

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15460

## 山东近海习见鱼类 DNA 条形码及其电子芯片分析

柳淑芳<sup>1,2</sup>, 李献儒<sup>1,4</sup>, 杜腾飞<sup>1,5</sup>, 庄志猛<sup>1,3</sup>

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266200;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266200;
4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;
5. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 从 GenBank 下载到 13 目 50 科 73 属 77 种山东近海鱼类的线粒体细胞色素 c 氧化酶 I(COI)序列, 通过分析其遗传距离及系统进化, 并基于 COI 序列筛选物种特异性探针来分析 DNA 芯片技术在进行物种鉴定时的可行性。结果表明, 在 COI 基因 DNA 条形码的分析中, 77 种鱼类的种间遗传距离(平均 0.117)明显大于种内遗传距离(平均 0.0034), 且每个物种的不同个体在进化树上都能聚在一起, 提示 DNA 条形码能全部区分 77 个物种; 根据 COI 基因设计的用于芯片的特异性探针中, 77 个物种最终有 64 个可以筛选出物种特异性探针, 占总物种数的 83.1%, 本研究旨在为山东近海鱼类物种鉴定提供了技术支持。

关键词: 山东近海; COI; DNA 条形码; DNA 芯片

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0777-14

海洋生物多样性是人类开发利用海洋生物资源的物质基础, 也是生态系统健康的重要指标之一<sup>[1]</sup>, 认识和保护海洋生物多样性、合理有效地利用自然资源、保障生态安全已成为世界沿海各国紧迫而艰巨任务。然而, 海洋鱼类种类繁多, 不同的生长阶段其形态特征的差异给海洋鱼类的鉴定及分类带来了许多困难。近年来, 随着分子生物学的发展, 基于 DNA 序列的鉴定方法已成为物种鉴定的一种重要手段<sup>[2]</sup>。其中, DNA 条形码以及在此基础上发展起来的 DNA 条形码芯片技术更在物种鉴定上广泛应用<sup>[3-4]</sup>。Hebert 等<sup>[5]</sup>通过 DNA 条形码技术对 260 种北美鸟类进行了条形码分析, 发现种间差异约为种内差异的 18 倍, 并成功将鸟类鉴定到种。Ward 等<sup>[6]</sup>利用条形码技术分析了澳大利亚 207 种海洋鱼类, 发现所有鱼类都

能被成功区分。Kochzius 等<sup>[7]</sup>利用 16S rRNA 成功制作出能区分 11 种海洋经济鱼类的芯片。中国已经有不少研究人员开展了 DNA 条形码的物种鉴别研究和应用<sup>[8]</sup>, 但 DNA 条形码芯片工作较少, 而将该技术应用于某些海域或某些地区的研究尚无相关报道。山东省是中国渔业大省, 海岸线长 3345 km, 占全国的 1/6, 近海海域面积 15.9 万 km<sup>2</sup>。山东近海优越的渔业资源栖息环境, 是黄、渤海渔业资源的主要繁衍育肥场所, 为中国以及日本、韩国、朝鲜等周边国家提供了丰富的海洋生物资源<sup>[9]</sup>。《山东省鱼类志》<sup>[10]</sup>记录山东海水鱼类 257 种, 但根据最新的研究<sup>[11-13]</sup>, 删除同种异名的种类以及极偶然情况下才出现的种类, 整理得山东近海鱼类 225 种, 隶属于 2 纲 28 目 91 科 169 属<sup>[14]</sup>。但是, 1998 年海上调查显示, 山东近

收稿日期: 2015-12-09; 修订日期: 2016-02-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172411); 山东省科技发展计划项目(2012GHY11531); 泰山学者建设工程专项经费项目.

作者简介: 柳淑芳(1967-), 研究员, 从事渔业生物分子生态学研究. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

通信作者: 庄志猛, 研究员, 从事海洋生物学研究. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

海鱼类有 2 纲 11 目 41 科 58 属 62 种<sup>[8]</sup>; 2006 年调查结果为 1 纲 13 目 41 科 71 属 78 种; 2009 年调查结果为 1 纲 9 目 32 科 55 属 62 种<sup>[14]</sup>。1998–2009 年的调查鱼类种数远远低于山东近海鱼类名录记录的种数, 可见山东近海的渔业资源呈现衰竭趋势, 鱼类种数大幅下降已成为不争的事实。为有效保护和利用渔业资源, 迫切需要对山东近海的鱼类进行准确分类鉴定。因此, 本研究拟根据山东近海鱼类种类分布情况, 筛选出物种特异性探针形成电子芯片, 从而建立 DNA 条形码电子芯片鉴别技术, 为研发鱼类 DNA 条形码芯片奠定基础, 达到对山东近海鱼类物种快速、准确分类鉴定的目的, 以期为山东近海渔业资源养护和可持续开发利用提供基础资料和技术支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

通过参考《山东近海渔业资源开发与保护》<sup>[15]</sup>及《黄渤海渔业资源综合研究与评价》<sup>[16]</sup>统计出山东近海常见经济渔业生物物种, 根据往年出海样品记录略作补充, 最后确定用于分析的鱼类共 13 目 50 科 73 属 77 种。从 GenBank 下载对应物种的 COI 基因序列, 每个物种尽量选取两个不同的地理种群。每条序列都要经 BOLD 数据库验证, 确保序列的准确性, 与其代表物种相似度大于 98% 的序列才能用。查阅《中国海洋生物名录》<sup>[11]</sup>以确保分类的正确性, 通过 FishBase 验证种名的有效性, 通过筛选最后用于分析的序列总计 269 条, 物种及序列信息见表 1。

表 1 本研究 77 种鱼类 COI 基本信息  
Tab. 1 Information of COI genes of 77 species

物种名 species	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	尾数 quantity	GenBank 序列号 GenBank accession No.
斑点沙璠鱼	<i>Sardinops melanosticta</i>	鲱形目鲱科沙璠鱼属	3	JF952841-3
青鳞小沙丁鱼	<i>Sardinella zunasi</i>	鲱形目鲱科小沙丁鱼属	2	JF952838-9
斑鲹	<i>Konosirus punctatus</i>	鲱形目鲱科斑鲹属	5	JF952768-9, JQ738562-4
鳊	<i>Ilisha elongata</i>	鲱形目锯腹鳊科鳊属	3	HM030777-9
鳀	<i>Engraulis japonicus</i>	鲱形目鳀科鳀属	3	HM007796-8
长颌棱鳀	<i>Thryssa setirostris</i>	鲱形目鳀科棱鳀属	3	EF607597-9
刀鲚	<i>Coilia nasus</i>	鲱形目鳀科鲚属	5	HM180537-8, JN394481-3
花鲈	<i>Lateolabrax japonicus</i>	鲈形目真鲈科花鲈属	4	HM180644-6, JF952774
细条天竺鲷	<i>Apogon lineatus</i>	鲈形目天竺鲷科天竺鲷属	5	JF952673-5, JQ738611-2
多鳞鱧	<i>Sillago sihama</i>	鲈形目鱧科鱧属	4	GU804915, KF489761-3
竹荚鱼	<i>Trachurus japonicus</i>	鲈形目鲈科竹荚鱼属	5	JF952879-80, JQ738603-5
沟鲈	<i>Atropus atropus</i>	鲈形目鲈科沟鲈属	5	EF609504-6, JX261352, JX261357
蓝圆鲈	<i>Decapterus maruadsi</i>	鲈形目鲈科圆鲈属	2	JX261196-7
黄条鲈	<i>Seriola lalandi</i>	鲈形目鲈科鲈属	5	JF494499-500, HM007727-9
棘头梅童鱼	<i>Collichthys lucidus</i>	鲈形目石首鱼科梅童鱼属	4	HM180540-3
小黄鱼	<i>Larimichthys polyactis</i>	鲈形目石首鱼科黄鱼属	3	HM068246-8
叫姑鱼	<i>Johnius belengerii</i>	鲈形目石首鱼科叫姑鱼属	3	EF607410-2
黄姑鱼	<i>Nibea albiflora</i>	鲈形目石首鱼科黄姑鱼属	5	AB547241-3, JN242531-2
白姑鱼	<i>Pennahia argentatus</i>	鲈形目石首鱼科白姑鱼属	2	JF952681-2
真鲷	<i>Pagrus major</i>	鲈形目鲷科赤鲷属	5	JF952801-2, FJ237868-70
黑鲷	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	鲈形目鲷科棘鲷属	5	HQ846830-2, JQ738446-7
条石鲷	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	鲈形目石鲷科石鲷属	4	GU207335-7, EU266373
繸鲷	<i>Chirolophis japonicus</i>	鲈形目繸鲷科繸鲷属	4	HM180507-9, GU357852

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

物种名 species	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	尾数 quantity	GenBank 序列号 GenBank accession No.
云鳚	<i>Pholis nebulosa</i>	鲈形目锦鳚科云鳚属	4	HM180565-7, KC748109
方氏云鳚	<i>Pholis fangi</i>	鲈形目锦鳚科云鳚属	5	HM180783-5, JQ738493-4
长绵鳚	<i>Zoarces elongatus</i>	鲈形目绵鳚科绵鳚属	3	JQ738580-2
玉筋鱼	<i>Ammodytes personatus</i>	鲈形目玉筋鱼科玉筋鱼属	3	JQ738552-3, HQ711864
长丝虾虎鱼	<i>Myersina filifer</i>	鲈形目虾虎鱼科丝虾虎鱼属	2	JF952711, JQ738449
矛尾虾虎鱼	<i>Chaeturichthys stigmatias</i>	鲈形目虾虎鱼科矛尾虾虎鱼属	5	HQ711866, JQ343909, JQ738525-7
孔虾虎鱼	<i>Trypauchen vagina</i>	鲈形目虾虎鱼科孔虾虎鱼属	1	JX193742
带鱼	<i>Trichiurus lepturus</i>	鲈形目带鱼科带鱼属	5	JQ365607-9, JX124922-3
鲈	<i>Scomber japonicus</i>	鲈形目鲭科鲈属	5	JQ354331-3, KC501331-2
蓝点马鲛	<i>Scomberomorus niphonius</i>	鲈形目鲭科马鲛属	5	HM068276-8, JQ738520-1
扁舵鲹	<i>Auxis thazard</i>	鲈形目鲭科舵鲹属	5	KC500290-2, HQ149803-4
银鲱	<i>Pampus argenteus</i>	鲈形目鲱科鲱属	3	HM068262-4
油鲚	<i>Sphyræna pinguis</i>	鲈形目鲚科鲚属	2	JF952862-3
红狼牙虾虎鱼	<i>Odontamblyopus rubicundus</i>	鲈形目螳虾虎鱼科狼牙虾虎鱼属	3	JX193743-5
短尾大眼鲷	<i>Priacanthus macracanthus</i>	鲈形目大眼鲷科大眼鲷属	2	EU595245-6
发光鲷	<i>Acropoma japonicum</i>	鲈形目发光鲷科发光鲷属	2	DQ648437, DQ790845
许氏平鲉	<i>Sebastes schlegelii</i>	鲉形目平鲉科平鲉属	3	HM180868-9, HQ711862
褐菖鲉	<i>Sebastes marmoratus</i>	鲉形目平鲉科菖鲉属	2	EU600153-4
单指虎鲉	<i>Minous monodactylus</i>	鲉形目毒鲉科虎鲉属	1	EU595221
绒杜父鱼	<i>Hemitripterus americanus</i>	鲉形目绒杜父鱼科绒杜父鱼属	3	KC015450-2
细纹狮子鱼	<i>Liparis tanakae</i>	鲉形目狮子鱼科狮子鱼属	2	JF952785, GU357851
松江鲈	<i>Trachidermus fasciatus</i>	鲉形目杜父鱼科松江鲈属	3	HQ536517-9
虻鲉	<i>Erisphex pottii</i>	鲉形目前鳍鲉科虻鲉属	3	JQ738487, JQ738531-2
绿鳍鱼	<i>Chelidonichthys kumu</i>	鲉形目鲂鲷科绿鳍鱼属	5	JQ738505-7, DQ108044-5
大泷六线鱼	<i>Hexagrammos otakii</i>	鲉形目六线鱼科六线鱼属	3	HM180624-6
鲷	<i>Platycephalus indicus</i>	鲉形目牛尾鱼科鲷属	3	HQ149900-2
半滑舌鲷	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	鲉形目舌鲷科舌鲷属	3	JN242742-4
短吻红舌鲷	<i>Cynoglossus joyneri</i>	鲉形目舌鲷科舌鲷属	4	GU479053, JQ738468, JQ738602, JQ738613
褐牙鲷	<i>Paralichthys olivaceus</i>	鲉形目牙鲷科牙鲷属	4	EU266368-9, JF952803-4
高眼鲷	<i>Cleisthenes herzensteini</i>	鲉形目鲷科高眼鲷属	3	JQ738576, JQ738597-8
角木叶鲷	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	鲉形目鲷科木叶鲷属	5	JN204307-9, JQ738558-9
钝吻黄盖鲷	<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	鲉形目鲷科拟鲷属	2	HM180652-3
尖吻黄盖鲷	<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i>	鲉形目鲷科拟鲷属	2	JF952817-8
星鲷	<i>Verasper variegatus</i>	鲉形目鲷科星鲷属	1	DQ242490
石鲷	<i>Kareius bicoloratus</i>	鲉形目鲷科石鲷属	5	JF952766-7, JQ738476-8
带纹条鲷	<i>Zebrias zebra</i>	鲉形目鲷科条鲷属	3	JQ738566-8
星康吉鳗	<i>Conger myriaster</i>	鳗鲡目康吉鳗科康吉鳗属	3	HQ711869, JQ738419, JQ738485
海鳗	<i>Muraenesox cinereus</i>	鳗鲡目海鳗科海鳗属	3	HM068290-2
前肛鳗	<i>Dysomma anguillare</i>	鳗鲡目合鳃鳗科前肛鳗属	1	KF681861
日本下鱈鱼	<i>Hyporhamphus sajori</i>	颌针鱼目鱈科下鱈鱼属	2	JF952762-3
长蛇鲻	<i>Saurida elongata</i>	仙女鱼目狗母鱼科蛇鲻属	3	JF952845-7
多齿蛇鲻	<i>Saurida tumbil</i>	仙女鱼目狗母鱼科蛇鲻属	5	HQ149925-7, EF609601-2
龙头鱼	<i>Harpadon nehereus</i>	仙女鱼目龙头鱼科龙头鱼属	5	JN242637-9, EF607398-9

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

物种名 species	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	尾数 quantity	GenBank 序列号 GenBank accession No.
鳞烟管鱼	<i>Fistularia petimba</i>	刺鱼目烟管鱼科烟管鱼属	5	FJ211278-9, FJ211283-5
尖海龙	<i>Syngnathus acus</i>	刺鱼目海龙科海龙属	2	KJ128631, GQ502180
鲃	<i>Liza haematocheila</i>	鲷形目鲷科鲃属	5	JN242617-9, JQ060477-8
棕斑腹刺鲃	<i>Gastrophysus spadiceus</i>	鲷形目鲷科腹刺鲃属	5	EF607419, EU595161-3, HQ167726
红鳍东方鲷	<i>Takifugu rubripes</i>	鲷形目四齿鲷科东方鲷属	2	HM102315, JQ738474
六斑刺鲃	<i>Diodon holacanthus</i>	鲷形目二齿鲷科刺鲃属	5	GU225197-9, FJ583363-4
绿鳍马面鲷	<i>Thamnaconus septentrionalis</i>	鲷形目单棘鲷科马面鲷属	3	EF607583-5
黄魮	<i>Lophius litulon</i>	鲷形目魮科黄魮属	5	EU660704-6, JN813097, KF597041
多棘腔吻鲷	<i>Coelorinchus multispinulosus</i>	鲷形目鼠尾鲷科腔吻鲷属	1	DQ648448
大头鳕	<i>Gadus macrocephalus</i>	鳕形目鳕科鳕属	5	JQ354097-9, KF929903-4
孔鳕	<i>Okamejei kenojei</i>	鳕形目鳕科鳕属	5	EU310803-5, EF150858-9

## 1.2 实验方法

**1.2.1 条形码分析** 利用 Clustal X 对 269 条序列进行比对切齐, 用 Primer Premier 5 翻译切齐后的一条序列, 通过 BLAST 进行相似性分析来确定密码子位点。Clustal X 切齐结果由 MEGA6 进行进一步分析, 计算序列的序列变异、碱基组成, 基于 Kimura-2-paramater(K2P)模型计算目间、科间、属间、种间及种内的遗传距离。利用 MEGA6 采用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统进化树, 将 bootstrap 值参数设为 1000。

**1.2.2 DNA 条形码芯片探针设计和分析** 将 269 条序列建立本地 Blast 数据库, 将序列文件 seq.fasta 格式化, 形成文件 seq.fasta.nsq。由于序列数目较多, 为了增加筛选效率, 将所有物种按目划分为 3 个数据集(表 2), 每个数据集利用 OligoArray 2.1 分别筛选探针。设置参数为: 探针长度 23~27 bp(探针越短特异性越差, 探针越长, 本身形成二级结构的可能性越大, 则其灵敏性越低)、 $T_m$  值 70~82°C、GC 含量 40%~55%、 $Na^+$ 和 DNA 浓度分别为 1 mol/L 和 1  $\mu$ mol/L、形成二级结构的最大  $T_m$  值和交叉杂交最小  $T_m$  值为 65°C、两探针间距离为 25 bp、最大探针数为 10、连续出现的单一碱基数不超过 4 个(如 AAAA)。选取该物种几条序列所共有且与其他物种序列无同源性的探针作为该物种的探针。

所得探针在在线软件 OligoCalc (<http://www.>

[simgene.com/OligoCalc](http://www.simgene.com/OligoCalc))中优化, 排除易形成发夹、茎环及自身二聚体结构的不合格探针。各数据集序列利用 Clustal X 比对切齐, 整理各数据集筛选合格的探针与切齐序列于在线软件 OHM (<http://bioinfo.unice.fr/software/ohm/>)中进行虚拟杂交, 查看杂交结果。若探针能与且只能与其所代表物种的靶标序列结合, 则此探针可作为代表物种的鉴别探针; 若探针不能与其靶标序列结合, 或者与其靶标序列结合的同时还能与其他物种的非靶标序列结合, 这两种情况下的探针都不能作为物种的鉴别探针。

表 2 各数据集组成  
Tab. 2 The composition of each data set

数据集 data set	组成 composition	序列数 the number of sequences
1	鲷形目、鲷形目、鲷形目	3 目 27 种 84 条序列
2	鲈形目	1 目 32 种 120 条序列
3	鳗鲡目、颌针鱼目、仙女鱼目、 刺鱼目、鲷形目、鲷形目、 魮目、鳕形目、鳕形目	9 目 18 种 65 条序列

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 条形码分析结果

**2.1.1 CO I 基因序列特征** 利用 Clustal X 对所有 CO I 基因序列比对切齐, 保留共有序列, 长度为 649 bp, 编码 216 个氨基酸。翻译切齐后的一条序

列, 经 Blast 比对确定序列的第二个碱基为密码子第一位点。利用 MEGA6 计算所有序列的碱基组成及序列变异情况。结果表明, 269 条序列的平均碱基组成为 T: 29.0%, C: 28.6%, A: 23.5%, G: 18.9%, GC 含量(47.5%)低于 AT 含量(52.5%)。密码子第一位点 GC 含量最高(56.8%), 第二位点次之(43%), 第三位点最低(42.7%)(表 3)。在碱基变异

中, 不变位点 515 个, 占总位点数的 79.4%, 转换位点 76 个, 颠换位点 58 个, 分别占总位点数的 11.7%和 8.9%。密码子第一位点发生转换和颠换的碱基分别有 11 个和 4 个, 第二位点发生转换和颠换各 1 个, 第三位点发生的转换和颠换分别为 64 个和 53 个, 84.2%的转换和 91.4%的颠换发生在密码子第三位点(表 4)。

表 3 77 种鱼类 CO I 基因序列各碱基平均分布频率  
Tab. 3 Average nucleotide frequencies of CO I partial sequences of 77 species

碱基 base	总频率 total frequency	密码子第 1 位点 codon 1 point	密码子第 2 位点 codon 2 point	密码子第 3 位点 codon 3 point	%
T	29.0	17	42.0	28.0	
C	28.6	25.7	28.2	31.8	
A	23.5	25.9	15.1	29.4	
G	18.9	31.1	14.8	10.9	

表 4 77 种鱼类 CO I 基因序列碱基变异情况  
Tab. 4 Sequences variation of CO I gene of 77 species

密码子位点 codon site	不变位点 invariant site	转换位点( $s_i$ ) conversion site	颠换位点( $s_v$ ) transversion site	$r=s_i/s_v$
全部位点 total	515	76	58	1.31
位点 1 site 1	199	11	4	3.14
位点 2 site 2	211	1	1	0.46
位点 3 site 3	98	64	53	1.21

2.1.2 77 种鱼类的遗传距离分析 利用 MEGA6 软件, 依据 K2P 模型计算 13 目 50 科 73 属 77 个物种的遗传距离。种内遗传距离有多个物种都为 0, 最大值为大泷六线鱼的 0.029, 平均值为 0.0034。属内种间最小值为云鳎属的云鳎和方氏云鳎, 其遗传距离为 0.028, 最大值为舌鳎属的短吻红舌鳎和半滑舌鳎达到了 0.193, 平均值为 0.117。科内属间的遗传距离最小值为石鲽属与拟鲽属的 0.073, 最大值为孔虾虎鱼属和丝虾虎鱼属 0.271, 平均值为 0.180。目内科间遗传距离最小值为绒杜父鱼科与六线鱼科的 0.175, 最大值为杜父鱼科和前鳍鲉科的 0.292, 平均值为 0.241。目间的最小值为鲉形目和刺鱼目的 0.232, 最大值为鲈形目和鳎形目的 0.295, 平均值为 0.259。分类单元越高, 遗传距离越大, 其中种内距离与属内种间距离差异明显, 后者为前者的 34 倍, 属以上分类单元遗传距离差异不明显。

2.1.3 77 种鱼类的系统进化树 基于 77 个物种的 CO I 序列构建的系统进化树如图 1 所示, 同一物

表 5 各分类单元遗传距离  
Tab. 5 Genetic divergences within various taxonomic levels

比较范围 comparative scope	最大值 maximum	最小值 minimum	平均值 mean
种内 intraspecific distance	0.029	0	0.0034
属内种间 interspecific distance	0.193	0.028	0.117
科内属间 intergeneric distance	0.271	0.073	0.180
目内科间 interfamilial distance	0.292	0.175	0.241
目间 interordinal distance	0.295	0.232	0.259

种的不同序列都能聚在一起, 所有 77 个物种都能聚为一个独立分支, 且具有很高的支持度, 这些物种都能得到有效区分。同一属内的不同物种也能聚在一起, 但是同一科不同属间的聚类与传统分类存在一些分歧, 例如, 石首鱼科的叫姑鱼没有与该科的其他物种聚在一起。同一目内的不同科间聚类效果不明显, 不同的目间也没有形成平行的独立分支。

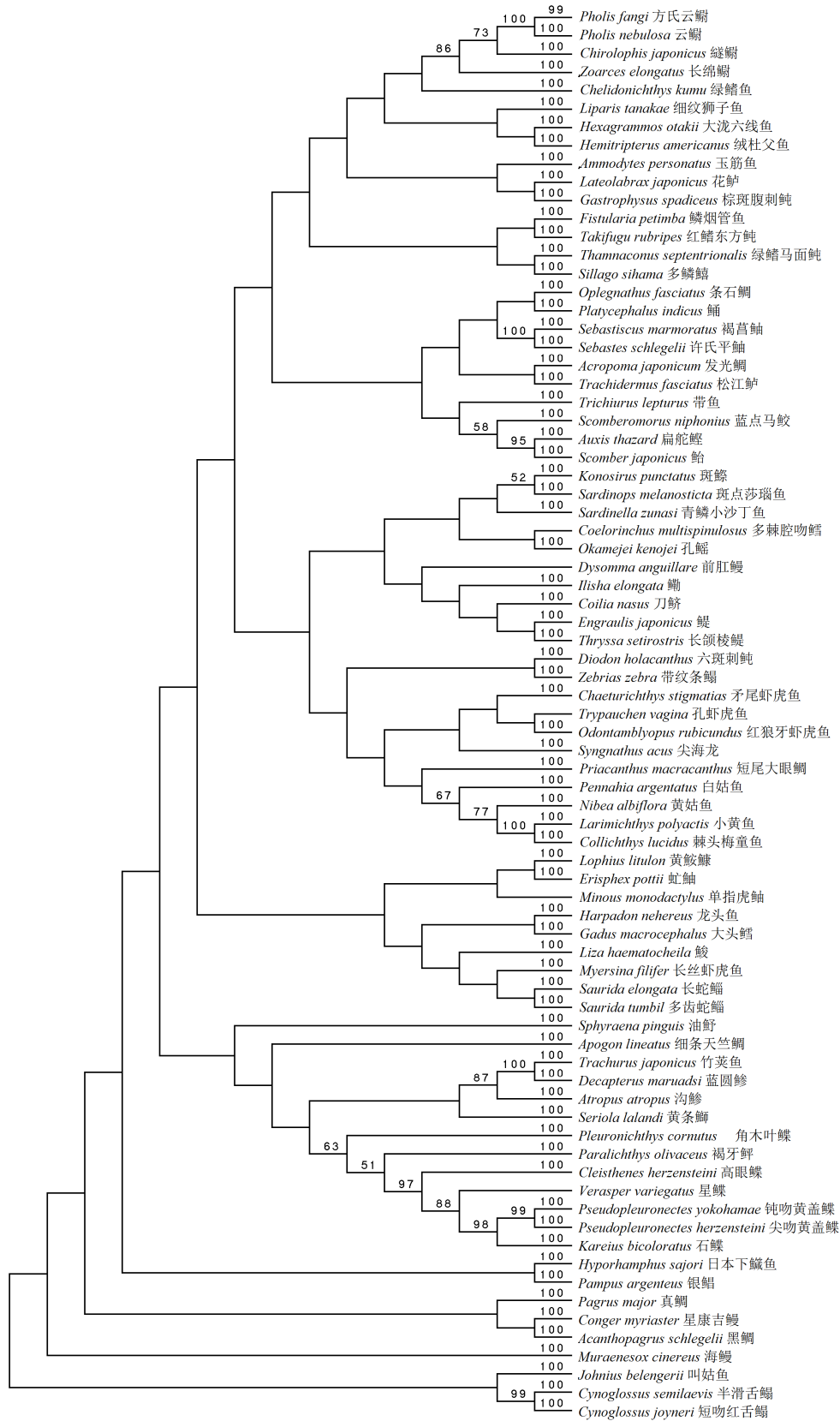


图 1 基于 CO I 基因构建的 NJ 系统进化树

Fig. 1 NJ tree resulting from analysis of CO I gene data

2.2 DNA 条形码芯片分析结果

2.2.1 数据集 1 探针信息及杂交结果 数据集 1 包括鲱形目、鲾形目和鲷形目的 27 个物种。通过 OligoArray 2.1 筛选出了 25 个物种的 80 条探针, 经 OligoCalc 优化去除 16 条不合格探针, 获得 22 个物种的 64 条探针(表 6)。将数据集 1 的 27 个物种的序列比对切齐, 探针与切齐序列在 OHM 中虚拟杂交, 杂交结果显示, 其中 TZ3 为斑点莎瑙鱼的探针, 但其在杂交过程中不仅与斑点莎瑙鱼

的序列杂交, 还与高眼鲾的序列杂交, 相同的情况还发生在 TZ2、TZ13、TZ25、TZ28、TZ33、TZ37、TZ44、TZ61 中, 这些探针不仅能与其靶标序列杂交, 还能与其他非靶标序列结合, 探针特异性不强, 因此不能作为对应物种的探针。而其他 21 个物种的 55 条探针都能与各自所代表物种的所有靶标序列杂交, 而不与任何非靶标序列杂交, 因此, 这些探针都可以作为对应物种的鉴别探针。

表 6 数据集 1 探针编号及序列  
Tab. 6 Probe ids and sequences of dataset 1

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 1	TGCTTTCGCTTCCCGTATTAGCT	
<b>TZ 2</b>	<b>AATTGACTAGTACCCCTTATGATCGG</b>	<i>Sardinops melanosticta</i>
<b>TZ 3</b>	<b>ATCTCACTATCTTCTCTCTTACC</b>	
TZ 4	AATTACCATGCTCCTGACCGACC	
TZ 5	GGCGATTAACCTTCATCACCACAA	
TZ 6	CCTCTGTTGACCTAACCATTTTC	<i>Sardinella zunasi</i>
TZ 7	GAACCGCCCTAAGTCTTCTAATCC	
TZ 8	ATCTTGCAGGTATTTTCATCGATCC	
TZ 9	TTCTGCTATCTCTCCGGTGCTGG	<i>Konosirus punctatus</i>
TZ 10	GCCGTGCTTGTCACCTGCTGTTTTA	
TZ 11	GTGCTTCTTCTACTCTCTCTCCC	
TZ 12	CGTTTGAGCTGTATTAGTCACAG	
<b>TZ 13</b>	<b>CTGGGATCTCATCAATTCTTGGG</b>	<i>Ilisha elongata</i>
TZ 14	TACCACTTATACTTGGCGCACCCAG	
TZ 15	GCTGTATTAATCACGGCAGTACT	
TZ 16	TTCTCTTATACTAGGGGCCCA	<i>Engraulis japonicus</i>
TZ 17	CTTAGCATCATCTGGTGTGAAG	
TZ 18	ACTTTTACTCCTTCTCTCCCAG	
TZ 19	CCACTCTTCGTCTGAGCTGTACTTA	
TZ 20	CTACAATCATCAACATGAAACCACC	
TZ 21	GGATCTCATCTATTCTAGGAGCAAT	<i>Thryssa setirostris</i>
TZ 22	AGATCTTACTATTTTCTCCCTCCAC	
TZ 23	TTCTTCTTTTGCTGGCCTCGTCTG	
TZ 24	CCCCTTATACTAGGAGCACCCGATA	
<b>TZ 25</b>	<b>ACTTTTACTTCTATCCCTCCCAG</b>	
TZ 26	CTTCGGTAGACCTAACAAATCTTTTC	<i>Coilia nasus</i>
TZ 27	TCTTTTAGCCTCATCTGGGGTAGAA	
<b>TZ 28</b>	<b>CTTCTCTCTTACCAGTCTCGC</b>	<i>Sebastes schlegelii</i>
TZ 29	TTCTGCTTGCCCTTCCGGTGTA	<i>Sebastiscus marmoratus</i>
TZ 30	CGTACTATTACTTCTCTCCCTCC	
TZ 31	CTCTTTTCGTCTGGTCTGTTCTT	<i>Hemirhamphus americanus</i>

(待续 to be continued)

(续表 6 Tab. 6 continued)

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 32	CCTTACATTTAGCAGGGATCTCC	<i>Hemipterus americanus</i>
<b>TZ 33</b>	<b>TGTAGACCTGACAATCTTCTCAC</b>	
TZ 34	GTGATGCCAATTATAATCGGAGGT	
TZ 35	CAGTCCTTCTCCTTCTTTCGCTC	
TZ 36	TTCGTGTGGTCCGTTCTCATCAC	<i>Trachidermus fasciatus</i>
<b>TZ 37</b>	<b>AGGCATTTTCATCAATTCTAGGGG</b>	
TZ 38	TCTTACTTCTTCTCGCTTCTTCAG	
TZ 39	ATTATCTCTCCCGTACTTGCAG	<i>Erisphex pottii</i>
TZ 40	TCTAACTGACCGCAACCTAAACA	
TZ 41	GTTTCGTGTGGTCCGTCCTGATTA	<i>Chelidonichthys kumu</i>
TZ 42	GACTATCTTCTCCCTTCATCTGG	
TZ 43	GTGTGGTCAGTTCTTATTACAGCC	
<b>TZ 44</b>	<b>CCGTCTTTTCTACTTCTCCTAGCC</b>	<i>Platycephalus indicus</i>
TZ 45	CTGTGACCTAACAAATCTTTTCCC	
TZ46	CCCTGTCAAGCAATCTAGCCCATG	
TZ 47	AGGGACTGCTCTCAGCCTATTAATT	
TZ 48	TTACTTCTCTCTTTACCTGTCTAG	<i>Cynoglossus semilaevis</i>
TZ 49	TTAGCCTCATCCGCAGTAGAAGCTG	
TZ 50	GAGCAGTACTTATTACAGCAGTTC	
TZ 51	ATCTTACCATCTTCTCGCTTCATC	<i>Cynoglossus joyneri</i>
TZ52	CTTCTTGCTTCTCTGTGTAGAG	
TZ 53	CCCACAAGTGCACAATATACCA	<i>Paralichthys olivaceus</i>
TZ 54	TCTGGGAGCTATCAACTTCATTAC	
TZ 55	CAGTACTAATCACAGCCGTCTT	
TZ 56	CCTACAGCGTTACTATATACCA	<i>Cleisthenes herzensteini</i>
TZ 57	TCACAATCTTCTCCCTTCACCTT	
TZ 58	GGAGACGATCAAATCTATAACGTG	
TZ 59	GCTATAACTATGTACCAGATCCAC	<i>Pleuronichthys cornutus</i>
TZ 60	GTACTAATTACAGCCGTCTACT	
<b>TZ 61</b>	<b>CGACAGTAACTATGTACCAAATCCC</b>	<i>Verasper variegatus</i>
TZ 62	TATACCCATTATGATCGGAGGATTC	
TZ 63	ACTATACTCCTAACTGACCGAAAC	<i>Zebrias zebra</i>
TZ 64	TTAATTACAGCTGTCTCCTACTC	

注: 加粗表示该探针不可用。

Note: Probes in bold are not available.

**2.2.2 数据集 2 探针信息及杂交结果** 数据集 2 包括鲈形目的 32 个物种。通过 OligoArray 2.1 共筛选出 30 个物种的 89 条探针。经 OligoCalc 优化去除 21 条不合格探针, 最后获得 28 个物种的 68 条探针(表 7)。将所有物种的序列比对切齐, 探针与切齐序列在 OHM 中虚拟杂交, 杂交结果显示, TZ103 为玉筋鱼的探针, 但其并不能与玉筋鱼的

序列杂交, TZ87、TZ98、TZ102、TZ110、TZ111、TZ128 在其靶标序列结合的同时还能与非靶标序列结合, 这些探针都不可用。剩余 25 个物种的 61 条探针都可以与其靶标序列特异性结合, 可以作为物种的鉴别探针。有些物种仅筛选出了一种探针, 但杂交结果显示该探针并不可用, 如白姑鱼(*Pennahia argentatus*)、方氏云鳎(*Pholis fangi*)、



表 7 数据集 2 探针编号及序列  
 Tab. 7 Probe Ids and sequences of dataset 2

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 65	GTTTCTTCAATCCTGGGAGCTAT	
TZ 66	CTAACGATCTTTCCCTTCACCT	<i>Lateolabrax japonicus</i>
TZ 67	CACACGCGTTCGTAATAATCTTC	
TZ 68	CGTGGACCTAACCATTTTCTCAC	<i>Sillago sihama</i>
TZ 69	CCTCCTGCAGTCTCAATATATCA	<i>Trachurus japonicus</i>
TZ 70	CCGCTGGAATTACAATACTCCTA	
TZ 71	CGTCGATTCTGGGAGCAATTAAC	<i>Atropus atropus</i>
TZ 72	CTTCTTTCTACTACTCTTAGCCT	
TZ 73	GATCCCGCTATTTCGTTTGAGCTG	<i>Decapterus maruadsi</i>
TZ 74	GCTCCTATCACTTCCAGTTTTAGC	
TZ 75	CCATGTACCAAATTTCCCCTATTTCG	<i>Seriola lalandi</i>
TZ 76	GGTACAGCCTTAAGTTTACTCATC	
TZ 77	TTCGTTCTCTACTTTTAGCCTC	
TZ 78	GCTACTATTACTCTCACTCCCTGT	<i>Collichthys lucidus</i>
TZ 79	CTATTTGTCTGAGCTGTCCTCATT	
TZ 80	TCTGATTACAGCAGTCTCCTCC	
TZ 81	AGCCATTTTCGCTCTGCACCTTG	<i>Larimichthys polyactis</i>
TZ 82	ATTATGCTCGCAGCCTCATCAGC	
TZ 83	TCTCATTATTCGAGCAGAGCTAAG	
TZ 84	TGTTGCTTCTTTATCCCTTCCG	<i>Johnius belengerii</i>
TZ 85	TCCTAATTACAGCAGTTCTCCTG	<i>Nibea albiflora</i>
TZ 86	GTCTACTAATCCGAGCAGAATAA	
<b>TZ 87</b>	<b>CTACTATCACTACCCGTAAGC</b>	<i>Pennahia argentatus</i>
TZ 88	ACCGATCGTAATCTAAACACTACC	
TZ 89	CGGGTATTTTCATCAATTCTGGTGC	<i>Pagrus major</i>
TZ 90	TTCCTTCTTCTACTCGCTTCCCTCCG	
TZ 91	TACTGCTGTCCTACTCCTTTGTC	
TZ 92	TATCAATATGAAACCGCCAGCTATC	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
TZ 93	GCTGCTAGCTTCTTCTGGTGTGAA	
TZ 94	TATCCGCCTCTCGCAGGTAATTTAG	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
TZ 95	CTCTACACTTAGCAGGATTTTCT	
TZ 96	CTCGCAGCTGGTATCACAATACT	<i>Chirolophis japonicus</i>
TZ 97	TCTACTACTTCTTTCACTTCCCG	
<b>TZ 98</b>	<b>TTCGTTTGATCCGTAAGC</b>	<i>Pholis fangi</i>
TZ 99	CTGTCCTTATCACGGCTGCCTA	
TZ 100	GAATTTCTTCAATCCTCGGAGCA	<i>Zoarces elongatus</i>
TZ 101	TCCTCTTTCTGGAAACTTGCC	
<b>TZ 102</b>	<b>GGACATAGCATTTCCTCCGATAA</b>	
<b>TZ 103</b>	<b>GAGCAATCAACTTCATCACCACA</b>	<i>Ammodytes personatus</i>
TZ 104	ACTCTTATCCCTTCCAGTACTTG	
TZ 105	GCAATAACACAATATCAAACGCC	<i>Chaeturichthys stigmatias</i>
TZ 106	TTTACTCTTCTCAGGCGTCGAAG	

(待续 to be continued)

(续表 7 Tab. 7 continued)

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 107	TACTCCTTTTATCCTTACCAGTCC	
TZ 108	GCACTTAGCAGGAGTTTCTTCAAT	<i>Trypauchen vagina</i>
TZ 109	CTGTAGACTTAACCATTTTCTCCC	
<b>TZ 110</b>	<b>CCATCACCCAATTTCAAACCCCTC</b>	
<b>TZ 111</b>	<b>TTCTAGCTTCTTCCGGAGTTGAAG</b>	<i>Trichiurus lepturus</i>
TZ 112	CCATCTTAGGCGCCATTAACCTTA	
TZ 113	TTCGTCTGAGCAGTCCTAATTACA	<i>Scomber japonicus</i>
TZ 114	TCCTTCTATCACTCCCAGTTCTT	<i>Auxis thazard</i>
TZ 115	CTCTCTTGTCTGAGCCGTATTAA	
TZ 116	CAGGGGTATCTTCAATTCTCGGAG	<i>Pampus argenteus</i>
TZ 117	GCGGGGATTACAATACTATTGAC	
TZ 118	TACTGCTTTCTCTGCCTGTGCTG	
TZ 119	CACAACCATGTATCAAATCCCAC	
TZ 120	TGCGGGCATCTCCTCTATTCTTG	<i>Sphyræna pinguis</i>
TZ 121	TGACCTAACCATCTTCTCCCTTC	
TZ 122	CGCCTTCGTGATAATCTTCTTCA	
TZ 123	TACTTACTATTTGGTGCCTGAGC	
TZ 124	GGGATCACAAATGCTTCTTACTGA	
TZ 125	CCTTATTACAGCCGTGCTACTTC	<i>Odontamblyopus rubicundus</i>
TZ 126	CTTATTAGCATCATCAGGGGTGA	
TZ 127	TACTTCTAGCCCTCCCTGTCTTA	
<b>TZ 128</b>	<b>TCACCCTTTACCAAACCCCTCTG</b>	<i>Priacanthus macracanthus</i>
TZ 129	CTTCTTCTCCTAACCTCCTCAGC	
TZ 130	GATCACTTCTGGGAGATGACCAA	
TZ 131	GTGTGGTCCGTACTAATTACAGC	<i>Acropoma japonicum</i>
TZ 132	GCTTATTCCTTATGATTGCCG	

注: 加粗表示该探针不可用。

Note: The probes in bold are not available.

玉筋鱼(*Ammodytes personatus*)等物种。

**2.2.3 数据集 3 探针信息及杂交结果** 数据集 3 包括其他 9 目的 18 种鱼类。通过 OligoArray 2.1 共筛选出 18 个物种的 70 条探针。经 OligoCalc 优化去除 17 条不合格探针, 最后剩余 18 个物种的 53 条探针(表 8)。将 18 个物种的序列比对切齐, 探针与切齐序列在 OHM 中虚拟杂交, 杂交结果显示, TZ143、TZ159 在与其靶标序列结合的同时还能与非靶标序列结合, 探针不可用。其他 18 个物种的 51 条探针都能与且只与其靶标序列结合, 可以作为物种特异性探针。

总之, 本研究共从 GenBank 下载 77 个物种序列, 利用软件 OligoArray 2.1 初步筛选得到 73 个

种的 239 条物种特异性探针。经 OligoCalc 再次筛选, 排除易形成发夹、茎环及自身二聚体结构的探针, 共筛选出 68 个种的 185 条探针。探针与切齐序列在 OHM 中虚拟杂交, 最后有 64 个物种的 166 条探针可以与其靶标序列特异性杂交, 可以作为对应物种的鉴别探针, 可鉴定的物种数占总物种数的 83.1%(表 9)。

### 3 讨论

DNA 条形码是一种利用 DNA 序列来鉴定物种的新技术, 它打破了分类学只能依靠形态特征来完成的传统, 为分类学开辟了一条新的途径, 将完成一些传统形态学鉴定手段无法完成的工作,

表 8 数据集 3 探针编号及序列  
Tab. 8 Probe IDs and sequences of dataset 3

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 133	CACCAGCCACTACACAATATCAA	<i>Conger myriaster</i>
TZ 134	CCAGTTATAATTGGTGGATTCCGG	
TZ 135	CCGGCATAGTAGGAACCGCTTTAA	
TZ 136	GGCGTTTCATCAATTTTAGGAGCA	<i>Muraenesox cinereus</i>
TZ 137	TGCCTCCATCATTCTCTACTACT	
TZ 138	TAGTAATGCCAGTAATAATCGGCGG	
TZ 139	CAGATCTATAATGTTATCGTCACGG	
TZ 140	CCATACTACTCACTGACCGAAAC	<i>Dysomma anguillare</i>
TZ 141	CCTACTATCTCTGCCAGTCCTAG	
TZ 142	TCAGTAGACTTAACCATCTTCTCAC	
<b>TZ 143</b>	<b>GGCAATTGACTAGTACCCCTAATGA</b>	
TZ 144	ATACCCGTAATAATCGGTGGATTC	
TZ 145	CTCTCTCTGGGAAATGACCAAATT	<i>Hyporhamphus sajori</i>
TZ 146	TTCGTTTGGGCTGTCTTAATTACTG	
TZ 147	GCCGGTGTATCTTCAATTCTCGGAG	
TZ 148	CCTCCGTTGATTTAACAATCTTCTC	
TZ 149	CCATACTCTCACAGATCGAAAC	<i>Saurida elongata</i>
TZ 150	TGTATGGGCGTCTGATTACCG	
TZ 151	CTCTTCTCTCTTTACTGGCTTC	
TZ 152	CTTAATCCGTGCCGAACCTAGCCA	<i>Saurida tumbil</i>
TZ 153	TCCTCTCTCCTTACCCGTTCTT	<i>Harpadon nehereus</i>
TZ 154	GATTTCTCTATTTTGGGAGCCA	
TZ 155	ACTACTCTCACTACCAGTTCTTG	<i>Fistularia petimba</i>
TZ 156	TATCTCATCAATCCTAGGAGCCA	
TZ 157	TTACTCCTTCTATCCCTGCCCGT	<i>Syngnathus acus</i>
TZ 158	AGGTGTTTCTCAATTCTAGGAG	<i>Liza haematocheila</i>
<b>TZ 159</b>	<b>TTTTAGCATCCTCTGGCGTAGAA</b>	
TZ 160	CTTCTCACAGACCGCAACTTAAA	<i>Gastrophysus spadiceus</i>
TZ 161	GCAGGGATTACAATACTTCTCAC	<i>Takifugu rubripes</i>
TZ 162	GCGATCAACTTCATCACAACCTATC	
TZ 163	CTGTAGACCTCACCATCTTCTCTC	
TZ 164	TGCTCGCATCCTCTGGAGTAGAAG	
TZ 165	TTAATCCCACTTATAATCGGAGCC	
TZ 166	AAACTGACTGGTGCCACTAATAATCG	<i>Diodon holacanthus</i>
TZ 167	CAATACTCTGACTGACCGTAAT	<i>Thamnaconus septentrionalis</i>
TZ 168	TATTACTCTGTCCCTACCCGTG	<i>Lophius litulon</i>
TZ 169	TCGTATGGGCTGTTTTAATCACAG	
TZ 170	CGTAACCTCAACACCTCCTTCTT	<i>Coelorinchus multispinulosus</i>
TZ 171	CTAATCACAGCAGTCCTTCTTCT	
TZ 172	ACCTTTAATGATCGGAGGCTTTG	
TZ 173	ACCTTGATTCGGCGCTTGAGCT	
TZ 174	CATCACACAATACCAGACACCTT	
TZ 175	CATCCTGGGTGCAATTAACCTCA	

(待续 to be continued)

(续表 8 Tab. 8 continued)

探针编号 probe ID	探针序列 probe sequence	物种名称 Latin name
TZ 176	GACTATCTTCTCCCTTCACTTGG	<i>Coelorrhinus multispinulosus</i>
TZ 177	TATTATCTCTCCCCGCTTAGCAG	
TZ178	CCCTCTTTGTTTGAGCAGTACTAAT	<i>Gadus macrocephalus</i>
TZ 179	CCACTAATAATTGGAGGCTTTGGGA	
TZ 180	CTGGCATCACCATACTTCTTACA	
TZ 181	CTTATAGCCCTACCAGTTCTAGC	
TZ 182	TTGGCAGGCATCTCATCTATCCTAG	<i>Okamejei kenojei</i>
TZ 183	CCTCCATTAACCTTCATCACCACAAT	
TZ 184	CATAGCCTTCCCACGCATAAATAAT	
TZ 185	AATTATAATCGGCGGGTTCGGTAAC	

注: 加粗表示该探针不可用。

Note: The probes in bold are not available.

表 9 筛选探针及杂交情况  
Tab. 9 Probe selection and hybridization conditions

数据集 dataset	总物种数 quantity of species	初选物种数 species through first selected	次选物种数 species through second selected	可鉴定物种数 species can be identified	可鉴定物种数比例 /% ratio
1	27	25	22	21	77.8
2	32	30	28	25	78.1
3	18	18	18	18	100
总计 total	77	73	68	64	83.1

比如, 可以鉴定生物的卵和幼体、动物或植物的寄生物, 还能很快鉴定新种, 并有可能解决形态学手段难以攻克的隐存种问题, 为分类和生物多样性的发现提供有力的根据<sup>[17]</sup>。随着条形码序列数目的积累, DNA 条形码在鱼类系统进化和物种鉴定方面广为应用<sup>[18-21]</sup>。

利用 DNA 条形码进行物种鉴定取决于两个方面: (1)同一物种的种内遗传距离要小, 不同物种的种间距离要大, 且种间距离要明显大于种内距离。(2)在系统进化树上, 同一物种的不同个体能聚为同一分支。Hebert 等<sup>[17]</sup>通过对大量动物界物种 mtDNA 的 CO I 基因进行分析, 认为物种的种内最大遗传距离应为 0.02, 且种间距离至少是种内距离的 10 倍。本研究利用软件 MEGA6 基于 K2P 遗传距离分别计算了 13 目 50 科 73 属 77 种鱼类各个分类单元的遗传距离。发现有 76 个物种的种内遗传距离都小于 0.02, 种内、属内种间、科内属间、目内科间及目间的遗传距离分别为 0.0034、0.117、0.180、0.241、0.259, 其中种内与

属内种间遗传距离差异明显, 后者为前者的 34 倍。这表明, 以 CO I 序列为基础的条形码技术对鱼类的物种鉴定是可行的, 同时具备一定的低阶分类单元的系统进化分析能力, 但对于科级以上分类阶元的系统进化关系识别力较弱。这一结果, 与王中铎<sup>[20]</sup>在利用 CO I 序列分析南海 40 种鱼类研究的结论类似。另外发现, 本研究所有对象中, 只有大龙六线鱼种内遗传距离为 0.029, 比 0.02 略大, 究其原因可能与不同地理种群的影响或可能为原始序列测定不准确有关。

DNA 芯片技术也是一种利用 DNA 序列来鉴定物种的技术, 它与条形码技术相比具有一定的优势, 比如, 芯片技术能够同时处理大量的序列, 能够大大增加物种鉴定的效率。本研究利用 OligoArray 2.1 筛选探针, 从 77 个种中初步筛选得到 73 个种的 239 条物种特异性探针, 大部分物种都可筛选出数个特异性探针, 但有 4 个物种没有筛选出探针, 再利用 OligoCalc 对筛选出的探针进行检验, 又有 5 个种的探针不合格, 最后获

得了剩余 68 个物种的 185 条探针。在 OHM 软件中虚拟杂交时只有 64 个物种的 166 条探针可以与其靶标序列特异性杂交, 可鉴定的物种数占总物种数的 83.1%, 这一结果与欧阳小艳等<sup>[8]</sup>的研究结果类似, 他们分别利用 DNA 条形码和 DNA 芯片识别蚊类, 结果 DNA 条形码的准确性为 98.5%, DNA 芯片的准确性为 90%~98.4%。

本研究所筛选出的探针是依据这 77 个物种序列相互比对得到的, 所谓的物种特异性是相对这 77 个物种来说的, 得到的探针也只能区分这 77 个物种。由于这些物种亲缘关系较远, 所以所得探针在 77 个物种之外不适用。如果想得到一个物种在任何情况下都适用的探针, 则需要尽可能多的选取与其亲缘关系近的物种序列作比较, 这需要我们以后获取更多的序列来进行更多的比较来完成。

#### 参考文献:

- [1] Shen G Y, Huang L F, Guo F, et al. Marine Ecology (3rd Edition)[M]. Beijing: Science Press, 2010. [沈国英, 黄凌风, 郭丰, 等. 海洋生态学: 第 3 版[M]. 北京: 科学出版社, 2010.]
- [2] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
- [3] Li Q, Zou S M, Zheng X D, et al. DNA Barcoding and its applications in marine organisms[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(8): 43-47. [李琪, 邹山梅, 郑小东, 等. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(8): 43-47.]
- [4] Schena M, Heller R A, Theriault T P, et al. Microarray: biotechnology's discovery platform for functional genomics[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(7): 301-306.
- [5] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): e312.
- [6] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1847-1857.
- [7] Kochzius M, Nölte M, Weber H, et al. DNA Microarrays for Identifying Fishes[J]. Mar Biotechnol, 2008, 10: 207-217.
- [8] Ouyang X Y, Mo B H, Yu H L, et al. DNA barcoding identification-comparison on accuracy of DNA arrays and DNA barcodes in mosquito identification[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2007, 30(6): 349-352. [欧阳小艳, 莫帮辉, 余华丽, 等. DNA 条形码识别-DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒准确性的比较[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(6): 349-352.]
- [9] Hou Y M. The situation of the sea of Shandong[M]. Beijing: China Ocean Press, 2010. [侯英民. 山东海情[M]. 北京: 海洋出版社, 2010.]
- [10] Chen Q T, Zhou C W. Fish fauna of Shandong[M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1997. [成庆泰, 周才武. 山东鱼类志[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1997.]
- [11] Liu R Y. China's Marine Life List[M]. Beijing: Science Press, 2008. [刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008.]
- [12] Liu J, Ning P. Species composition and faunal characteristics of fishes in the Yellow Sea[J]. Biodiversity Science, 2011, 19(6): 764-769. [刘静, 宁平. 黄海鱼类组成、区系特征及历史变迁[J]. 生物多样性, 2011, 19(6): 764-769.]
- [13] Wu H L, Zhong J S. Fauna of China Osteichthyes: Perciformes (V) Gobioidae[M]. Beijing: Science Press, 2008. [伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志 硬骨鱼纲: 鲈形目(五)虾虎鱼亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2008.]
- [14] Li F, Zhou X, Zhang L, et al. Taxonomic diversity of fish assemblages in coastal waters off Shandong[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(7): 2322-2330. [李凡, 周兴, 张岚, 等. 山东近海鱼类群落分类多样性[J]. 生态学报, 2015, 35(7): 2322-2330.]
- [15] Tang Q S, Ye M Z. Shandong offshore fishery resources development and protection[M]. Beijing: Agriculture Press, 1990. [唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护[M]. 北京: 农业出版社, 1990.]
- [16] Jin X S, Cheng J S, Qiu S Y, et al. Huang Bohai fishery resources comprehensive research and evaluation[M]. Beijing: China Ocean Press, 2006. [金显仕, 程济生, 邱盛尧, 等. 黄渤海渔业资源综合研究与评价[M]. 北京: 海洋出版社, 2006.]
- [17] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc B, 2003, 270: 96-99.
- [18] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FIS H-BOL[J]. J Fish Biol, 2009, 74: 329-356.
- [19] Zemlak T S, Ward R D, Connell A D, et al. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes[J]. Mol Ecol Resour, 2009(9): 237-242.
- [20] Wang Z D, Guo Y S, Chen R L, et al. CO I barcoding sequences of teleosts in the south China Sea[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(5): 608-614. [王中锋, 郭昱嵩,

- 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类 *COI* 条形码序列[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 608–614.]
- [21] Li X R, Liu S F, Li D, et al. Species identification and phylogenetic relationships in order Clupeiformes based on DNA barcoding[J]. Journal of Fishery Sciences of China. 2015, 22(6): 1133–1141. [李献儒, 柳淑芳, 李达, 等. DNA 条形码在鲱形目鱼类物种鉴定和系统进化分析中的应用[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1133–1141.]

## DNA barcoding and electronic microarray for common fish species in Shandong coastal waters

LIU Shufang<sup>1,2</sup>, LI Xianru<sup>1,4</sup>, DU Tengfei<sup>1,5</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1,3</sup>

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;
3. Function Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
5. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Marine biodiversity is an important indicator of ecosystem health and the material basis for the development and utilization of marine biological resources. Shandong coastal waters are the main breeding grounds for Bohai and Yellow Sea fisheries resources. These waters provide a wealth of biological resources and a superior fisheries habitat for China, Japan, South Korea, and North Korea. However, the Shandong offshore fisheries resources have been trending downward in recent years, and species abundance and diversity have decreased. Therefore, identifying and classifying the fish species in these coastal waters are urgently required to effectively protect and use these resources. In this study, 229 DNA sequences of the cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene from 77 common marine fish species in 13 orders, 50 families, and 73 genera from offshore of Shandong were analyzed to test the efficacy of species identification using a DNA barcode microarray. The results showed that interspecific genetic distance was larger than intraspecific distance. All 77 sequences formed species units in a neighbor-joining dendrogram, indicating that DNA barcodes can be used to identify these 77 species. Sixty-four specific probes were screened to identify the corresponding species among the 77 species based on the *COI* genes and accounted for 83.1%. Thus, the DNA barcode microarray provided technical support and a new way to identify fish species in the coastal waters offshore of Shandong.

**Key words:** Shandong offshore; *COI*; DNA barcode; electronic microarray

**Corresponding author:** ZHUANG Zhimeng. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn