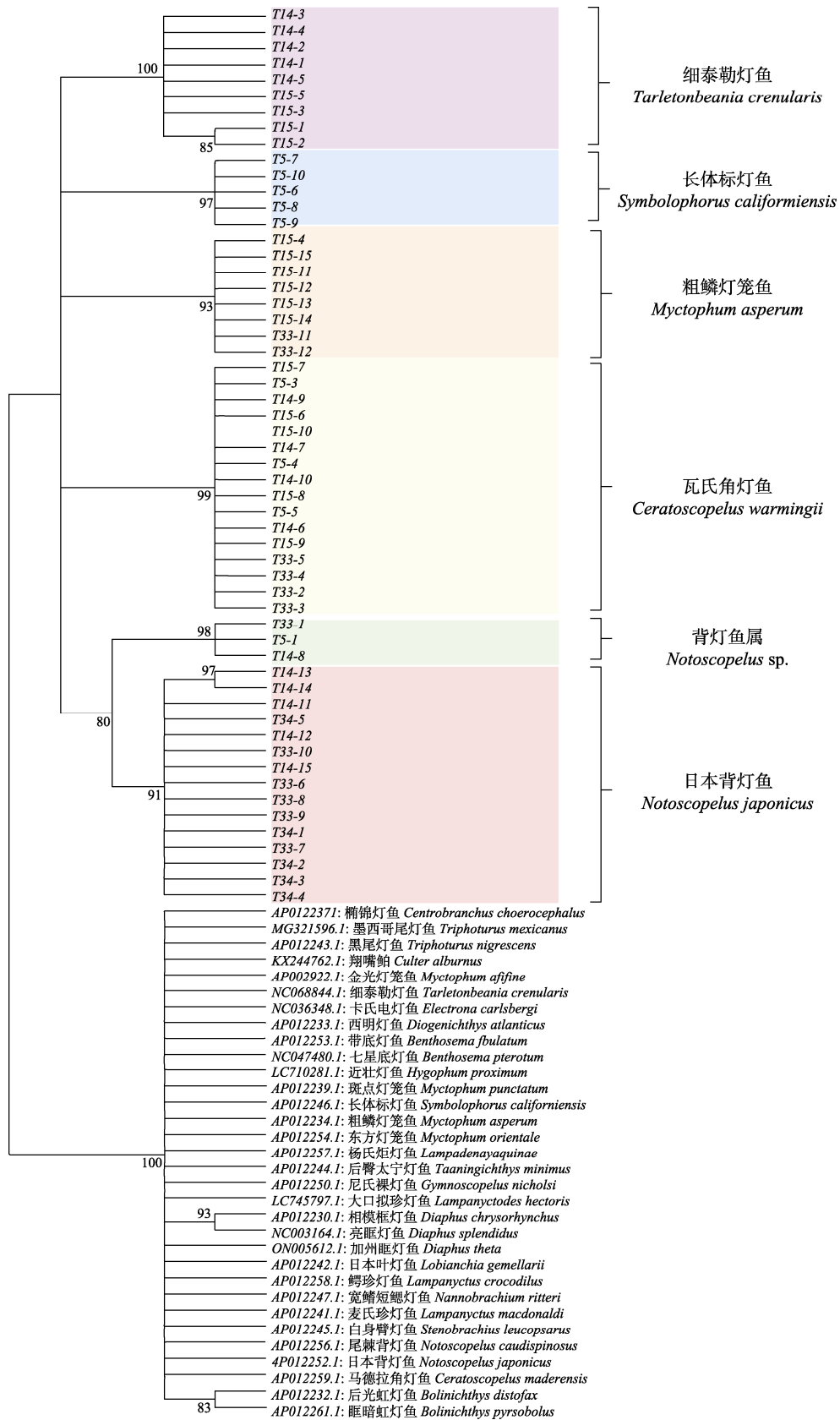


图 7 基于 12S rRNA 基因的灯笼鱼科鱼类 NJ 进化树

Fig. 7 NJ tree based on 12S rRNA sequence of Myctophidae

3 讨论

灯笼鱼因种类繁多、仔稚鱼形态特征相近,对传统形态学分类造成巨大影响。DNA 条形码可简便高效地为物种分类鉴定提供有力证据。BLAST 是用于比对研究样本与数据库序列相似度以确认物种的搜索程序,置信度越高代表比对结果越可信^[33]。Zhang 等^[34]将置信度 98%作为判断所测样本与比对数据库样本是否属于同一种类的分界值。本研究中 T33-1、T5-1、T14-8 这 3 个样本 BLAST 比对结果分别为日本背灯鱼(Cyt *b*)与长体背灯鱼(12S rRNA),但其置信度均低于 98%,由于 NCBI 数据库中灯笼鱼属 Cyt *b* 与 12S rRNA 基因数据缺乏,推断这 3 个样本可能为背灯鱼属其他鱼类物种。整体上 12S rRNA 基因(92.68%~99.86%)置信度高于 Cyt *b* 基因(87.30%~99.76%),就分子鉴定结果而言 12S rRNA 基因在灯笼鱼科鱼类物种鉴定中置信度更高。

碱基偏倚性在生物中广泛存在,不同类型不同生境的物种,其碱基使用也存在较大差异,对碱基偏倚性的分析有助于了解物种进化过程中自然选择与基因突变的过程^[19]。李明辉等^[35]利用 DNA 条形码技术对我国黄渤海虾虎鱼(Gobilidae)进行物种鉴定与系统进化研究,并分析了 13 种黄渤海虾虎鱼的碱基组成,发现 A+T 碱基含量偏高。本研究中, Cyt *b* 基因 A+T (52.1%)>C+G (47.9%)符合海水鱼类中 A+T 含量偏高规律,这与 Ward 等^[30]研究的海水鱼类碱基偏倚结果一致。而 12S rRNA 基因中 A+T (49.2%)<C+G (50.8%), C+G 含量较高,呈现不明显的 CG 偏倚。通常 DNA 序列在进化过程中基因转换的频率会高于基因颠换的频率,因此转换/颠换的比值 R 可用于评估 DNA 进化速率^[35]。武宝生等^[36]研究认为,当 R 值小于 2 时,基因突变达到饱和状态,并且受到进化噪声影响的可能性较大。本研究中灯笼鱼 Cyt *b* 基因颠换值 R 为 1.55, 12S rRNA 基因颠换值为 1.01, 均小于 2,说明这两个基因突变已达饱和状态,并且在进化过程中都受到了进化噪声影响^[37-38],且 12S rRNA 进化速率更快。

核苷酸多样性与种内种间平均遗传距离是衡

量线粒体 DNA 遗传变异的重要依据^[38]。且核苷酸多样性指数可以兼顾不同的线粒体 DNA 单倍型在群体中所占的比例,因此相较于单纯的平均遗传距离,两者相结合可以更好地反映线粒体 DNA 多态性^[39]。蒋芝华等^[40]认为,高的种内与种间核苷酸多态性在鉴别近缘物种时结果更加精确。本研究中 12S rRNA 基因种间核苷酸多态性低于 Cyt *b* 基因,且 12S rRNA 基因灯笼鱼科种间的核苷酸多态性指数最低值(0.041)小于日本背灯鱼种内核苷酸多态性最高值(0.045), Cyt *b* 基因种间核苷酸多态性指数最低值(0.115)远高于种内核苷酸多态性指数(0.018), Cyt *b* 基因相较于 12S rRNA 基因具有更明显的种内与种间核苷酸多态性差距,且 Cyt *b* 种内核苷酸多态位点数也处于低水平状态,说明灯笼鱼科鱼类 Cyt *b* 序列中种内突变更少,而种间突变更为明显,因此 Cyt *b* 基因更适用于区分灯笼鱼科鱼类近缘物种。

在分子生物学鉴定中,物种种内与种间遗传距离是物种界定的标准^[41]。本研究中灯笼鱼科鱼类 12S rRNA 基因种间遗传距离是种内遗传距离的 26 倍,而 Cyt *b* 基因的种间遗传距离是种内遗传距离的 25 倍,此外 Hebert 等^[42]还指出,物种的种内遗传距离应小于 DNA 条形码规定的最大种内遗传距离 0.020;在种内遗传距离中,两种基因所有物种最大种内遗传距离均小于 0.020,因此均符合 DNA 条形码鉴定标准及“10×法则”^[30,42],可对灯笼鱼科鱼类进行准确鉴定。DNA 条形码种间变异与种内变异间通常不存在重叠区,并应有明显间隔,即 DNA 条形码间隙(DNA barcoding gap)^[43]。本研究 Cyt *b* 与 12S rRNA 基因均存在条形码间隙,且 Cyt *b* 基因的条形码间隙明显大于 12S rRNA 基因。

线粒体 DNA 可以精确构建系统进化关系^[21]。本研究利用获得的 Cyt *b* 和 12S rRNA 基因进行灯笼鱼科鱼类系统进化分析,发现 12S rRNA 构建的 NJ 进化树 3 尾背灯鱼属鱼类与其他日本背灯鱼聚在一起形成一个复合支,亲缘关系较近,其余样本各聚为一支。基于 12S rRNA 基因构建的 NJ 进化树,自测序列与数据库序列无法形成有效聚类,分为两大支,说明 12S rRNA 基因适合于灯笼

鱼科鱼类物种鉴定,但在较高级分类阶元中不能有效地体现灯笼鱼科鱼类进化关系。Cyt *b* 基因构建的 NJ 进化树中,本研究自测序列可与数据库序列形成有效聚类,并清晰展现出系统进化关系,更适用于灯笼鱼系统进化分析。

综上所述,12S rRNA 基因与 Cyt *b* 基因均能有效地对灯笼鱼科鱼类进行物种鉴定。且 Cyt *b* 基因能更好与数据库中序列进行聚类,更适用于研究灯笼鱼科鱼类系统进化关系。由于数据库中灯笼鱼科鱼类 Cyt *b* 和 12S rRNA 基因序列条形码信息缺乏,所以在本实验中仍有部分灯笼鱼科鱼类无法精确鉴定。因此在未来的研究中应不断完善灯笼鱼科鱼类 DNA 条形码数据库,并结合多基因进行比对,从而获得更准确的鉴定结果。

参考文献:

- [1] Lee H L, Yu H J, Kim J K. New descriptions of four larval lanternfish species and cryptic diversity of *Benthoosema pterotum* (Pisces: Myctophidae) from the Northwest Pacific[J]. *Journal of Fish Biology*, 2022, 101(6): 1474-1500.
- [2] Li L N, Zhu W Z, Miao S C. Development and utilization of lantern fish resources[J]. *Fishery Information & Strategy*, 2012, 27(3): 240-245. [李励年, 朱文钊, 缪圣赐. 灯笼鱼资源的开发与利用[J]. *渔业信息与战略*, 2012, 27(3): 240-245.]
- [3] Batta-Lona P G, Galindo-Sánchez C E, Arteaga M C, et al. DNA barcoding and morphological taxonomy: Identification of lanternfish (Myctophidae) larvae in the Gulf of Mexico[J]. *Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 2019, 30(2): 375-383.
- [4] Gallet A, Koubbi P, Léger N, et al. Low-diversity bacterial microbiota in southern ocean representatives of lanternfish Genera *Electrona*, *Protomyctophum* and *Gymnoscopelus* (Family Myctophidae)[J]. *PLoS ONE*, 2019, 14(12): e0226159.
- [5] Cohen D L, Beckley L E. Diet and prey selectivity of the mesopelagic lanternfish *Myctophum asperum* from the Perth canyon, western Australia[J]. *Ichthyological Research*, 2021, 68(2): 294-302.
- [6] Habano A, Kobari T, Ohbayashi W, et al. Feeding habits of the skinnycheek lanternfish [*Benthoosema pterotum* (Alcock, 1890)] in Kagoshima Bay, southern Japan[J]. *Ichthyological Research*, 2021, 68(1): 164-170.
- [7] Lin C H, Lin J S, Chen K S, et al. Feeding habits of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the western Indian Ocean reveal a size-related shift in its fine-scale piscivorous diet[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 582571.
- [8] miR-Arguimbau J, Navarro J, Balcells M, et al. Feeding ecology of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in the NW Mediterranean: The important role of Myctophidae[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2020, 166: 103404.
- [9] Zhao G Q, Shi Y C, Fan W, et al. Study on main catch composition and fishing ground change of light purse seine in Northwest Pacific[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(1): 33-42. [赵国庆, 石永闯, 樊伟, 等. 西北太平洋灯光围网主要渔获物组成及渔场变动研究[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(1): 33-42.]
- [10] Han Y S, Jiang W, Xiao Y W, et al. Main change characteristics and influencing factors of tropical cyclones under the background of global change[J]. *Advances in Earth Science*, 2023, 38(5): 515-532. [韩岩松, 姜伟, 肖玉雯, 等. 全球变化背景下热带气旋主要变化特征及影响因素[J]. *地球科学进展*, 2023, 38(5): 515-532.]
- [11] Cavallaro M, Guerrero M C, Abbate F, et al. Morphological, ultrastructural and immunohistochemical study on the skin ventral photophores of *Diaphus holti* Tåning, 1918 (Family: Myctophidae)[J]. *Acta Zoologica*, 2021, 102(4): 405-411.
- [12] Saunders R A, Lourenço S, Vieira R P, et al. Length-weight and otolith size to standard length relationships in 12 species of Southern Ocean Myctophidae: A tool for predator diet studies[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2021, 37(1): 140-144.
- [13] Behrens-Chapuis S, Herder F, Geiger M F. Adding DNA barcoding to stream monitoring protocols-What's the additional value and congruence between morphological and molecular identification approaches?[J]. *PLoS ONE*, 2021, 16(1): e0244598.
- [14] Qu X Y, Liu L, Li C H, et al. Construction and application of DNA barcoding system for fishes in Yellow Sea and Bohai Sea[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35(6): 37-44. [曲欣宇, 刘璐, 李纯厚, 等. 黄、渤海鱼类 DNA 条形码信息平台构建及应用[J]. *水产学杂志*, 2022, 35(6): 37-44.]
- [15] Roy M, Belliveau V, Mandrak N E, et al. Development of environmental DNA (eDNA) methods for detecting high-risk freshwater fishes in live trade in Canada[J]. *Biological Invasions*, 2018, 20(2): 299-314.
- [16] Lira N L, Tonello S, Lui R L, et al. Identifying fish eggs and larvae: From classic methodologies to DNA metabarcoding[J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50(2): 1713-1726.
- [17] Yang L, Li A, Li B S, et al. DNA barcode analysis: Species identification and phylogenetic relationships of the Carangidae family[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021,

- 28(12): 1523-1535. [杨龙, 李昂, 李步苏, 等. 鲮科鱼类 DNA 条形码分类系统[J]. 中国水产科学, 2021, 28(12): 1523-1535.]
- [18] Wang W X, Li Y, Zhu H G, et al. Genetic differentiation of shortjaw tapertail anchovy *Coilia brachygnathus* population based on Cyt *b* and morphology[J]. Fisheries Science, 2022, 41(6): 949-958. [王玮欣, 李宇, 朱洪赓, 等. 基于形态和 Cyt *b* 序列的短颌鲚种群遗传分化研究[J]. 水产科学, 2022, 41(6): 949-958.]
- [19] Yang T Y, Jiang Y L, Guo Y J, et al. Molecular phylogeny of Harpadonnereus and its close relatives based on mitochondrial Cyt *b* gene[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2020(6): 77-85. [杨天燕, 蒋艳琳, 郭易佳, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的龙头鱼及其近缘物种分子系统发育研究[J]. 海洋湖沼通报, 2020(6): 77-85.]
- [20] Zhu W L, Xiao S, Yang C L, et al. Genetic structure analysis of *Acanthopagrus latus* populations along South China coast based on mitochondrial Cyt *b* gene sequences[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(2): 446-454. [朱威霖, 肖珊, 杨春玲, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因序列的华南沿海黄鳍棘鲷种群遗传结构分析[J]. 西南农业学报, 2021, 34(2): 446-454.]
- [21] Wang L H, Luo X Z, Wang D, et al. Identification analysis of DNA barcoding based on mitochondrial CO I and Cyt *b* genes in Culter fishes[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(4): 22-28. [王利华, 罗相忠, 王丹, 等. 基于 CO I 和 Cyt *b* DNA 条形码在鲈属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 淡水渔业, 2019, 49(4): 22-28.]
- [22] Li N, Wang J H, Han C H, et al. Application of COI and Cyt *b* gene in species identification of pufferfish[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(1): 6-11. [李楠, 王佳慧, 韩春卉, 等. COI 及 Cyt *b* 基因对河鲀鱼种鉴定的适用性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 6-11.]
- [23] Jiang P W, Li M, Zhang S, et al. Construction of DNA meta-barcode database of fish in Pearl River Estuary based on mitochondrial cytochrome COI and 12S rDNA gene[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(3): 13-21. [蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于线粒体 COI 和 12S rDNA 基因构建珠江河口鱼类 DNA 宏条形码数据库[J]. 南方水产科学, 2022, 18(3): 13-21.]
- [24] Chen Z, Gao T X. Differences in the identification of marine fish by mitochondrial 12S and COI barcodes[J]. Journal of Hainan Tropical Ocean University, 2023, 30(2): 10-16. [陈治, 高天翔. 线粒体 12S 与 COI 条形码对海洋鱼类的鉴定差异[J]. 海南热带海洋学院学报, 2023, 30(2): 10-16.]
- [25] Andriyono S, Alam M J, Kim H W. The Jawa and Bali Island marine fish molecular identification to improve 12S rRNA-tRNA valin-16S rRNA partial region sequences on the GenBank database[J]. Thalassas: an International Journal of Marine Sciences, 2020, 36(2): 343-356.
- [26] Zhang L. The species validity analysis of *Coilia brachygnathus* and *Coilia nasus taibuensis* based on themitochondrial 12srna genes sequences data[J]. Journal of Chaohu College, 2012, 14(6): 55-58. [张凌. 基于线粒体 12S rRNA 基因序列探讨湖鲚、短颌鲚物种有效性[J]. 巢湖学院学报, 2012, 14(6): 55-58.]
- [27] Yu J Q, Wu J G, Zhou Z M, et al. Phylogenetic analysis of six species of *Cynoglossus* along the south coastal area in Zhejiang province on partial sequence of mitochondrial 12S ribosomal RNA gene[J]. Bulletin of Science and Technology, 2012, 28(3): 43-48. [於俊琦, 伍锦姑, 周志明, 等. 基于线粒体 12S rRNA 基因部分序列的 6 种浙南海域舌鳎属鱼类系统进化研究[J]. 科技通报, 2012, 28(3): 43-48.]
- [28] Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(2): 163-173.
- [29] Stoeckle M Y, Das Mishu M, Charlop-Powers Z. Improved environmental DNA reference library detects overlooked marine fishes in new jersey, United States[J]. Frontiers in Marine Science, 2020, 7: 226.
- [30] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [31] Li H, Cao S A, Li Y A, et al. Molecular assessment of demersal fish diversity in Prydz Bay using DNA taxonomy[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2022, 202: 105140.
- [32] Ferrari C, Tovela E, Taviani E, et al. DNA barcoding to assess species identification in museum samples of Amphiliidae and natural samples of Cichlidae from Southern Mozambique[J]. Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali, 2022, 33(4): 713-720.
- [33] Ren J Y, Guo R, Jiao X Y. From the origins of SARS-CoV-2 to the correct application of BLAST[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 38(2): 221-227. [任建英, 郭睿, 焦向英. 从新冠病毒起源到 BLAST 工具的正确实践[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(2): 221-227.]
- [34] Zhang J J, Deng Q T, Liu X D, et al. Molecular identification of commercial fish maws by DNA sequencing of 16S rRNA and cytochrome oxidase I genes[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(10): 1439-1445.

- [35] Li M H, An C T, Li A, et al. DNA barcodes enable higher taxonomic assignments in goby in the Bohai Sea and Yellow Sea of China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(8): 1179-1188. [李明晖, 安长廷, 李昂, 等. 黄渤海虾虎鱼 DNA 条形码分类体系构建[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(8): 1179-1188.]
- [36] Wu B S, Si L Z, Kong X Y, et al. The analysis of ITS1 characteristics of 11 species from 5 families and its application in phylogenetic research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(4): 465-475. [武宝生, 司李真, 孔晓瑜, 等. 5科11种鱼类 ITS1 特征分析及其在系统分类研究中的适用性[J]. *水产学报*, 2018, 42(4): 465-475.]
- [37] Yang Y H. The genetic diversity of the glyptosternum maculatum populations[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019. [杨钰慧. 黑斑原鲃种群遗传多样性的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2019.]
- [38] Rozas J, Sánchez-DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DNA SP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [39] Du Q Y, Dong F J, Chang Z J. Genetic diversity of the mtDNA 16S rRNA and 12S rRNA genes in the population of *Misgurnus anguillicaudatus* from North Henan[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2014, 43(11): 137-140, 146. [杜启艳, 董方娟, 常重杰. 豫北泥鳅线粒体 DNA 16S rRNA 和 12S rRNA 基因序列的遗传多样性分析[J]. *河南农业科学*, 2014, 43(11): 137-140, 146.]
- [40] Jiang Z H, Ding B B, Wang Y, et al. DNA barcoding application to Sciaenidae[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(4): 673-680. [蒋芝华, 丁棒棒, 王熠, 等. 石首鱼科海洋鱼类 DNA 条形码的构建[J]. *核农学报*, 2018, 32(4): 673-680.]
- [41] Liu H Y, Cai J, Xie Z G, et al. DNA barcodes for species identification and systematic evolution of Cobitidae fish[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2020, 42(4): 766-777. [刘红艳, 蔡金, 谢仲桂, 等. 鳅科鱼类 DNA 条形码鉴定及系统进化研究[J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42(4): 766-777.]
- [42] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [43] Zhao W H, Yi S K, Su J X, et al. Genetic diversity of *Triplophysa yarkandensis* populations in Tarim River Basin in Xinjiang[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(3): 364-374. [赵文浩, 易少奎, 苏君晓, 等. 新疆塔里木河叶尔羌高原鳅遗传多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(3): 364-374.]

Identification analysis of DNA barcoding based on mitochondrial Cyt *b* and 12S rRNA genes in Myctophidae fishes

LIU Yimeng¹, LIU Yang^{1,2,3,4,5}, LIU Bilin^{1,2,3,4,5}, YU Yewei¹, SONG Chenghui¹, WANG Congcong^{1,2,3,4,5}

1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;
3. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai 201306, China;
4. Key Laboratory of Ocean Fisheries Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;
5. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

Abstract: The Myctophidae family is widely distributed in mesopelagic oceans worldwide and plays a significant role in the pelagic food chain due to its vertical migratory behavior. Myctophidae are diverse and the morphological differences between genera are not obvious. Therefore, the use of molecular markers for Myctophidae identification would be advantageous. In this study, we amplified 56 Myctophidae samples collected from the Northwest Pacific using the Cyt *b* and 12S rRNA genes. These amplified sequences were subsequently used for phylogenetic analyses alongside sequences from 29 other Myctophidae species in 18 genera from the GenBank database. We explored the applicability of Cyt *b* and 12S rRNA genes for identifying Myctophidae species. The results indicate that the 56 samples belonged to 6 species: *Ceratoscopelus warmingii*, *Symbolophorus californiensis*, *Myctophum asperum*, *Tarletonbeania crenularis*, *Notoscopelus japonicus*, and *Notoscopelus* sp. The intra-specific and inter-specific genetic distances based on the Cyt *b* gene were more pronounced than those based on the 12S rRNA gene. The difference between the average inter-specific and intra-specific genetic distances of Cyt *b* and 12S rRNA gene was 25 and 26, respectively. These results indicated that both genes meet the basic requirements for DNA barcodes. Phylogenetic analysis evidenced that the six Myctophidae species each formed an independent clade based on Cyt *b* and 12S rRNA gene sequences. However, in the evolutionary tree constructed based on the Cyt *b* gene, each fish clustered more closely with sequences in the GenBank database. In summary, both Cyt *b* and 12S rRNA genes could be used as DNA barcodes for identifying Myctophidae species, and the Cyt *b* gene was particularly suitable for analyzing phylogenetic relationships.

Key words: Myctophidae; cytochrome b gene; 12S rRNA gene; species identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: WANG Congcong. E-mail: ccwang@shou.edu.cn