

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210908002

http://www.yykxjz.cn/

王开杰, 徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 柳学周, 方璐, 薛志勇, 毛成全. 基于 *Cyt b*、*ND1* 及 *ND2* 的 DNA 条形码在鲷属鱼类物种鉴定中的应用. 渔业科学进展, 2022, 43(6): 89–101

WANG K J, XU Y J, CUI A J, JIANG Y, WANG B, LIU X Z, FANG L, XUE Z Y, MAO C Q. Application of DNA barcoding based on *Cyt b*, *ND1* and *ND2* in *Seriola* species identification. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(6): 89–101

基于 *Cyt b*、*ND1* 及 *ND2* 的 DNA 条形码 在鲷属鱼类物种鉴定中的应用*

王开杰^{1,2} 徐永江^{2①} 崔爱君² 姜燕²
王滨² 柳学周² 方璐² 薛志勇³ 毛成全³

(1. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院
黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071;
3. 海阳市黄海水产有限公司 山东 烟台 265122)

摘要 为建立我国鲷属(*Seriola*)鱼类快速有效的分子鉴别技术,从 DNA 条形码角度出发,分析了线粒体细胞色素 b (*Cyt b*)、NADH 脱氢酶(*ND1* 和 *ND2*)基因在黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)和五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)等鲷属鱼类物种鉴定和系统进化以及地理区域鉴别中的适用性。结果显示, *Cyt b* 基因表现出明显的 A+T 偏倚性, *ND2* 基因序列突变速率较高, 变异率为 20.52%, *ND2* 基因($H_d=0.900$, $P_i=0.082$)的遗传多样性高于 *ND1* ($H_d=0.874$, $P_i=0.077$)和 *Cyt b* ($H_d=0.814$, $P_i=0.061$)。比较了鲷属鱼类 3 种基因序列的结构特征, 基于 *ND1* 和 *ND2* 基因计算的鲷属鱼类种间遗传距离都为种内遗传距离的 10 倍以上, 但 *Cyt b* 基因对高体鲷和几内亚鲷(*Seriola carpenteri*)辨识力不足。系统进化分析显示, 每个物种都形成单系分支, 3 个基因均能对我国 3 种鲷属鱼类进行鉴别, 且都可有效区别来自全球 3 个不同水域的黄条鲷种群。因此, *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因不仅可作为鲷属鱼类物种鉴定的有效 DNA 条形码, 还可作为不同地理种群划分和种质资源科学保护的依据, 为我国鲷鱼养殖产业的持续健康发展和种质资源的可持续利用提供技术依据。

关键词 鲷属鱼类; DNA 条形码; 物种鉴定; 系统进化分析

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)06-0089-13

鲷鱼是鲈形目(Perciformes)、鲹科(Carangidae)、离洄游特性、栖息在海洋中上层的暖温性大型鱼类。
鲷属(*Seriola*)鱼类的统称, 是一类具有全球水域长距 全球共有鲷属鱼类 9 种(Takeyama *et al*, 2001; Nwani

* 国家重点研发计划项目(2019YFD0900901; 2018YFD0901204)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022021011)、国家海洋水产种质资源库项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助 [This work was supported by the National Key Research and Program of China (2019YFD0900901; 2018YFD0901204), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD47), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022021011), and China Agriculture Research System of MOF and MARA(CARS-47)]. 王开杰, E-mail: jasions@qq.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-09-08, 收修改稿日期: 2021-10-27

et al, 2011), 但存在“同种异名”、“同种异形”的现象。我国现分布有 3 种鲷属鱼类, 分别为黄条鲷(*Seriola lalandi*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)和五条鲷(*Seriola quinqueradiata*), 其肉质鲜嫩、营养丰富, 深受消费者喜爱(柳学周等, 2017); 其个体大、生长快, 特别适合深远海大型设施养殖, 是我国近年来发展深远海养殖的重要目标鱼类。3 种鲷属鱼类具有相似的体色和条纹, 利用传统的形态学鉴定方法难以准确辨别, 特别是受精卵和苗种形态上更难区分。鲷属鱼类种苗、受精卵、商品鱼的国际流通与贸易较为旺盛, 为防止外来物种入侵以及其他鱼类冒充鲷属鱼类问题的发生(Iguchi et al, 2012), 亟需建立一种适用、便捷、高效的物种鉴别方法。

线粒体 DNA 具有长度短、结构简单、排列紧凑、偏母性遗传和进化速度快的特性, 目前, 作为理想的分子标记被广泛应用在鱼类分子系统学、生态地理学和种群遗传学等领域(Wilson et al, 2010; 袁娟等, 2008)。DNA 条形码作为分子鉴定中最常见、最直接、最准确的方法, 是指生物体内能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段, 最早由 Barrent 等(2005)提出, 在物种鉴定和进化分析上都有较好的应用(Sepúlveda et al, 2019), 弥补了传统形态学鉴定方法的不足, 其中, 以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*CO I*)应用于鱼类物种鉴定最为广泛(王敏等, 2015)。随着条形码技术的不断发展, 进化速度适中的 *Cyt b* 和 NADH 脱氢酶基因(*ND* 基因), 也被用于亲缘关系较近的种间和种内的遗传差异分析(Clayton, 1992; 陈四海等, 2011)。*Cyt b* 在不同物种中表现出明显的遗传差异。毕潇潇等(2009)通过线粒体 16S rRNA、*CO I* 和 *Cyt b* 基因片段比较分析, 为 4 种鲷鱼(*Gadidae*)的鉴定提供了鉴别依据。*ND* 基因在鱼类不同分类阶元的系统发育研究中发挥作用(Serb et al, 2003; Bowen et al, 2008)。梁日深等(2014)通过 NADH 脱氢酶亚基 I (*ND1*)基因分析了 16 种胡

椒鲷属(*Plectorhinchus*)鱼类的亲缘关系; 高志远(2013)分析了我国 17 个地理群体乌鳢(*Channa argus*)线粒体 NADH 脱氢酶亚基 II (*ND2*)序列的遗传多样性, 为乌鳢分类和系统进化提供了依据。本研究探讨线粒体 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因在鲷属鱼类物种鉴定和群体划分中的适用性, 以期对鲷属鱼类物种鉴别、种群划分和种质资源保护及可持续利用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

我国 3 种鲷属鱼类样品采集于福建宁德(26°62'N, 119°75'E), 黄条鲷(SL) [$n=3$, 体重为(2.97±0.15) kg]、高体鲷(SD) [$n=3$, 体重为(3.40±0.48) kg]、五条鲷(SQ) [$n=3$, 体重为(4.78±0.54) kg]。另外, 采集了澳大利亚黄条鲷(ASL)(33°44'S, 151°45'E) [$n=2$, 体重为(1.86±0.26) kg]和日本黄条鲷(JSL) (32°45'N, 128°27'E) [$n=2$, 体重为(1.24±0.18) kg]野生群体样品。采集的所有样本通过形态学方法和图片资料分类确认。所有实验鱼用 MS-222 麻醉后, 取胸鳍放入无水乙醇中保存, 用于基因组 DNA 的提取。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取胸鳍组织样品 25 mg, 用解剖剪剪碎置于无菌离心管中, 采用天根海洋动物组织 DNA 试剂盒提取 DNA, 参照说明书进行操作。通过琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度和纯度, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增 根据序列比对分别设计 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因扩增特异引物(表 1)。3 个基因的 PCR 扩增体系均为 50 μL, 包括 *rTaq* 酶 25 μL、模板 2 μL、上下游引物各 1 μL 和 ddH₂O 21 μL, PCR 扩增条件程序见表 2。产物经检测合格后送生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序。

表 1 3 种鲷属鱼类线粒体 DNA 条形码 PCR 引物
Tab.1 Mitochondrial DNA barcode PCR primer of three *Seriola* species

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature/°C	PCR 产物 PCR product /bp
<i>Cyt b</i>	ATGAAACTTCGGCTCCCTC	52	538
	TAGGGGTGGAATGAAATTTGT		
<i>ND1</i>	GGGCCCTACGGGCTCCTTCAACC	63	673
	CGGGGTAGGAAGCTCGGAC		
<i>ND2</i>	ATGAACCCGTACATTATGGCCCT	55	907
	GTGGAAGCGTCAGGGGGCTGA		

表 2 3 种基因 PCR 扩增条件
Tab.2 PCR amplification conditions of three genes

基因 Gene	扩增条件 PCR condition									
	变性 Initial denaturation	退火 Annealing	72℃延伸 72℃Extension /s	循环数 Cycles	最后延伸 Final extension					
<i>Cyt b</i>	95℃ 5min	52℃ 50 s	50	38	72℃ 5 min					
<i>ND1</i>	95℃ 30 s	63℃ 50 s	60	38	4℃ Forever					
<i>ND2</i>		55℃ 60 s	100	38						

1.2.3 数据处理 将获得的测序结果采用 DNAMAN 和 DNAstar 软件进行序列拼接和校正,并在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。从 GenBank 数据库下载与本研究 3 种基因扩增区段一致的鲷科鱼类 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因序列,采用 DnaSP5.10 软件进行遗传多样性参数分析,包括单倍型数(h)、单倍型多样性指数(H_d)、核苷酸多样性指数(P_i)、平均核苷酸差异数(k)等。运用 MEGA 7.0 软件,统计序列碱基组成、密码子位点偏好性,计算序列保守位点、简约信息位点和变异位点等,运用最大似然法(maximum-likelihood, ML),自举检验 1000 次,采用 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离,并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

3 种鲷属鱼类的样本中均扩增出 3 个基因的目的片段,共获得 68 条序列,测序得到的 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 片段大小分别为 538、673、907 bp,与预测结果一致。3 种鲷属鱼类的 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因片段中 T、C、A 和 G 平均含量见表 3。*Cyt b* 基因中 A+T 平均含量为 50.9%,略高于 G+C 平均含量(49.1%),表

现出 A+T 偏倚性;*ND1* 基因(49.5%)和 *ND2* 基因(49.8%)中 A+T 平均含量均低于 G+C 平均含量(50.5%、50.2%);其中,五条鲷 *ND2* 基因 GC(51.1%)含量大于高体鲷 GC(48.7%)。除 *ND1* 和 *ND2* 基因外,*Cyt b* 基因表现出 A+T 偏倚性。

3 个基因密码子碱基含量见表 4。*Cyt b* 序列中,第 3 密码子位点 GC 含量(56.6%)显著高于第 1 和第 2 密码子位点(46.8%和 39.4%),且第 1 密码子变异位点最高(33)。*ND1* 序列中,第 3 密码子位点 GC 含量(43.9%)低于第 1 和第 2 密码子位点(52.7%和 55.0%)。*ND2* 序列中,第 3 密码子位点 GC 含量(44.6%)低于第 1 和第 2 密码子位点(51.7%和 54.0%)。*ND1* 各密码子变异位点相差不大,*ND2* 第 1 密码子变异位点最低(54),碱基使用频率 *Cyt b* 基因表现出明显 A+T 偏倚性。

3 种鲷属鱼类遗传多样性参数统计如表 5 所示。*Cyt b* 基因序列变异率为 16.73%,低于 *ND1* (17.53%)和 *ND2* (20.52%);*ND2* 的单倍型多样性指数为 0.900,高于 *Cyt b* (0.814)和 *ND1* (0.874),表明其遗传多样性高。从平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数来看,*ND2* (0.082)基因高于 *ND1* (0.077)和 *Cyt b* (0.061),表明其分化快,核苷酸变异程度较高。

表 3 3 种鲷属鱼类 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因的碱基组成
Tab.3 Base composition of *Cyt b*, *ND1* and *ND2* genes in three *Seriola* species

组编号 Group number	<i>Cyt b</i> 碱基含量 <i>Cyt b</i> base content /%				<i>ND1</i> 碱基含量 <i>ND1</i> base content /%				<i>ND2</i> 碱基含量 <i>ND2</i> base content /%			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
SL	27.9	32.0	23.2	16.9	26.7	32.8	22.1	18.3	25.1	35.0	24.9	15.0
JSL	27.9	32.0	23.1	17.0	26.7	32.8	22.1	18.3	25.3	34.9	24.9	14.9
ASL	28.3	32.0	23.2	16.5	27.0	32.5	22.0	18.4	24.5	35.1	23.8	16.6
SD	27.5	32.1	23.2	17.2	27.6	32.1	24.1	16.2	25.6	33.8	25.7	14.9
SQ	26.9	32.8	23.4	16.9	26.6	32.7	22.1	18.5	24.4	35.3	24.5	15.8
平均 Average	27.7	32.2	23.2	16.9	27.0	32.6	22.5	17.9	25.0	34.8	24.8	15.4

注: SL: 中国黄条鲷; JSL: 日本黄条鲷; ASL: 澳大利亚黄条鲷; SD: 高体鲷; SQ: 五条鲷

Note: SL: *Seriola lalandi* from China; JSL: *S. lalandi* from Japan; ASL: *S. lalandi* from Australia; SD: *S. dumerili*; SQ: *S. quinqueradiata*

表4 3种鲷属鱼类 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因序列片段各密码子碱基组成及变异位点
Tab.4 The sequence composition and variation of *Cyt b*, *ND1* and *ND2* genes in three *Seriola* species

位点 Site	<i>Cyt b</i>						<i>ND1</i>						<i>ND2</i>					
	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V	T	C	A	G	G+C	V
第1位点 1st site	25.8	23.0	23.8	27.4	46.8	28	19.6	39.5	27.7	13.2	52.7	40	18.2	39.4	30.1	12.3	51.7	54
第2位点 2nd site	39.5	24.3	20.1	16.1	39.4	33	21.6	25.7	23.4	29.3	55.0	39	18.2	32.1	27.8	21.9	54.0	64
第3位点 3rd site	17.5	49.3	25.9	7.3	56.6	29	39.7	32.6	16.4	11.3	43.9	39	38.7	32.8	16.7	11.8	44.6	66

注: V 表示变异位点数 Note: V: Variable sites

表5 3种基因片段的遗传多样性参数
Tab.5 Genetic diversity parameters of three gene fragments

基因 Gene	序列长度 Sequence length /bp	遗传多样性参数 Genetic diversity parameters							
		C	V	PI	R	h	H_d	k	P_i
<i>Cyt b</i>	538	448	90	88	4.63	7	0.814	32.577	0.061
<i>ND1</i>	673	555	118	118	6.87	7	0.874	47.115	0.077
<i>ND2</i>	907	722	186	186	3.89	8	0.900	74.165	0.082

注: C: 保守位点; V: 变异位点; PI: 简约信息位点; R: 转换/颠换比; h: 单倍型数; H_d : 单倍型多样性指数; k: 平均核苷酸差异数; P_i : 核苷酸多样性指数

Note: C: Conserved sites; V: Variable sites; PI: Parsimony-informative sites; R: Transitions/transversions ratio; h: Number of haplotypes; H_d : Haplotype diversity; k: Average number of nucleoside difference; P_i : Nucleotide diversity

2.3 遗传距离分析

基于 *Cyt b* 基因的鲷属鱼类的遗传距离分析结果见表6, 种内遗传距离为 0~0.006 (平均为 0.003), 种间的平均遗传距离为 0.121, 为种内平均遗传距离的 40 倍, 符合 Hebert 等(2004)提出的“10×规则”。其中, 几内亚鲷与高体鲷的亲缘关系较近, 遗传距离为 (0.004~0.009), 故 *Cyt b* 不能有效区分这 2 种鱼。中国与日本黄条鲷的平均遗传距离为 (0~0.002), 与澳大利亚黄条鲷的遗传距离均为 0.029, 可见 *Cyt b* 基因能有效区分中国、日本与澳大利亚黄条鲷群体。鲷属鱼类同 4 种鲷科鱼类之间的遗传距离均 > 0.12, 表明 *Cyt b* 基因还可用于鲷属鱼类与其他鲷科鱼类的区分。

基于 *ND1* 基因的鲷属鱼类的遗传距离分析结果见表7, 种内遗传距离为 0~0.007, 平均遗传距离为 0.002, 属内种间遗传距离为 0.048~0.173, 平均遗传距离为 0.077, 为种内平均遗传距离的 38.5 倍。黄条鲷与五条鲷遗传距离最小 (0.083~0.087), 与高体鲷的遗传距离最大 (0.137~0.139)。中国和日本黄条鲷种群遗传距离较小 (0~0.003), 中国与澳大利亚黄条鲷遗传距离较大 (0.048)。鲷属鱼类与其他鲷科鱼类的遗传距离较大 (0.142~0.250), 表明 *ND1* 基因能将鲷属鱼类不同地理群体和物种有效区分, 还可用于鲷科鱼类属间高阶分类单元。

基于 *ND2* 基因的鲷属鱼类的遗传距离分析结果见表8, 种内遗传距离为 0~0.003 (平均为 0.002); 种

间的平均遗传距离为 0.092, 为种内平均遗传距离的 46 倍; 黄条鲷与五条鲷遗传距离较小 (0.091~0.098), 高体鲷与五条鲷遗传距离较大 (0.160~0.173)。中国和日本种群黄条鲷的遗传距离 (0~0.003) 远小于中国和澳大利亚种群的遗传距离 (0.055~0.058)。除小甘鲷 (*Seriolina nigrofasciata*) 外, 鲷属鱼类与另外 3 种鲷科鱼类的遗传距离均在 0.23 以上, 亲缘关系较远, 表明 *ND2* 基因可有效区分鲷属鱼类甚至鲷科鱼类, 也可有效辨识不同地理种群的黄条鲷。

2.4 系统进化树分析

由基于 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因序列构建的鲷属鱼类系统进化树发现, 其拓扑结构与形态学结果一致, 主要包括两大分支: 由鲷属鱼类和小甘鲷组成一大支; 另一支则由长身圆鲷 (*Decapterus macrosoma*)、乌鲷 (*Parastromateus niger*) 和竹荚鱼 (*Trachurus trachurus*) 组成。系统进化分析显示, 每个鱼种都聚为独立分支, 各物种均能有效区分且具有很高的支持度。同时, 基于 *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 构建的进化树显示, 中国和日本黄条鲷聚为独立分支, 可有效区分中国、日本和澳大利亚黄条鲷。此外, 黄条鲷和五条鲷聚为一支, 高体鲷和长鳍鲷聚为一支, 表现出彼此相近的亲缘关系。基于 *Cyt b* 基因, 几内亚鲷与高体鲷表现出高度的序列同源性, 聚在同一结点上, 无法进行有效区分。可见, 除 *Cyt b* 外, *ND1* 和 *ND2* 基因所建的 ML 树对鲷属鱼类的不同鱼种具有准确的辨识力。

表 6 基于 *Cyt b* 的遗传距离分析
Tab.6 Genetic distance analysis based on *Cyt b*

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1																							
2	0																						
3	0.029	0.029																					
4	0.029	0.029	0																				
5	0.126	0.126	0.126	0.126																			
6	0.123	0.123	0.124	0.124	0.006																		
7	0.029	0.029	0	0	0.126	0.124																	
8	0.031	0.031	0.002	0.002	0.128	0.126	0.002																
9	0.086	0.086	0.084	0.084	0.140	0.138	0.084	0.086															
10	0.088	0.088	0.086	0.086	0.142	0.140	0.086	0.088	0.002														
11	0.187	0.187	0.184	0.184	0.189	0.187	0.184	0.184	0.176	0.179													
12	0.029	0.029	0	0	0.126	0.124	0	0.002	0.084	0.086	0.184												
13	0.123	0.123	0.128	0.128	0.009	0.004	0.128	0.131	0.142	0.145	0.192	0.128											
14	0.123	0.123	0.124	0.124	0.006	0	0.124	0.126	0.138	0.140	0.187	0.124	0.004										
15	0.137	0.137	0.142	0.142	0.126	0.119	0.142	0.145	0.137	0.140	0.187	0.142	0.124	0.119									
16	0.029	0.029	0	0	0.126	0.124	0	0.002	0.084	0.086	0.184	0	0.128	0.124	0.142								
17	0	0	0.029	0.029	0.126	0.123	0.029	0.031	0.086	0.088	0.187	0.029	0.123	0.137	0.029								
18	0.131	0.131	0.143	0.143	0.086	0.084	0.143	0.145	0.135	0.137	0.180	0.143	0.088	0.084	0.140	0.143							
19	0.133	0.133	0.136	0.136	0.140	0.143	0.136	0.138	0.131	0.133	0.187	0.136	0.148	0.143	0.140	0.136	0.133	0.126					
20	0.176	0.176	0.187	0.187	0.169	0.161	0.187	0.189	0.157	0.159	0.194	0.187	0.166	0.161	0.174	0.187	0.176	0.157	0.175				
21	0.162	0.162	0.177	0.177	0.174	0.172	0.177	0.177	0.176	0.179	0.187	0.177	0.172	0.172	0.184	0.177	0.162	0.171	0.205	0.191			
22	0.088	0.088	0.086	0.086	0.142	0.140	0.086	0.088	0.002	0.004	0.179	0.086	0.145	0.140	0.135	0.086	0.088	0.137	0.129	0.159	0.179		
23	0.165	0.165	0.179	0.179	0.181	0.179	0.179	0.179	0.191	0.193	0.162	0.179	0.183	0.179	0.191	0.179	0.165	0.167	0.222	0.188	0.151	0.193	

注: 1~2: 澳大利亚黄条鲷; 3~4: 中国黄条鲷; 5~6: 中国高体鲷; 7~8: 日本黄条鲷; 9~10: 中国五条鲷; 11: 乌鲷(KJ192332); 12: 中国黄条鲷(MH211123); 13: 几内亚鲷(KX512706); 14: 日本高体鲷(AB517558); 15: 斑纹鲷(DQ197998); 16: 日本黄条鲷(AB517557); 17: 澳大利亚黄条鲷(LC597109); 18: 长鳍鲷(KP347126); 19: 环带鲷(MT455069); 20: 小甘鲷(KT591876); 21: 长身圆鲷(KF841444); 22: 日本五条鲷(AB517556); 23: 竹荚鱼(AB108498)
 Note: 1 and 2: *Seriola lalandi* from Australia; 3 and 4: *Seriola lalandi*; 5 and 6: *Seriola lalandi* from China; 7 and 8: *Seriola lalandi* from Japan; 9 and 10: *Seriola quinqueradiata* from China; 11: *Parastromateus niger* (KJ192332); 12: *Seriola lalandi* (MH211123); 13: *Seriola carpenteri* (KX512706); 14: *Seriola dumerilii* (AB517558); 15: *Seriola fasciata* (DQ197998); 16: *Seriola lalandi* (AB517557); 17: *Seriola lalandi* (LC597109); 18: *Seriola rivoliana* (KP347126); 19: *Seriola zonata* (MT455069); 20: *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 21: *Decapterus macrosona* (KF841444); 22: *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 23: *Trachurus trachurus* (AB108498)

表 7 基于 *ND1* 的遗传距离分析
Tab.7 Genetic distance analysis based on *ND1*

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1																				
2	0																			
3	0.048	0.048																		
4	0.048	0.048	0																	
5	0.139	0.139	0.137	0.137																
6	0.139	0.139	0.137	0.137	0															
7	0.051	0.051	0.003	0.003	0.137	0.137														
8	0.051	0.051	0.003	0.003	0.137	0.137	0													
9	0.085	0.085	0.085	0.085	0.130	0.130	0.089	0.089												
10	0.085	0.085	0.085	0.085	0.130	0.130	0.089	0.089	0											
11	0.243	0.243	0.241	0.241	0.209	0.209	0.241	0.241	0.211	0.211										
12	0.048	0.048	0	0	0.137	0.137	0.003	0.003	0.085	0.085	0.241									
13	0.139	0.139	0.137	0.137	0	0	0.137	0.137	0.130	0.130	0.209	0.137								
14	0.048	0.048	0	0	0.137	0.137	0.003	0.003	0.085	0.085	0.241	0	0.137							
15	0	0	0.048	0.048	0.139	0.139	0.051	0.051	0.085	0.085	0.243	0.048	0.139	0.048						
16	0.087	0.087	0.083	0.083	0.134	0.134	0.087	0.087	0.007	0.007	0.220	0.083	0.134	0.083	0.087					
17	0.160	0.160	0.169	0.169	0.101	0.101	0.173	0.173	0.151	0.151	0.205	0.169	0.101	0.169	0.160	0.155				
18	0.139	0.139	0.155	0.155	0.142	0.142	0.155	0.155	0.163	0.163	0.197	0.155	0.142	0.155	0.139	0.169	0.167			
19	0.213	0.213	0.227	0.227	0.233	0.233	0.227	0.227	0.211	0.211	0.180	0.227	0.233	0.227	0.213	0.217	0.230	0.230		
20	0.248	0.248	0.246	0.246	0.237	0.237	0.250	0.250	0.221	0.221	0.182	0.246	0.237	0.246	0.248	0.231	0.235	0.238	0.153	

注: 1~2: 澳大利亚黄条鲷; 3~4: 中国黄条鲷; 5~6: 中国高体鲷; 7~8: 日本黄条鲷; 9~10: 中国五条鲷; 11: 乌鲔(KJ192332); 12: 中国黄条鲷(MH211123); 13: 日本高体鲷(AB517558); 14: 日本黄条鲷(AB517557); 15: 澳大利亚黄条鲷(LC597109); 16: 日本五条鲷(AB517556); 17: 长鳍鲷(KP347126); 18: 小甘鲷(KT591876); 19: 竹荚鱼(AB108498); 20: 长身圆鲔(KF841444)

Note: 1 and 2: *Seriola lalandi* from Australia; 3 and 4: *Seriola lalandi*; 5 and 6: *Seriola dumerili* from China; 7 and 8: *Seriola lalandi* from Japan; 9 and 10: *Seriola quinqueradiata* from China; 11: *Parastromateus niger* (KJ192332); 12: *Seriola lalandi* (MH211123); 13: *Seriola dumerili* (AB517558); 14: *Seriola lalandi* (AB517557); 15: *Seriola lalandi* (LC597109); 16: *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 17: *Seriola rivoliana* (KP347126); 18: *Seriolina nigrofasciata* (KT591876); 19: *Trachurus trachurus* (AB108498); 20: *Decapterus macrostoma* (KF841444)

表 8 基于 *ND2* 的遗传距离分析
Tab.8 Genetic distance analysis based on *ND2*

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0																			
2	0.058	0																		
3	0.057	0.057	0.003																	
4	0.165	0.165	0.160	0.161																
5	0.165	0.165	0.160	0.161	0															
6	0.057	0.057	0.003	0	0.161	0.161														
7	0.057	0.057	0.003	0	0.161	0.161	0													
8	0.098	0.098	0.094	0.093	0.170	0.170	0.093	0.093												
9	0.098	0.098	0.094	0.093	0.171	0.171	0.093	0.093	0.002											
10	0.255	0.255	0.256	0.256	0.285	0.285	0.256	0.256	0.261	0.264										
11	0.244	0.244	0.237	0.236	0.252	0.252	0.236	0.236	0.242	0.242	0.175									
12	0.056	0.056	0.002	0.001	0.160	0.160	0.001	0.001	0.091	0.091	0.254	0.237								
13	0.161	0.161	0.159	0.160	0.003	0.003	0.160	0.160	0.165	0.167	0.285	0.249	0.159							
14	0.057	0.057	0.003	0	0.161	0.161	0	0	0.093	0.093	0.256	0.236	0.001	0.160						
15	0.002	0.002	0.056	0.055	0.167	0.167	0.055	0.055	0.095	0.095	0.258	0.244	0.053	0.163	0.055					
16	0.098	0.098	0.094	0.093	0.173	0.173	0.093	0.093	0.002	0.002	0.264	0.245	0.091	0.168	0.093	0.095				
17	0.147	0.147	0.133	0.135	0.101	0.101	0.135	0.135	0.148	0.149	0.279	0.256	0.133	0.098	0.135	0.149	0.148			
18	0.283	0.283	0.286	0.286	0.284	0.284	0.286	0.286	0.257	0.260	0.170	0.166	0.284	0.281	0.286	0.286	0.260	0.279		
19	0.140	0.140	0.119	0.116	0.115	0.115	0.116	0.116	0.151	0.153	0.251	0.229	0.116	0.111	0.116	0.143	0.154	0.131	0.263	

注: 1~2: 澳大利亚黄条鲷; 3~4: 中国黄条鲷; 5~6: 中国高体鲷; 7~8: 日本黄条鲷; 9~10: 中国五条鲷; 11: 长身圆鲷(KF841444); 12: 乌鲷(KJ192332); 13: 中国黄条鲷(MH211123); 14: 日本高体鲷(AB517558); 15: 日本黄条鲷(AB517557); 16: 澳大利亚黄条鲷(LC597109); 17: 日本五条鲷(AB517556); 18: 长鳍鲷(KP347126); 19: 竹荚鱼(AB108498); 20: 小甘鲷(KT591876)

Note: 1 and 2: *Seriola lalandi* from Australia; 3 and 4: *Seriola lalandi*; 5 and 6: *Seriola dumerili* from China; 7 and 8: *Seriola lalandi* from Japan; 9 and 10: *Seriola quinqueradiata* from China; 11: *Decapterus macrosoma* (KF841444); 12: *Parastromateus niger* (KJ192332); 13: *Seriola lalandi* (MH211123); 14: *Seriola dumerili* (AB517558); 15: *Seriola lalandi* (AB517557); 16: *Seriola lalandi* (LC597109); 17: *Seriola quinqueradiata* (AB517556); 18: *Seriola rivoltiana* (KP347126); 19: *Trachurus trachurus* (AB108498); 20: *Seriolina nigrofasciata* (KT591876)

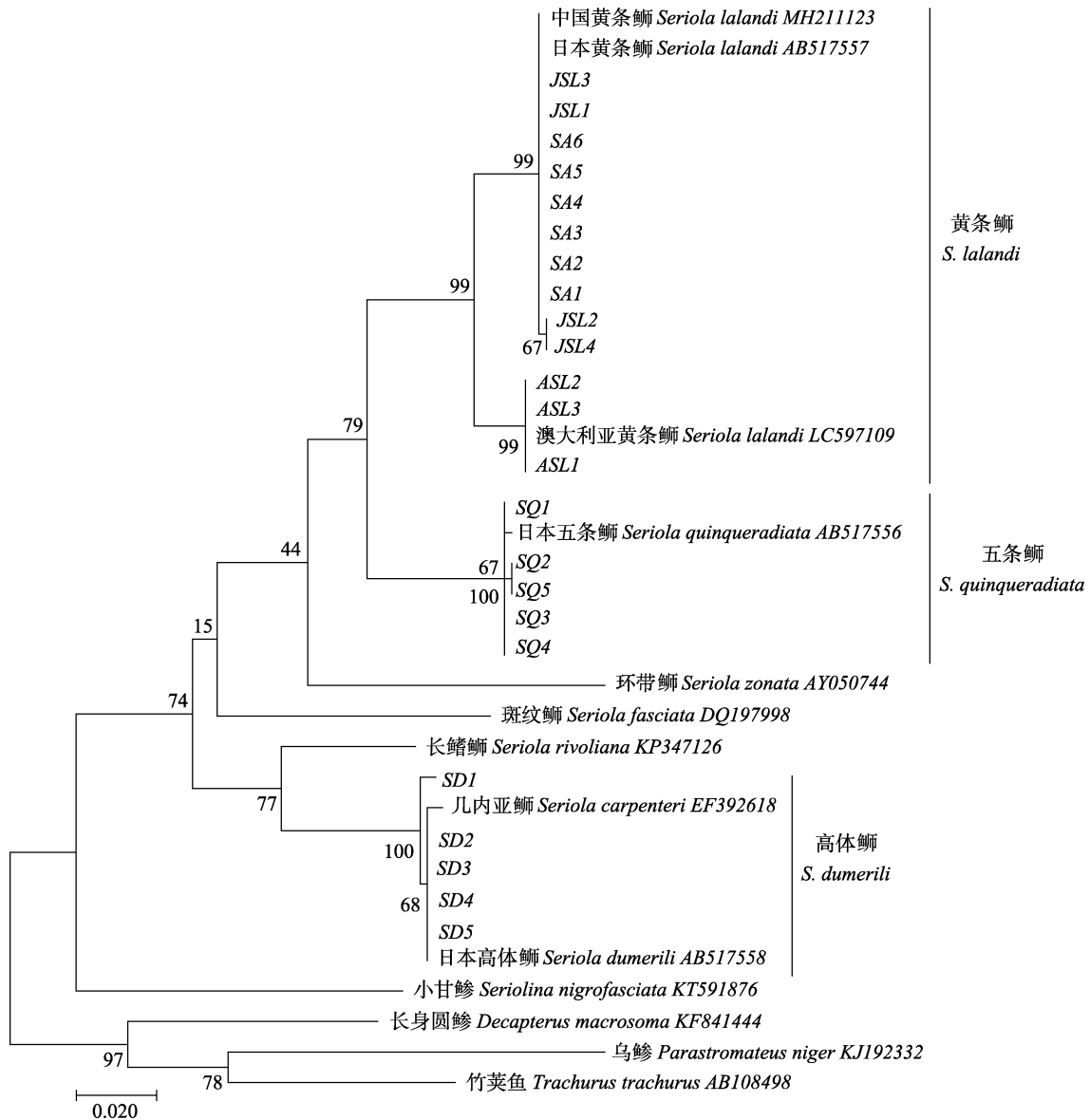


图 1 基于 *Cyt b* 基因构建的 ML 系统进化树(枝上数字为置信度值)

Fig.1 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *Cyt b* gene (The number on branch is confidence value)

SL: 中国黄条鲷; JSL: 日本黄条鲷; ASL: 澳大利亚黄条鲷; SQ: 中国五条鲷; SD: 中国高体鲷
 SL: *Seriola lalandi* from China; JSL: *Seriola lalandi* from Japan; ASL: *Seriola lalandi* from Australia;
 SQ: *Seriola quinqueradiata* from China; SD: *Seriola dumerili* from China

3 讨论

DNA 分子本身含有丰富的多态性信息, 受外界环境和其他因素的影响较小, 能够准确和稳定地反映物种间的遗传关系, 加之线粒体 DNA 自身所具有的优点, 在进行鱼类群体遗传研究中常被作为一种非常重要的分子标记(乔慧莹, 2014)。线粒体 DNA 序列的进化变异主要包括碱基的转换、倒置和易位等, 可在任意时期进行检测, 不需要考虑表达的影响因素, 检测方法简单、高效(Sanger *et al*, 2003)。线粒体基因组

不同编码基因的进化速率是不同的, 各基因所表现出来的遗传信息量也不同(赵凯, 2006)。本研究共分析了 *Cyt b*、*ND1* 与 *ND2* 三个线粒体基因在鲷属鱼类物种以及不同地理种群黄条鲷鉴别方面的应用, 结果表明, 其对 3 种鲷属鱼类的物种判别方面具有较好的适用性。研究发现, *Cyt b* 基因核苷酸序列的变异率较高, 分布广泛、序列易测定, 系统发育信息展现的辨识度高, 是探讨物种亲缘关系、遗传分化的良好标记(Irwin *et al*, 1991)。在本研究中, 基于 *Cyt b* 基因分析, 3 种鲷属鱼类的平均碱基含量为 T 27.7%、C 32.2%、

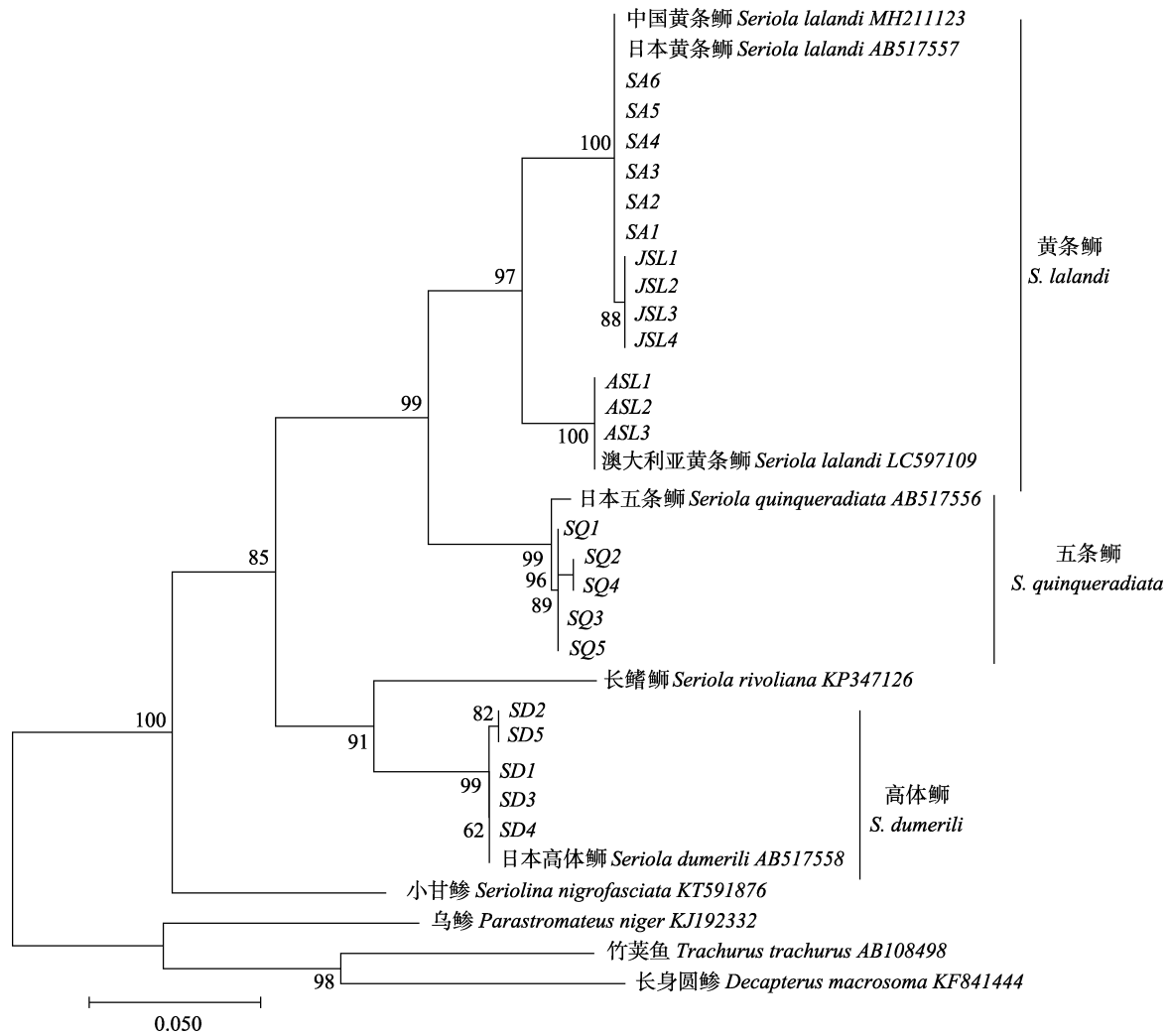


图 2 基于 *ND1* 基因构建的 ML 系统进化树(枝上数字为置信度值)

Fig.2 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *ND1* gene (The number on branch is confidence value)

SL: 中国黄条鲷; JSL: 日本黄条鲷; ASL: 澳大利亚黄条鲷; SQ: 中国五条鲷; SD: 中国高体鲷
 SL: *Seriola lalandi* from China; JSL: *Seriola lalandi* from Japan; ASL: *Seriola lalandi* from Australia;
 SQ: *Seriola quinquerradiata* from China; SD: *Seriola dumerili* from China

A 23.2%、G 16.9%，其中，A+T 为 50.9%，表现出明显的偏倚性。*Cyt b* 序列中的转换频率高于颠换，转换与颠换比值 R 平均为 4.63，普遍认为 $R > 2.0$ 时，表明基因序列的突变未达到饱和(郑文娟等, 2008)。另外，本研究发现，基于 *Cyt b* 分析的鲷属鱼类种间遗传距离和进化树分析结果一致，除几内亚鲷与高体鲷遗传距离较小而进化树中不能独立分支外，其他鲷属鱼类的种间遗传距离显著大于种内遗传距离，单系性得到很好的支持，因此，需要结合其他 DNA 条形码进行多码验证，以便提高技术应用的准确性和可靠性。

ND1 和 *ND2* 基因进化速率较快，能较好地反映出种内与群体间的遗传变化差异及系统分类地位，已被广泛用于节肢动物、鱼类、爬行类、鸟类和哺乳类

等系统发育和种群划分(Cecilia, 1994; Yu *et al*, 2000)。在本研究中，*ND1* 和 *ND2* 基因中碱基 A+T 的平均含量分别为 49.5%和 49.8%，低于 GC 含量。单倍型多样性指数(H_d)和核苷酸多样性指数(P_i)作为衡量物种遗传多样性丰富度的重要指标，物种丰富度越高，在环境中的耐受性越强(陆键萍等, 2020)。本研究发现，鲷属鱼类中 *ND2* 基因($H_d=0.900$, $P_i=0.082$)的遗传多样性高于 *ND1* ($H_d=0.874$, $P_i=0.077$)和 *Cyt b* ($H_d=0.814$, $P_i=0.061$)，这可能与 *ND2* 基因本身具有较高的突变速率有关(郑德育等, 2019)。本研究发现 *ND1* 和 *ND2* 基因序列均可作为鲷属鱼类物种鉴定的有效 DNA 条形码。

近年来，生物地理学成为鱼类分子群体遗传学的研究热点之一，在检测地理隔离对鱼类群体遗传结构

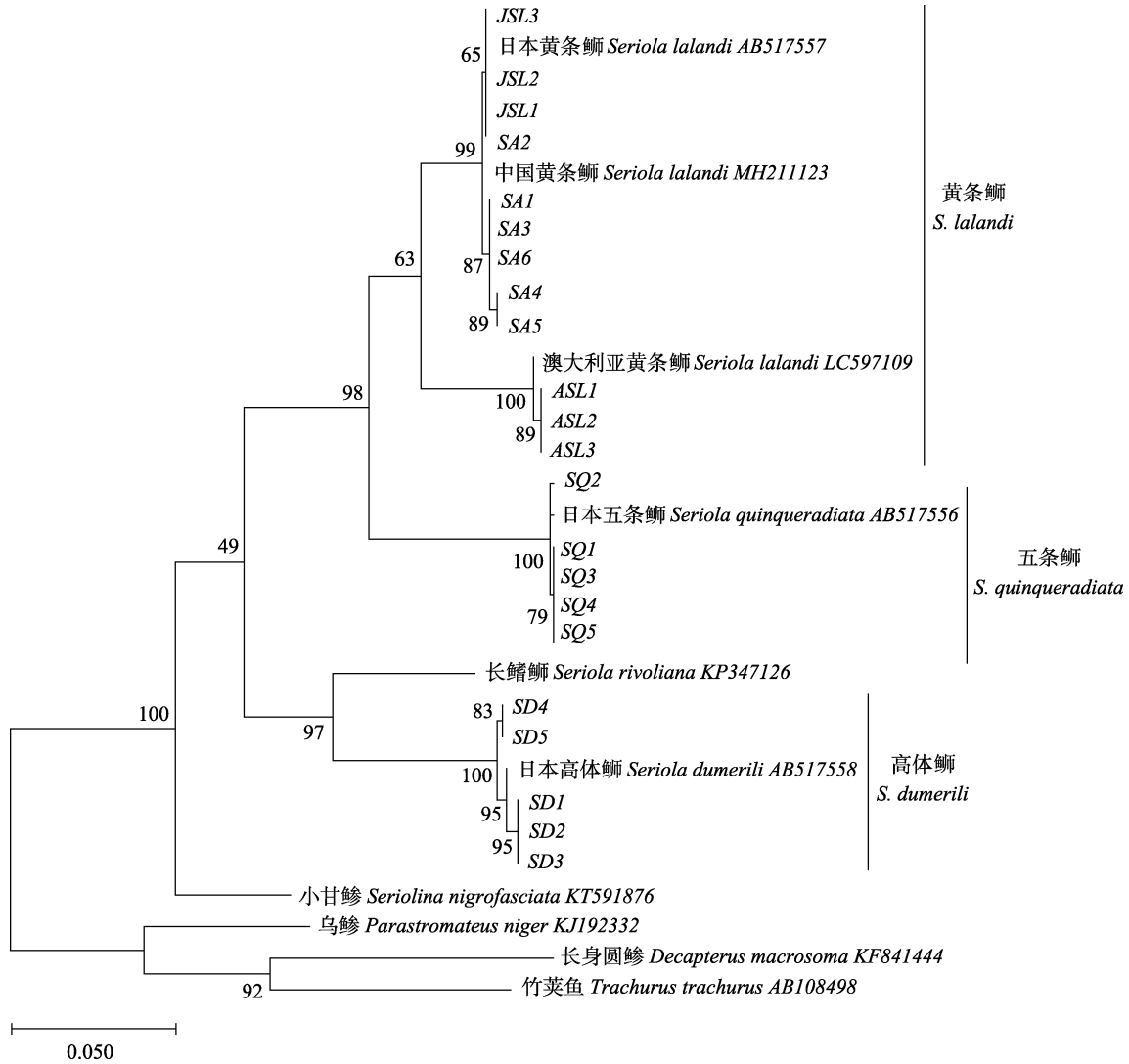


图 3 基于 *ND2* 基因构建的 ML 系统进化树(枝上数字为置信度值)

Fig.3 Maximum-likelihood Phylogenetic tree based on *ND2* gene (The number on branch is confidence value)

SL: 中国黄条鲷; JSL: 日本黄条鲷; ASL: 澳大利亚黄条鲷; SQ: 中国五条鲷; SD: 中国高体鲷
 SL: *Seriola lalandi* from China; JSL: *Seriola lalandi* from Japan; ASL: *Seriola lalandi* from Australia;
 SQ: *Seriola quinqueradiata* from China; SD: *Seriola dumerili* from China

的影响的研究中, 线粒体 DNA 是比较理想的分子标记(祁得林等, 2008)。Iguchi 等(2012)基于 PCR-RFLP 技术对日本 4 种鲷属鱼类和澳大利亚鲷属鱼类的种群进行鉴定, 结果表明, 通过设计 *Cyt b* 基因特异引物能有效区分日本和澳大利亚鲷属鱼类属于不同的种群。Premachandra 等(2017)利用基因组测序、线粒体 DNA、微卫星标记分析等方法研究发现, 太平洋海域的黄条鲷分为 3 个明显地理隔离的群体, 分别是东北、西北和南太平洋群体, 且群体间基本不存在基因交流。本研究发现, *Cyt b*、*ND1* 和 *ND2* 基因能有效辨识中国与澳大利亚黄条鲷, 但不能区分中国和日本黄条鲷, 这与崔爱君(2020)采用 SNP 分子标记、

基因组分析的不同水域黄条鲷种群遗传划分的结果一致, 进一步支持了中国与日本黄条鲷可能属于同一群体, 而与澳大利亚黄条鲷种群存在显著的地理隔离。

综上所述, 本研究发现, *ND1* 和 *ND2* 基因序列均可作为鲷属鱼类物种鉴定的有效 DNA 条形码, 而 *Cyt b* 对鲷属鱼类中序列同源性较高的鱼种辨识能力不足。另外, 3 种基因均可作为不同地理群体黄条鲷的鉴别 DNA 条形码。在 DNA 条形码应用于物种鉴定或隐藏种分析时, 综合采用多种 DNA 条形码技术来监测鲷属鱼类的遗传多样性水平, 以便实现其种质资源合理保护和可持续利用。

参 考 文 献

- BARRETT R D H, HEBERT P D N. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 2005, 83(3): 481–491
- BI X X, GAO T X, XIAO Y S, *et al.* Sequence comparison of mtDNA 16S rRNA, *CO I* and *Cyt b* gene fragments in four species of Gadidae fish. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(3): 46–52 [毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳕鱼线粒体 16S rRNA、*CO I* 和 *Cyt b* 基因片段序列的比较研究. 南方水产, 2009, 5(3): 46–52]
- BOWEN B R, KREISER B R, MICKLE P F, *et al.* Phylogenetic relationships among North American *Alosa* species (Clupeidae). *Journal of Fish Biology*, 2008, 72(5): 1188–1201
- CECILIA S. The evolution of mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1994, 4(6): 875–881
- CHEN S H, OU Y J, LI J E. Mitochondrial DNA and its progresses in fish. *Biotechnology Bulletin*, 2011(3): 13–20 [陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展. 生物技术通报, 2011(3): 13–20]
- CLAYTON D A. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International Review of Cytology*, 1992, 141: 217–232
- CUI A J. Study on population genetics of yellowtail kingfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020, 5–6 [崔爱君. 黄条鲷种群遗传特性研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2020, 5–6]
- GAO Z Y. Genetic diversity of wild populations of *Channa argus* in China. Master's Thesis of Jinan University, 2013, 20–36 [高志远. 中国野生乌鳢(*Channa argus*)遗传多样性分析. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2013, 20–36]
- HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMPLAK T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312
- IGUCHI J, TAKASHIMA Y, NAMIKOSHI A. Species identification method for marine products of *Seriola* and related specie. *Fisheries Science*, 2012, 78(1): 197–206
- IRWIN D M, KOCHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, 32(2): 128–144
- LIANG R S, LIANG Z G, FANG H H, *et al.* Molecular phylogenetic relationships of 16 sweetlips fishes based on the sequence of NADH dehydrogenase subunit 1. *Haiyang Xuebao*, 2014, 36(10): 25–32 [梁日深, 梁志刚, 方浩航, 等. 基于 *ND1* 基因序列的 16 种胡椒鲷鱼类分子系统进化关系研究. 海洋学报, 2014, 36(10): 25–32]
- LIU X Z, XU Y J, LI R, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional composition of the muscle of yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(1): 128–135 [柳学周, 徐永江, 李荣, 等. 黄条鲷 (*Seriola aureovittata*) 肌肉营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 128–135]
- LU J P, YAO L, XIN H M, *et al.* Applicability analysis of mitochondrial *CO I*, *Cyt b* and 16S rRNA genes in identification of six tuna species. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 73–81 [陆键萍, 姚琳, 信红梅, 等. 线粒体 *CO I*、*Cyt b* 和 16S rRNA 基因在 6 种金枪鱼鉴定中的适用性分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 73–81]
- NWANI C D, BECKER S, BRAID H E, *et al.* DNA barcoding discriminates freshwater fishes from southeastern Nigeria and provides river system-level phylogeographic resolution within some species. *Mitochondrial DNA: Journal of DNA Mapping, Sequencing and Analysis*, 2011, 22(S1): 43–51
- PREMACHANDRA H K A, TAKEUCHI Y, ADAM M, *et al.* Genomic DNA variation confirmed *Seriola lalandi* comprises three different populations in the Pacific, but with recent divergence. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 314–325
- QI D L, CHAO Y, GUO S C, *et al.* Genetic structure of five Huanghe schizothoracin *Schizopygopsis pylzovi* populations based on mtDNA control region sequences. *Journal of Zoology*, 2008, 54(6): 972–980 [祁得林, 晁燕, 郭松长, 等. 黄河裸裂尻鱼五种群 mtDNA 控制区的遗传结构. 动物学报, 2008, 54(6): 972–980]
- QIAO H Y. Phylogeny of Schizothoracinae fishes and genetic structure of *Pampus argenteus* population based on mitochondrial DNA sequences. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014: 16–17 [乔慧莹. 基于线粒体基因序列分析裂腹鱼亚科的系统进化关系及中国沿海银鲷群体的遗传结构. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014: 16–17]
- SANGER O I, CARMONA J A, DOADRIO I. Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(1): 20–30
- SEPULVEDA F A, GONZALEZ M T. DNA barcoding evidence for the first recorded transmission of *Neobenedenia* sp. from wild fish species to *Seriola lalandi* cultured in an open recirculating system on the coast of Northern Chile. *Aquaculture*, 2019, 501: 239–246
- SERB J M, BUHAY J E, LYDEARD C. Molecular systematics of the North American freshwater bivalve genus *Quadrula* (Unionidae: Ambleminae) based on mitochondrial *ND1* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 28(1): 1–11
- TAKEYAMA H, CHOW S, TSUZUKI H, *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(6): 1646–1657
- WANG M, LIU H, HUANG H, *et al.* Identifying fish products in Shenzhen through DNA barcoding. *Food Science*, 2015, 36(20): 247–251 [王敏, 刘荭, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用. 食品科学, 2015, 36(20): 247–251]
- WILSON A C, CANN R L, CARR S M, *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biology*

- Journal of Society, 2010, 26(4): 375–400
- YU N, ZHENG C L, ZHANG Y P, *et al.* Molecular systematics of pikas (genus *Ochotona*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 16(1): 85–95
- YUAN J, ZHANG Q Z, LUO F. Mitochondrial DNA and its application to the molecular population genetics of fish. *Ecological Science*, 2008, 27(4): 272–276 [袁娟, 张其中, 罗芬. 鱼类线粒体 DNA 及其在分子群体遗传研究中的应用. *生态科学*, 2008, 27(4): 272–276]
- ZHAO K. Mitochondrial DNA (mtDNA) of fish and application in molecular phylogenetic. *Journal of Qinghai University (Natural Science)*, 2006, 24(2): 49–53 [赵凯. 鱼类线粒体 DNA(mtDNA)及其在分子系统学中的应用. *青海大学学报(自然科学版)*, 2006, 24(2): 49–53]
- ZHENG D Y, GUO Y J, YANG T Y, *et al.* Genetic diversity analysis of *Sillago japonica* based on mitochondrial DNA *ND2* gene. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(5): 84–91 [郑德育, 郭易佳, 杨天燕, 等. 基于线粒体 *ND2* 基因序列的少鳞鳊遗传多样性研究. *南方水产科学*, 2019, 15(5): 84–91]
- ZHENG W J, ZHU S H, ZHOU J X, *et al.* Molecular phylogenetic relationship of Carangidae based on partial sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(6): 847–854 [郑文娟, 朱世华, 邹记兴, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨 12 种鲹科鱼类的分子系统进化关系. *水产学报*, 2008, 32(6): 847–854]

(编辑 冯小花)

Application of DNA Barcoding Based on *Cyt b*, *ND1* and *ND2* in *Seriola* Species Identification

WANG Kaijie^{1,2}, XU Yongjiang^{2①}, CUI Aijun², JIANG Yan², WANG Bin²,
LIU Xuezhou², FANG Lu², XUE Zhiyong³, MAO Chengquan³

(1. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Haiyang Yellow Sea Fishery Company, Yantai, Shandong 265122, China)

Abstract *Seriola* is a genus of Carangidae in Perciforms; they are long-distance migratory oceanic species with global distribution and inhabit temperate and subtropical marine waters worldwide. There are nine species in Genus *Seriola*. Three species, including *S. lalandi*, *S. dumerili*, and *S. quinqueradiata*, are found in China's coastal waters. *Seriola* fish is large, fast-growing, and highly favored by the international consumption market due to its excellent taste, nutritional quality, and economic value; furthermore, they are promising for open ocean aquaculture. In 2017, a significant breakthrough was achieved in seedlings production of *S. lalandi* by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences in China, and the scaled juveniles' production technology was established in 2019. In 2020, another breakthrough was achieved in seedlings production of *S. quinqueradiata* in China. Since 2017, the farming industry of *Seriola* fish in China has entered the fast development era. Nowadays, the *Seriola* species are farmed in Liaoning, Fujian, Shandong provinces of China, *etc.*, and the annual farming yield was about 20 thousands of tons in China since 2018.

These three *Seriola* species, natively distributed in China, have similar exterior morphology and are hard to differentiate with naked eye and traditional differentiation methods, especially in case of the juveniles. In addition, an allotype phenomenon exists in *Seriola* fish in global oceanic waters. Therefore, it is necessary to establish a simple and efficient molecular species identification method to facilitate the species and population determination of *Seriola* fishes in international oceanic waters. Moreover, it also

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

could be beneficial for discrimination, conservation, and sustainable utilization of natural fishery resources in international public waters.

Many scientists have studied the germplasm and population genetic characteristics of *S. lalandi*, *S. dumerili*, and *S. quinqueradiata* from international waters using nuclear genes and mitochondrial markers. Still, there is no information on the genetic background of *Seriola* fishes in China. DNA barcodes are widely applied to species identification, systematic analysis, and population genetics of fish because of their sensitivity, accuracy, and reliability, especially for *CO I*, cytochrome oxidase b (*Cyt b*) genes, etc. Furthermore, when DNA barcodes are applied to species identification or hidden species analysis, the combination of several DNA barcodes could be more high-efficient and accurate. Thus, in the present study, to explore the applicability of *Cyt b* and NADH dehydrogenase subunit 1 and 2 (*ND1* and *ND2*) to species identification and evolutionary analysis of three *Seriola* species, including *S. lalandi*, *S. dumerili*, and *S. quinqueradiata* were investigated and determined. The finclips samples were collected from three native distributed *Seriola* species. *S. lalandi* samples were also collected from Australian and Japanese populations. Genomic DNA was extracted from finclips, specific primers for *Cyt b*, *ND1*, and *ND2* genes were designed. The PCR reaction system of the three genes totalled 50 μL each, including rTaq enzyme 25 μL , template 2 μL , upstream and downstream primer 1 μL each, and ddH₂O 21 μL . The results showed that the target fragments of three genes could be amplified from the genomes of three *Seriola* species, and 68 gene sequences were obtained. The sizes of *Cyt b*, *ND1*, and *ND2* fragments were 538 bp, 673 bp, and 907 bp in length, respectively, which were consistent with the predicted results, wherein *Cyt b* gene sequence showed obvious A+T bias characteristics. The mutation rate of the *ND2* gene was 20.52%. The genetic diversity of *ND2* gene ($H_d = 0.900$, $P_i = 0.082$) was higher than that of *ND1* ($H_d = 0.874$, $P_i = 0.077$) and *Cyt b* ($H_d = 0.814$, $P_i = 0.061$). The results indicated that *Cyt b*, *ND1*, and *ND2* could be used to identify the three *Seriola* species natively distributed in the China oceans. In *Seriola* species, the interspecific genetic distances of the three genes were more than ten times the intraspecific genetic distances.

Furthermore, the evolutionary tree based on *Cyt b*, *ND1*, and *ND2* shows that Chinese and Japanese *S. lalandi* are clustered into independent branches, effectively distinguishing Chinese, Japanese, and Australian *S. lalandi* populations. In addition, *S. lalandi* and *S. quinqueradiata* were clustered together, while *S. dumerili* and *S. rivoliiana* were clustered together, showing similar genetic relationships with each other. Based on the *Cytochrome b* gene, *S. carpenteri* and *S. dumerili* showed high sequence homology, were clustered on the same node, and could not be effectively distinguished. It can be seen that except for *Cyt b*, the maximum-likelihood tree constructed based on *ND1* and *ND2* genes has accurate identification ability for different fish species from the *Seriola* genus.

In summary, *Cyt b*, *ND1*, and *ND2* could be used as DNA barcodes for species identification and geographical differentiation of *Seriola* fishes. A variety of DNA barcodes could be combined to achieve more precise identification results. These DNA barcodes could also be applied to evaluate and conserve the genetic diversity of farmed *Seriola* species, which could be beneficial for sustainable utilization of the germplasm resources of *Seriola* species.

Key words *Seriola* species; DNA barcode; Species identification; Phylogenetic analysis