

陈信忠,郭书林,龚艳清. DNA 条形码技术在主要观赏鱼物种鉴定中的应用分析[J]. 渔业研究,2017,39(1):8-14.

# DNA 条形码技术在主要观赏鱼物种鉴定中的应用分析

陈信忠, 郭书林, 龚艳清

(厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361026)

**摘要:** 通过检索 BOLD SYSTEMS 数据库和 GenBank 中锦鲤、金鱼、慈鲷、神仙鱼、七彩神仙鱼、血鹦鹉、花罗汉、龙鱼、孔雀鱼、鼠鱼、魮鱼等主要观赏鱼的 DNA 条形码和基因序列, 应用 MEGA 软件计算种间遗传距离, 在 BOLD SYSTEMS 数据库中检索相似序列, 以分析 DNA 条形码在主要观赏鱼物种鉴定中的应用效果。结果表明该技术可以有效鉴别大多数种以上阶元的观赏鱼类, 但对亲缘关系较近、种类繁多的多种慈鲷、孔雀鱼等观赏鱼物种难以获得准确的鉴定结果, 对金龙、红龙等亚洲龙鱼的亚种以及人工繁育的不同品系的锦鲤、金鱼、神仙鱼、七彩神仙鱼、血鹦鹉、花罗汉等鱼类, 无法通过 COI 基因条形码进行鉴别, 需要研究其他分子生物学方法。

**关键词:** 观赏鱼; DNA 条形码; 物种鉴定; 应用

**中图分类号:** S917.4, Q179 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5601(2017)01-0008-07

近年来我国观赏鱼产业和国际贸易快速发展。全球已知具有商业化价值的观赏鱼类约有 2 000 余种。虽然约 80% 的观赏鱼来自人工繁育, 但绝大多数观赏鱼的原产地来自非洲、南美洲以及东南亚部分国家和地区<sup>[1]</sup>。由于观赏鱼种类繁多, 欣赏价值和经济价值相差巨大, 因此对观赏鱼物种的准确鉴定, 成为观赏鱼国际贸易中迫切需要解决的问题。传统的形态学鉴别方法主要依据鱼类的形态、体色和斑纹等特征, 由于很多鱼类的形态特征容易受年龄、环境和养殖条件等因素的影响, 尤其许多鱼类的卵和幼体很难进行形态学鉴别。因此, 迫切需要开发更加准确的物种鉴别方法。基于 DNA 序列进行物种鉴定的 DNA 条形码技术为观赏鱼物种的准确鉴定提供了全新的方法。全球鱼类生命条形码计划 (Fish Barcode of Life Initiative, FISH-BOL) 于 2004

年开始实施, 并建立了生命条形码数据系统 (Barcode of Life Data Systems, BOLD SYSTEMS)。该系统采用经过权威的分类鉴定的标本, 以电子数据库形式构建含有 DNA 条形码、图像和地理坐标的全球鱼类参考标准数据库, 重点解决传统形态学方法无法鉴别的难题。DNA 条形码技术可以有效识别鱼类, 对大部分物种具有良好的鉴别结果, 还可以测试现有分类系统的有效性, 纠正一些同物异名, 或者发现一些潜在的物种<sup>[2-7]</sup>。但由于观赏鱼的特殊性, 该技术在鉴别很多亲缘关系相近的观赏鱼物种时存在很多局限性。我国是观赏鱼主要生产国和出口国, 但我国的绝大多数观赏鱼物种原产地均来自国外, 每年需要引进大量的观赏鱼物种进行人工繁育和种质资源改良。我国的鱼类 DNA 条形码研究相对较少, 在观赏鱼方面的研究更少。因此, 通过分析

收稿日期: 2016-11-29

基金项目: 福建省科技厅农业引导性项目 (2015N0015)。

作者简介: 陈信忠 (1964-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为海洋生物学。Tel: 13328766299. E-mail: chenxz@xmciq.gov.cn

DNA 条形码对主要观赏鱼物种鉴别的应用，可以了解该技术的优势和存在的不足，更好地应用于观赏鱼种类的鉴别。

## 1 材料和方法

检索 BOLD SYSTEMS 数据库和 GenBank 中锦鲤、金鱼、慈鲷、神仙鱼、七彩神仙鱼、血鹦鹉、花罗汉、龙鱼、孔雀鱼、鼠鱼、魮鱼等主要观赏鱼的 COI 基因条形码序列，应用 MEGA 软件<sup>[8]</sup>选择 Kimura - 2 参数模型制作系统发育树，计算种内或种间遗传距离。应用 GenBank 中的核酸 BLAST 程序进行序列比对，并在 BOLD SYSTEMS 数据库中搜索相似序列。依据 DNA 条形码的物种鉴定原则，判定 DNA 条形码在观赏鱼物种鉴别中的应用价值。

## 2 结果

### 2.1 BOLD SYSTEMS 数据库中主要观赏鱼物

### 种的 DNA 条形码

观赏鱼种类繁多，在分类上分属于鲈形目等近 20 目，其中鲤形目、鲈形目、脂鲤目和鲶形目种类最多。BOLD SYSTEMS 是全球 DNA 条形码的应用数据库，支持所有生命条形码数据的产生和应用。经过多年的努力，目前该系统已收集基因序列 6 049 996 条，DNA 条形码 5 246 662 条。其中动物基因条形码 482 250 条，涵盖 174 627 种物种<sup>[9]</sup>。至今在 GenBank 和 BOLD SYSTEMS 中已收录的与观赏鱼相关的 COI 基因条形码数量见表 1，涵盖了目前国际上常见的观赏鱼种类，其中也包含了大量的非观赏鱼类物种。涵盖近 10 000 种物种，但有基因条形码的物种数量只有 9 000 余种，因有些物种为未定种，还有一些样品没有 COI 基因序列，或不符合基因条形码的要求。不过，鲤形目、鲈形目、脂鲤目和鲶形目等数量较多的观赏鱼还有很多种类没有基因条形码或相关的基因序列。

| 表 1 已收录的观赏鱼类标本和基因条形码数量                                                      |                        |                                     |                                                |                                                  |                       |                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------|
| Tab. 1 Number of specimens and species with barcodes of the ornamental fish |                        |                                     |                                                |                                                  |                       |                                             |
|                                                                             | 物种<br>Species          | 有记录的<br>标本数量<br>Specimen<br>records | 有序列的<br>标本数量<br>Specimens<br>with<br>sequences | 有基因条形<br>码的标本数量<br>Specimens<br>with<br>barcodes | 涵盖物<br>种数量<br>Species | 有基因条形码<br>的物种数量<br>Species<br>with barcodes |
| 1                                                                           | 燕魮目 Myliobatiformes    | 3 977                               | 2 867                                          | 1 949                                            | 268                   | 195                                         |
| 2                                                                           | 多鳍鱼目 Polypteriformes   | 135                                 | 132                                            | 131                                              | 16                    | 13                                          |
| 3                                                                           | 鲟形目 Acipenseriformes   | 641                                 | 564                                            | 542                                              | 28                    | 27                                          |
| 4                                                                           | 骨舌鱼目 Osteoglossiformes | 1 023                               | 898                                            | 890                                              | 127                   | 125                                         |
| 5                                                                           | 鳗鲡目 Anguilliformes     | 4 587                               | 3 597                                          | 3 566                                            | 498                   | 453                                         |
| 6                                                                           | 鲤形目 Cypriniformes      | 29 679                              | 25 054                                         | 24 330                                           | 2 281                 | 2 158                                       |
| 7                                                                           | 脂鲤目 Characiformes      | 16 923                              | 13 080                                         | 12 928                                           | 1 205                 | 1 045                                       |
| 8                                                                           | 鲶形目 Siluriformes       | 17 139                              | 14 602                                         | 14 335                                           | 1 737                 | 1 588                                       |
| 9                                                                           | 裸背鱼目 Gymnotiformes     | 1 400                               | 1 048                                          | 1 011                                            | 141                   | 113                                         |
| 10                                                                          | 蟾鱼目 Batrachoidiformes  | 210                                 | 167                                            | 167                                              | 34                    | 30                                          |
| 11                                                                          | 银汉鱼目 Atheriniformes    | 2 121                               | 1 557                                          | 1 506                                            | 207                   | 190                                         |
| 12                                                                          | 鹤鲂目 Beloniformes       | 1 940                               | 1 599                                          | 1 590                                            | 133                   | 119                                         |
| 13                                                                          | 鲳形目 Cyprinodontiformes | 4 222                               | 3 550                                          | 3 088                                            | 483                   | 372                                         |
| 14                                                                          | 合鳃目 Synbranchiformes   | 936                                 | 778                                            | 759                                              | 74                    | 73                                          |
| 15                                                                          | 鲈形目 Perciformes        | 34 337                              | 28 129                                         | 27 514                                           | 1 928                 | 1 829                                       |
| 16                                                                          | 鲉形目 Pleuronectiformes  | 5 590                               | 4 753                                          | 4 548                                            | 474                   | 446                                         |
| 17                                                                          | 鲉形目 Tetraodontiformes  | 4 740                               | 4 216                                          | 4 189                                            | 353                   | 343                                         |

## 2.2 DNA 条形码鉴别慈鲷类观赏鱼

慈鲷是热带和亚热带地区最常见的观赏鱼类,是品种和数量最多的淡水观赏鱼,主要来自非洲维多利亚湖、坦噶尼喀湖和马拉维湖,以及南美洲亚马逊河流域和西印度群岛。仅非洲大陆已发现的慈鲷科鱼种就超过 700 种。加上许多慈鲷之间可以在人工养殖条件下进行杂交,产生出许多人工改良的品种,使慈鲷种类不断增加。慈鲷大多属于鲈形目慈鲷科 (Cichlidae),至今 BOLD 已收录 160 属 545 种慈鲷的 5 118 条基因条形码。DNA 条形码对鉴别大部分形态差异较大的科属的慈鲷是有效的,对一些种类较多的属,也有很好的鉴别效果。新亮丽鲷属 (*Neolamprologus*) 已报告 18 个物种的 40 条基因条形码,与形态学分类基本一致。

慈鲷具有超强的适应能力与多变的色彩和斑纹,表现在形态上的多彩多姿。但由于很多慈鲷的形态变化与其特殊的生境密切相关,在基因进化上尚未形成稳定的变异,因此 DNA 条形码在鉴定很多慈鲷时遇到了困难。隐带丽鱼属 (*Apistogramma*) 的鱼类又被称为短鲷,至今已有 60 多种隐带丽鱼的记录,但只报告了 14 个物种的 79 条基因条形码。孔雀鲷属 (*Aulonocara*) 已发现 10 多种,但至今只有火尾孔雀鲷 (*Aulonocara stuartgranti*) 的基因条形码。而且,通过 BOLD SYSTEMS 检索,火尾孔雀鲷与闪电王子 (*Pseudotropheus elongatus*)、斑马雀 (*Maylandia lombardoi*)、蓝色非洲王子 (*Labidochromis chisumulae*)、金蓝王子 (*Melanochromis johannii*)、米洛柔丽鲷 (*Placidochromis milomo*)、杰弗瑞天使 (*Alticorpus geoffreyi*)、金背阿芙拉 (*Cynotilapia afra*)、马湖剑沙 (*Diplotaxodon limnothrissa*)、快乐东方鲷 (*Astatotilapia calliptera*)、黑岩非鲫 (*Petrotilapia nigra*)、颊丽鲷 (*Genyochromis mento*)、马拉维苍皮丽鱼 (*Pallidochromis tokolosh*) 等至少 14 属 26 种慈鲷的相似性大于 98%。同样的,非洲王子 (*Labidochromis caeruleus*) 与扁头恐怖丽鱼 (*Dimidiochromis compressiceps*)、金蓝斜间 (*Taeniolethrinops praeorbitalis*)、维纳斯 (*Nimbochromis venustus*)、雪花豹 (*Fosorochromis rostratus*)、蓝蒂斯天使 (*Protomelas annectens*)、帕雷克顿珍珠 (*Trematocranus plac-*

*odon*)、长鳍柔丽鲷 (*P. longimanus*)、彩虹天使 (*Cheilochromis euchilus*)、蓝茉莉 (*Cyrtocara moorii*) 以及埃及艳后 (*Protomelas taeniolatus*) 等 11 属 12 种慈鲷的 COI 基因同源性大于 99.54%。显然,应用 COI 基因难以有效鉴别这些慈鲷。

## 2.3 DNA 条形码鉴别神仙鱼

神仙鱼又称天使鱼,因其独特的造型、色彩和习性成为淡水观赏鱼最常见的种类。至今已发现横纹神仙鱼 (*Pterophyllum altum*)、大神仙鱼 (*P. scalare*) 和黑神仙鱼 (*P. leopordi*) 等 3 种,但只有横纹神仙鱼和大神仙鱼的 18 条基因条形码,尚无黑神仙鱼的 DNA 条形码。通过 COI 基因可以有效区别上述 3 种神仙鱼,但现在观赏鱼市场上的神仙鱼基本上都是人工杂交品种,经过几十年的人工改良,已经繁育了几十个品系的神仙鱼,这些神仙鱼的 COI 基因遗传距离均小于 1%,因此难以作为 DNA 条形码进行鉴别。

## 2.4 DNA 条形码鉴别七彩神仙鱼

七彩神仙鱼因其色彩艳丽、花色繁多而有热带鱼王的美誉。属鲈形目,丽鱼科 (Cichlidae),盘丽鱼属 (*Symphysodon*),野生七彩神仙鱼有黑格尔 (*Symphysodon discus*)、黄棕盘丽鱼 (*S. aequifasciatus*) 和棕七彩 (*S. haraldi*) 等 3 种。通过 COI 序列可以区分 3 种七彩神仙鱼,但棕七彩与黄棕盘丽鱼的遗传距离非常小,有很多学者认为棕七彩尚未形成独立的种。现在观赏鱼市场上有大量人工繁育的品种,主要有蓝七彩、红七彩、棕七彩、黄七彩等多个品系。这些品种的 COI 基因序列高度相似,遗传距离均小于 1%,都未达到物种水平。

## 2.5 DNA 条形码鉴别血鹦鹉和花罗汉

血鹦鹉 (Blood parrot cichlid) 和花罗汉都不是自然进化的物种,而是由来自南美洲的一些中大型慈鲷通过人工杂交得到的新鱼种。血鹦鹉和花罗汉可爱、活泼、逗趣,外型令人喜爱,成为热带鱼的主流。由于其亲本的多样性,血鹦鹉和花罗汉也表现出很大的多样性和不确定性。

与血鹦鹉相关的丽体鱼属 (*Cichlasoma*) 已报告 14 个物种的 111 条基因条形码。大部分血鹦鹉为紫红火口 (*Paraneotroplus synspilus*) ♀ ×

橘色双冠丽鱼 (*Amphilophus citrinellus*) ♂, 其 COI 序列与紫红火口、胭脂火口 (*Vieja maculicauda*)、黑带鲷 (*Paraneetroplus maculicauda*)、金孔雀 (*Vieja melanura*) 以及红头丽体鱼 (*Vieja synspila*) 的同源性大于 99%。因此, 难以进行 DNA 条形码的鉴别。

花罗汉的亲本关系比血鹦鹉更加复杂, 因此也有更多的不确定性。目前有关花罗汉的基因序列很少见, 也没有基因条形码的数据。因此, 无法应用基因条形码对花罗汉进行分类。

## 2.6 DNA 条形码鉴别锦鲤

锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 是风靡世界的高档观赏鱼类, 因其鲜艳似锦的色彩, 变幻多姿的斑纹而得名。锦鲤由野生鲤鱼演变而来。经过数百年的培育, 已经培育出 13 大类共 120 多个品种<sup>[1]</sup>。至今已有大量锦鲤 COI 序列的数据, 但这些序列的种间遗传距离均小于 1%, 而且与赤棕鲤 (*C. rubrofasciatus*)、粗首马口鱮 (*Opsariichthys pachycephalus*)、乌鲤 (*Procypris mero*)、蓝黑鲮 (*Labeo calbasu*) 以及一些杂交鲤鱼的遗传距离均小于 2%。显然, 这些种类无法依据 DNA 条形码进行区分。

## 2.7 DNA 条形码鉴别金鱼

金鱼 (*Carassius auratus*) 是最早的观赏鱼类, 也是中国特有的观赏鱼。金鱼易于饲养, 姿态奇异, 色彩绚丽, 形态优美, 深受世界各国人民的喜爱。在分类上属鲤形目, 鲤科 (*Cyprinidae*), 鲫属 (*Carassius*)。经过长时间培育, 品种不断优化。金鱼的演变体现了人类改良动物所得到的神奇效果。根据金鱼的主要变异特征可以将金鱼分为金鲫、文鱼、琉金、狮头、绒球、珍珠鳞、龙睛、蝶尾、丹凤、虎头、水泡和望天等 12 个系列。虽然品系繁多, 形态差异很大, 但所有报告的金鱼 COI 基因种间遗传距离均小于 1%, 而且与银鲫 (*C. gibelio*)、兰氏鲫 (*C. langsdorfii*) 等物种的相似性大于 98.92%。因此, 难以通过 COI 基因条形码进行鉴别。

## 2.8 DNA 条形码鉴别灯鱼

灯鱼是具有“小型”和“发光”特点的观赏鱼类的总称, 其体型娇小, 色彩丰富, 性情温顺, 喜欢成群结队, 是数量最多的热带观赏鱼。在分类上主要包括脂鲤目和鲤形目的一些鱼类。

大部分灯鱼属于脂鲤目, 脂鲤科 (*Characidae*), 已报告 517 个物种的 7 847 条基因条形码, 其中魮脂鲤属 (*Hyphessobrycon*) 已报告 58 个物种的 1 292 条基因条形码; 半线脂鲤属 (*Hemigrammus*) 已报告 28 个物种的 328 条基因条形码。鲤形目的无须魮属 (*Puntius*)、波鱼属 (*Rasbora*)、鲃属 (*Danio*) 和魮属 (*Barbus*) 分别报告了 60、43、24、22 个物种的 578、371、200、444 条基因条形码。

通过 BOLD 检索发现, 大部分灯鱼通过 DNA 条形码可以进行有效鉴别。但也有一些种类的 COI 序列相同或相似。红旗 (*Hyphessobrycon eques*) 和黑幻旗 (*H. megalopterus*) 的 DNA 条形码完全相同; 小鳍魮脂鲤 (*Hyphessobrycon micropterus*) 与 *H. santae* 相同; 日光灯 (*Paracheirodon axelrodi*) 与红莲灯 (*P. innesi*) 完全相同; 刚果灯鱼 (*Phenacogrammus interruptus*) 与黄金二线刚果灯 (*P. aurantiacus*)、条纹断线脂鲤 (*P. taeniatus*) 和巴勃小鲑脂鲤 (*Micrastes cf. pabrensis*) 的同源性在 99.39% 以上。因此, 这些灯鱼无法通过 DNA 条形码进行区别。

## 2.9 DNA 条形码鉴别龙鱼

龙鱼是原产于东南亚的一种高价值观赏鱼, 其体型雍容扁长, 躯干部覆盖着排列整齐、光芒闪烁的硕大鳞片, 嘴阔须长, 游动时气势沉稳威严, 是最昂贵的观赏鱼。龙鱼属于骨舌鱼目, 骨舌鱼科 (*Osteoglossidae*), 已报告 7 个物种的 138 条基因条形码, 包括最常见的亚洲龙鱼 (*Scleropages formosus*)、珍珠龙 (*S. jardinii*) 和银龙 (*Osteoglossum bicirrhosum*) 等各种龙鱼。这些龙鱼的 COI 基因遗传距离大于 2%, 因此可以通过 DNA 条形码进行有效区分。但亚洲龙鱼包括青龙、红龙和金龙等形态差异较大的品系, 其中红龙品系又可分为辣椒红龙、血红龙和橙红龙 3 个品种, 金龙品系也可分为红尾金龙和过背金龙 2 个品种, 通过测定这些不同品系的龙鱼的 COI、Cyt B 基因序列, 可知这些品系间的遗传距离均小于 1% (另文报告), 因此, 难以通过 DNA 条形码进行有效鉴别。

## 2.10 DNA 条形码鉴别孔雀鱼

孔雀鱼又被称为彩虹鱼, 有着非常漂亮的尾巴, 体小玲珑, 体色斑斓多彩, 活泼好动, 经过

无数代的人工改良和繁殖,已有几百个品系,成为热带鱼中最为人们喜爱的观赏鱼之一。孔雀鱼属于鲤齿目,花鳍科(Poeciliidae),花鳍属(*Poecilia*)。根据国际比赛中的规定,大致可分为草尾、马赛克、礼服、单色、蛇纹、剑尾、白子、特殊尾型等几大类。虽然种类繁多,形态差异很大,但很多孔雀鱼的COI序列差异很小。如秀美花鳍(*Poecilia formosa*)与墨西哥帆鳍(*P. mexicana*)、茉莉花鳍(*P. latipinna*)、吉氏花鳍(*P. gillii*)、萨尔瓦多花鳍(*P. salvatoris*)、奥氏花鳍(*P. orri*)、黑花鳍(*P. sphenops*)、特里萨花鳍(*P. teresae*)的相似性均大于98%。其他一些人工繁育的孔雀鱼品种的遗传距离更小。因此,DNA条形码在鉴定孔雀鱼时也有很多局限性。

## 2.11 DNA条形码鉴别缸鱼

缸鱼又称魔鬼鱼,大部分为海水缸鱼。近年来淡水缸鱼因其具有圆盘、长尾等迥异于一般鱼类的特殊外形,以及以形如翅膀状的胸鳍通过波浪状的摆动方式来游动,如同在水中飞翔一样美丽的身姿,得到观赏鱼爱好者的喜爱。目前最流行的江缸科(Potamotrygonidae)已报告12个物种的106条基因条形码。这些缸鱼可以通过DNA条形码进行有效区分。除了野生种类,通过人工杂交得到的缸鱼新品种越来越多,包括珍珠缸、黑白缸、金点缸、豹缸、黑白满天星缸、黑帝王缸、帝王缸等。目前针对这些人工繁育的缸鱼,很少有基因鉴别的报告。

## 2.12 DNA条形码鉴别鼠鱼

鼠鱼嘴巴旁边长着两撮可爱的小胡须,酷似水中游动的小老鼠,因而被称为“鼠鱼”。鼠鱼属于鲶形目,美甲鲶科(Callichthyidae)的兵鲶属(*Corydoras*)、盾皮鲶属(*Aspidoras*)和弓背鲶属(*Brochis*),至今已记录150余种。在BOLD SYSTEMS,美甲鲶科已收录115个物种的1108条基因条形码,其中兵鲶属(*Corydoras*)已收录90个物种的819条基因条形码。目前大多数鼠鱼来自野生自然环境,人工繁殖种类较少。因此,DNA条形码可以鉴别大部分鼠鱼。检索结果表明,荧光绿鼠(*Corydoras aeneus*)、阿卡西鼠(*C. agassizii*)、顽皮豹(*C. ambiaucus*)、短兵鲶(*C. brevirostris*)、康帝斯鼠(*C.*

*condiscipulus*)、戴维鼠鱼(*C. davidsandsi*)、黑金红头鼠鱼(*C. duplicareus*)、绅士鼠(*C. elegans*)、皇冠黑珍珠鼠(*C. haraldschultzi*)、茉莉豹鼠(*C. julii*)、侧兵鲶(*C. latus*)、黑点兵鼠(*C. melanistius*)、蓝鼠(*C. nattereri*)、暗鳍兵鲶(*C. orphnopterus*)、白棘豹鼠(*C. pulcher*)、红黑带鼠(*C. rabauti*)、大花网鼠(*C. reticulatus*)、飞凤鼠(*C. robineae*)、长吻红翅帝王鼠(*C. seussi*)、一间鼠(*C. virginiae*)等22种兵鲶的遗传距离大于3%,均可以有效区分。由于还有很多鼠鱼没有基因条形码的数据,因此该技术鉴定其他鼠鱼的效果还有待进一步研究。

## 3 讨论

目前大多数观赏鱼主要依据形态学进行分类。由于鱼类的体色、斑纹等形态特征很容易受其生长环境的影响,因此不同地区、不同水域生活的同一种鱼类可能表现出形态上的巨大差异,而被命名为不同的物种,但这些鱼类的基因序列并没有发生足够大的分化,其中有一些种类可以在自然条件下进行杂交并繁育后代,也表明这些鱼类尚未进化为独立的物种。Mohd-Shamsudin等<sup>[10]</sup>研究表明龙鱼的体色变化与COI或Cyt B基因分化程度没有关系,无法根据这两个基因来确定龙鱼的品种。Mu等<sup>[11]</sup>发现三个品种的亚洲龙鱼的12S rRNA、16S rRNA和COX3基因序列发生了显著的遗传分化,但因为遗传距离较小,这些分子标记不适用于品种之间的鉴别。Decru等<sup>[12]</sup>对206种通过形态学识别的物种的COI序列进行比较,发现有26.1%的物种间遗传距离小于1,表明依据形态学分类可能存在错误。Dirk Steinke等<sup>[13]</sup>鉴定了391种观赏鱼,超过98%的种类可以依据COI序列进行有效区分。但背纹双锯鱼(*Amphiprion akallopisos*)等3种小丑鱼、多带蝴蝶鱼(*Chaetodon multicinctus*)等2种蝴蝶鱼以及黄高鳍刺尾鱼(*Zebrasoma flavescens*)等2种高鳍刺尾鱼的序列高度相似,遗传距离小于0.3%。因此,虽然目前的观赏鱼种类很多,但可能存在分类过细、同物异名的现象。由于DNA条形码技术主要依据COI基因序列,因此有相当一部分观赏鱼难以用DNA条形

码进行准确鉴定。针对这些近缘物种,需要研究进化更快的基因作为 DNA 条形码,或建立其他的分子生物学方法。Overdyk 等<sup>[14]</sup>建立了实时 PCR 方法,可以特异性识别鲱形白鲑 (*Coregonus clupeaformis*) 的幼体,并可在现场应用。

随着人类对观赏鱼新、奇、特的不断追求和生物改良技术的持续进步,出现了越来越多人工改良的观赏鱼品系或物种。实际上由于野生观赏鱼数量有限,目前绝大多数观赏鱼都来自人工繁育。虽然这些观赏鱼色彩斑斓、千姿百态,其欣赏价值甚至超过野生品种,但由于其形态特征尚未形成稳定的遗传特性,表现在基因序列的分化很小,或者很不稳定。基因条形码技术要求物种间 COI 基因的遗传距离大于 2% 才能准确定种。显然大多数人工繁育的观赏鱼品系之间的遗传分化很难达到该水平,因此目前的基因条形码不能适用于这些观赏鱼的鉴别。

经过十多年的发展, BOLD SYSTEMS 已经收录了大部分鱼类的基因条形码,但由于完整的 DNA 条形码需要提供地理分布等信息,而大部分野生观赏鱼均来自非洲、南美洲等经济落后地区,有很多观赏鱼尚无 DNA 条形码数据,因而影响了条形码的分辨率。此外,研究表明,只有生态学家、分类学家、分子生物学家和地球科学家等科学团队的技术和研究的结合,才能从空间、时间和形式等方面解决鱼类物种演化的复杂性<sup>[15]</sup>。因此,基因技术还应该与传统的形态学分类方法相结合,才能对观赏鱼种类进行综合鉴定。

## 参考文献:

- [ 1 ] 赵增连, 陈华忠, 陈信忠主编. 观赏鱼鉴赏与检疫指南 [M]. 北京: 中国质检出版社, 2014: 3 - 16.
- [ 2 ] Breman F C, Loix S, Jordaens K, et al. Testing the potential of DNA barcoding in vertebrate radiations: the case of the littoral cichlids (Pisces, Perciformes, Cichlidae) from Lake Tanganyika [J]. Mol Ecol Resour, 2016, 16: n/a. doi: 10.1111/1755 - 0998.12523.
- [ 3 ] Castro Paz F P, Batista J S, Porto J I. DNA barcodes of Rosy Tetras and allied species (Characiformes: Characidae: Hyphessobrycon) from the Brazilian Amazon basin [J]. PLoS One, 2014, 9 (5): e98603.
- [ 4 ] Kullander S O, Karlsson M, Karlsson M, et al. *Chalinochromis cyanophleps*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from Lake Tanganyika [J]. Zootaxa, 2014, 3790: 425 - 438.
- [ 5 ] Benzaquem D C, Oliveira C, Batista Jda S, et al. DNA barcoding in pencil fishes (Lebiasinidae: *Nannostomus*) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon [J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e0112217.
- [ 6 ] Barreto S B, Nunes L A, da Silva A T, et al. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? [J]. Genome, 2015, 58 (5): 191 - 192.
- [ 7 ] Pugedo M L, de Andrade Neto F R, Pessali T C, et al. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin [J]. Genetica, 2016, 144 (3): 341 - 349.
- [ 8 ] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17 (12): 1244 - 1245.
- [ 9 ] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: The Barcode of Life Data System [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7 (3): 355 - 364.
- [ 10 ] Mohd - Shamsudin M I, Fard M Z, Mather P B, et al. Molecular characterization of relatedness among colour variants of Asian Arowana (*Scleropages formosus*) [J]. Gene, 2011, 490 (1 - 2): 47 - 53.
- [ 11 ] Mu Xi - dong, Song Hong - mei, Wang Xue - jie, et al. Genetic variability of the Asian arowana, *Scleropages formosus*, based on mitochondrial DNA genes [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 44: 141 - 148.
- [ 12 ] Decru E, Moelants T, De Gelas K, et al. Taxonomic challenges in freshwater fishes: a mismatch between morphology and DNA barcoding in fish of the north - eastern part of the Congo basin [J]. Mol Ecol Resour, 2016, 16 (1): 342 - 352.
- [ 13 ] Dirk Steinke, Zemplak T S, Hebert P D. et al. Barcoding nemo: DNA - based identifications for the ornamental fish trade [J]. PLoS One, 2009, 4 (7): e6300.
- [ 14 ] Overdyk L M, Braid H E, Naaum A M, et al. Real - time PCR identification of lake whitefish *Coregonus*

clupeaformis in the Laurentian Great Lakes [J]. J Fish Biol, 2016, 88 (4): 1460 – 1474.

trends in African freshwater systematic ichthyology [J]. J Fish Biol, 2011, 79 (6): 1413 – 1435.

[15] Skelton P H, Swartz E R. Walking the tightrope;

## Application analysis of DNA barcoding technology in the identification of main ornamental fish species

CHEN Xinzhong, GUO Shulin, GONG Yanqing

(Xiamen Entry – Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China)

**Abstract:** In recent years, the international trade in ornamental fishes has grown rapidly. The traditional identification methods based mainly on fish morphology, color and pattern characteristics was difficult to identify fish species because these characteristics were easily affected by age, environment, culture conditions and other factors in many fishes, especially the eggs and larvae that had the similar morphological characteristics and the large number of species involved. DNA barcoding, the analysis of sequence diversity in a standardized gene region, has gained considerable validation as a tool for species identification and discovery. In this report, the DNA barcoding and gene sequence of koi, goldfish, cichlids, angelfish, discus, blood parrot cichlid, flower horn, dragon fish, bellyfish, ratfish, stingray fish and other ornamental fishes had been retrieved in GenBank and BOLD SYSTEMS database. The interspecific genetic distance had been calculated by using MEGA software and the similar sequences had been searched in BOLD SYSTEMS to study the application of DNA barcode to identify the main ornamental fish species. The results showed that this technology could effectively identify the most ornamental fish species, but it was difficult to obtain accurate identification on a wide variety of cichlid and guppies which had closer genetic relationship. The golden arowana, red arowana which belong to the subspecies of Asian arowana, and the artificial breeding fishes such as different strains of koi, goldfish, fairy fish, discus, blood parrot and flower horn also could not be identified through the COI barcoding. It is necessarily to study other molecular methods.

**Key words:** ornamental fishes; DNA barcoding; species identification; application.