

文章编号: 1674 - 5566(2015)02 - 0203 - 08

DNA 条形码在鱼类胃含物种类鉴定中的应用

席晓晴¹, 鲍宝龙², 章守宇¹

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: DNA 条形码技术是利用一段较短的 DNA 序列实现快速准确物种鉴定的工具, 已成为近年来生物类群的研究热点, 并逐步被引进到各个领域。在海洋生物群落生态学中, DNA 条形码已被用于海洋生物系统分类、分子遗传多样性、种间亲缘关系、系统进化关系等研究; 国外已有学者将其应用到海洋生物食性分析的研究中, 国内相关文章较少。本文介绍了 DNA 条形码的由来、发展以及相关原理和基本实验步骤, 并阐述了其优点以及局限性, 分析了其在肉食性鱼类胃含物不可辨认种类鉴定中的应用价值, 并展望其在未来分类学发展中的应用前景。

研究亮点: 介绍了 DNA 条形码的研究进展及其在鱼类食性分析中的应用, 并针对 DNA 条形码的优缺点进行了较系统的阐述, 着重论述了 DNA 条形码在鱼类胃含物不可辨认成分中的应用价值, 为深入研究鱼类食性或海洋生物群落生态学的研究提供参考。

关键词: 物种鉴定; DNA 条形码; DNA 分类学; 鱼类食性; 摄食生态

中图分类号: P 735; S 917

文献标志码: A

2003 年, 加拿大科学家 HEBERT 等首次发表了有关生物 DNA 条形码的研究结果, 并率先提出使用线粒体基因细胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome c Oxidase subunit I, CO I) 基因的一段长约 650 bp 的片段作为区分动物种类的 DNA 条形码^[1-2], 它作为辅助物种鉴定的新技术, 代表了生物分类学研究的新方向^[3]。2003 年 3 月, 美国“TAXONOMY AND DNA”会议, 提出要对全球所有生物的某个特定基因进行大规模测序, 借此推进有关生物进化史的研究^[3]。2004 年, 美国召开的关于 DNA 条形码的大型研讨会创立了“生命条形码联盟”(the Consortium for the Barcode of Life, CBOL)。2004 年秋, 美国国立生物技术信息中心(NCBI)与 CBOL 签署合作协议, 规定全世界采集的物种条形码的标准 DNA 序列及相关采集时间地点等被保存在 GenBank 1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html) 中。此后, DNA 条形码技术发展迅速, 逐渐成为生物分类学中辅助物种鉴定的新技术。

国际生命条形码计划 (International Barcode of Life, IBOL) 已于 2009 年正式启动, 目标是 5 年内实现含有 500 万个国际条形码序列参照文库, 规定全球 4 个中心节点为加拿大、美国、中国和欧盟。中国主要负责全亚洲生命条形码计划的实施, 并为亚洲其他区域节点或国家节点提供相应的技术支持以及人员培训^[4]。2013 年是条形码提出的第十年, 这十年涌现了各种新方法、新技术, 条形码已经将应用扩展到生物物种鉴定、生物多样性监测、生态学取证、进化生物学、生态安全以及公共服务等多个领域^[3, 5-8]。2013 年的条形码大会在中国昆明举行, 大会主题是“全球变化下的生命条形码: 机遇与挑战”, 大会围绕全球变化下的生物多样性与资源环境目前面临的重大挑战与机遇等问题, 展现条形码研究的一系列最新进展及其在社会和经济领域的应用, 推动了我国的生物多样性保护和生态安全等领域的发展^[9]。

收稿日期: 2014-08-09 修回日期: 2014-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(41176110)

作者简介: 席晓晴(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向鱼类群落生态学。E-mail: xiaqingxi@ Hotmail.com

通信作者: 章守宇, E-mail: syzhang@ shou. edu. cn

1 DNA 条形码技术的原理、操作步骤及研究进展

自然界中每种生物都具有唯一的基因序列。在自然选择的作用下,部分固定位点的碱基导致可能的编码组合数目减少,但可以通过只考虑蛋白质编码基因解决该问题。在编码蛋白质的基因里,密码子的简并性通常使其第 3 位碱基不受自然选择的作用而自由变化,因此只需考虑在蛋白质编码基因上的一条几十个碱基的序列就可以获得十几亿种的可选择的基因编码序列^[3]。由于分子生物学技术的发展,在实际的研究过程中,我们已经可以获得一段几百个碱基长度的 DNA 序列,而这几百个碱基长度的序列提供的排列组合数目在理论上完全可以涵盖所有物种。而种内和种间序列变异速率的差异可以作为利用基因序列分析达到物种鉴定的基础。理想的 DNA 条形码能够显示出种间遗传差异明显大于种内遗传差异,二者之间会出现较为显著的基因间隔区^[3]。因此,用来作为 DNA 条形码的基因片段必须具备如下两个基本特征:(1) 基因序列必须相对保守,有利于扩增通用引物;(2) 基因序列必须具有一定的变异程度,有利于区分两个物种^[5]。目前要解决物种等级问题,通常被广泛采用的是线粒体的 12S 和 16S 基因,而核内基因的变化速率通常要低于线粒体的基因变化速率,不利于区分物种的等级;在线粒体中的 13 个蛋白编码基因中只存在很少的插入和缺失,减少了鉴定过程的复杂程度。而在线粒体的 13 个候选基因中,CO I 能够保证既有足够的变异又容易被通用引物扩增,是作为 DNA 条形码的理想基因序列^[5]。

DNA 条形码技术的基本操作过程相对比较简单,主要包括 5 个步骤:提取目标对象的 DNA,使用通用引物扩增目的片段,纯化 PCR 产物后进行基因测序,再进行序列比对分析。序列分析是将所有序列进行两两比较并计算其差异值,再根据差异值确定物种间的关系^[5]。大多数近期发表的文章都采用测量距离差距来推断物种关系,主要使用的有两种方法:简单 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)方法和基于遗传基因树的方法^[10]。

迄今为止,为解决形态学鉴定的弊端以及传

统分类学家的逐渐减少等问题,众多分类学家已经开始采用分子生物学的方法辅助鉴定生物种类,解决物种多样性、遗传多样性的保护问题。BUCKLIN 等采用基因条形码鉴定北冰洋海域的浮游动物种类,证明使用长度约为 700 bp 的 CO I 序列作为分析对象可以加快分析种类的研究进展^[11]。柳淑芳等采用 CO I 基因的特异性序列扩增,并与 GenBank 已有的序列结合分析,对石首鱼科 19 属 30 种鱼类的 75 个 CO I 基因片段的序列进行比较和系统进化研究,证明线粒体 CO I 基因可作为 DNA 条形码对石首鱼科鱼类进行有效的物种鉴定,也可用于探讨石首鱼科的属、种分类单元的系统发育问题^[12]。ZHU 等用 DNA 条形码来鉴定黑鱼种类,判断不同品种的遗传距离,发现使用部分 CO I 序列作为 DNA 条形码是鉴定鳢科鱼类种类的有效工具^[13]。BUCKLIN 等对 40 种磷虾的 CO I 序列进行分析,证明 DNA 条形码可以用于磷虾类的物种鉴定^[14]。麦维军等对中国沿海的 13 种对虾科动物的 16S rRNA 基因(约 371 bp)和 CO I 的部分序列(约 385 bp)进行分析,证明 16S rRNA 序列可能更加适用于对虾属以上阶元的遗传多样性分析,而 CO I 序列更适合对虾科种间和群体的遗传多样性研究^[15]。董丽娜等对北部湾的日本金线鱼(*Nemipterus japonicus*)、红棘金线鱼(*N. nemurus*)和苏门答腊金线鱼(*N. mesoprius*) 3 种金线鱼属鱼类进行了 CO I 基因序列扩增,利用 CO I 序列进化差异性探讨 3 种鱼之间的亲缘关系^[16]。刘敏等采用 PCR 技术对东黄海野生沙海蜆(*Stomolophus meleagris*)的 20 个个体的 mt DNA CO I 基因进行扩增,用 CO I 基因序列构建 NJ 系统发育树,发现东黄海沙海蜆与越前水母(*Nemopilema nomurai*)属于同一物种^[17]。彭士明等利用 PCR 技术扩增渤海湾、东海的舟山海域、南海的广东沿海的银鲳(*Pampus argenteus*)线粒体 CO I 基因片段,比较分析了这 3 个地区的 48 尾银鲳线粒体 CO I 基因序列的变异和遗传结构,发现并不存在遗传分化现象^[18]。胡文革等对分布在新疆的 3 种雅罗鱼进行了线粒体 DNA D-loop 控制区核苷酸序列的测定,研究序列同源性和变异程度^[19]。张凤英等利用通用引物成功扩增了黄鳍鲷(*Sparus latus*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)的 CO I 基因序列,探究真鲷

(*Pagrus major*)、黄鳍鲷和黑鲷的序列差异^[20]。越来越多的国内外科学家使用分子生物学手段研究生物分类、进化以及多样性等问题^[21-27]。我们可以看出从浮游动物到鱼类虾类的物种鉴定、遗传多样性研究及亲缘关系比较等都可以依靠 DNA 条形码(*CO I*, *16S r RNA*, *mt DNA* 等)得以实现,这对于鱼类胃含物中不可辨认成分的物种鉴定提供参考,与此同时,GenBank 中已有的条形码数据库也为我们比对序列信息确定生物种类奠定了基础。

2 DNA 条形码的优缺点

在鱼类胃含物种类鉴定过程中,传统的物种鉴定主要依靠形态学方法,生物形态表型的可塑性和遗传可变性可导致鉴定误差;另外,许多生物群体存在隐存的分类单元,形态学方法无法准确鉴定,并且生物性别和发育阶段同样会影响形态学鉴定,这些都将导致鉴定误差^[28]。针对鱼类胃含物不可辨认组分的鉴定中形态学无法完成的鉴定工作,DNA 条形码主要有以下几点优势:(1)可对小体积的生物组织进行种类鉴别。(2)对物种的鉴定不受实验对象的年龄和性别限制^[6]。在生物的不同生长发育阶段都可以采用该方法进行鉴别。(3)对于表观相似度很高的物种可以更加准确地判定。部分物种由于表观可塑性而趋同,对形态学鉴定造成困难,但 DNA 条形码技术可以有效地解决此问题。(4)鉴定更加快速而准确,覆盖范围广,GenBank 中 DNA 条形码数据库的建立以及完善,有助于我们更加快速准确地鉴定过去无法通过形态学分类鉴定出的成分。

但事实上,在理论上并不存在一个既能够保证大范围的引物扩增又能准确区分出不同物种的普适性基因^[6]。因此,DNA 条形码技术同样具有一定的局限性。在鉴定不同的物种时需要针对不同的目的基因,设计不同的引物。例如,植物的线粒体 DNA 由于杂交和基因渗入等原因而变异较小,不足以区分出物种,不适合作为目的基因;真菌的线粒体 DNA 含有内含子,影响通用引物的设计,也无法作为目的基因;而在珊瑚虫、海葵和水母中,存在线粒体 DNA 的修复体系,同样不能作为条形码的标准基因^[6]。每个物种的种内、种间遗传变异的序列差异都不相同,例如

大多数的线粒体基因种内差异通常小于种间差异,但也存在例外。近缘物种拥有相似的线粒体多态性以及同属间的线粒体 DNA 修复机制,这会导致在鉴定近期快速分化物种和区分通过杂交产生的新种过程中遇到困难^[6]。另外,同属间较低的遗传差异也会给分类鉴定带来干扰。而对于条形码的片段长度,ROE 等比较了不同亲缘种类 *CO I* 和 *CO II* 中不同基因区间在种内种间多样性的差异,并认为扩大研究片段的长度可以在采样区获得更多的遗传信息并减少随机突变的可能误差,即条形码的标准区间或许应该更大一点,这样才能减少随机变化带来的种类分析偏差^[29]。综上可知,条形码在胃含物种类鉴定中的应用仍存在一定程度的局限性,但是我们可以通过前辈们以往的食性分析结果对目标对象的范围进行限定,试验出较适合的通用引物,为以后进行深入分析提供有价值的参考。

3 鱼类的食性分析研究进展

鱼类的摄食行为是其从外界获取能量的唯一途径,而生态系统的下行效应(较低营养级物种的种群结构特征受较高营养级物种的控制)通过捕食作用影响被捕食生物的数量^[30]。鱼类的摄食行为调节着生态系统的物质流动以及能量流动,也是将生态系统组成与生态系统功能联系起来的重要途径。这方面的相关基础研究主要集中在海洋食物链和食物网。评估鱼类群落的营养结构和每种鱼在群落中的营养水平,以及各营养级之间的相互作用,全面深入地研究食物链和食物网上的物质循环都必须首先研究鱼类食性^[31-32]。

目前,食性分析主要方法有胃、肠含物分析法、稳定同位素示踪法、室内饲喂法和直接观察法。胃、肠含物分析法是通过直接观察食物组成来了解食物信息,但是工作量大、对易消化的食物难以判别。PETERSON^[33]提出稳定同位素示踪法,利用自然界碳、氮、硫等稳定同位素的时空差异,可以定量分析食物来源和其流通量,能够示踪食料物质在两个以上营养级的流向以及食物来源的空间格局。但判别同一级别的多种食物来源比较困难,实验费用较昂贵。室内饲喂法是通过室内投喂实验观察对象的摄食情况,可以用于研究动物对食物的选择性和摄食行为。直

接观察法是在野外直接观察动物的摄食情况,但这对于海洋生物食性研究来说存在诸多困难^[34]。鱼类的胃含物种类鉴定是鱼类食性分析、食物网构建过程中的重要环节,分析对象主要包括确定鱼类摄食中的各种饵料生物种类组成、种类数量以及所占比例等,而胃含物鉴定可以分析出所研究对象在最近一次摄食行为中的摄食对象种类^[30]。通过利用分子生物学技术对鱼类胃里的小块食物组织进行鉴定,可以确定其在最近一次摄食行为中食物组成^[6]。传统的胃含物分析方法主要是将调查样品及时解剖,直接观察或显微镜观察,即形态学观察^[35]。但是,不同饵料生物的被消化率不同,在遇到一些消化程度较高的胃含物时,直接观察法无法发挥作用。而某一时间点的鱼类的胃含物组成可能受与食物组成无关的其他无法量化因素的影响,因此按照以往的经验来看,研究者不可能完全准确无误地罗列出某一物种的摄食对象的全部组成^[36]。

现在国内大部分研究人员主要通过形态学鉴定和同位素分析的方法来研究鱼类食性,也有少数学者开始尝试使用分子生物学手段辅助胃含物鉴定工作^[30]。薛莹等^[37]利用解剖镜观察黄海中部小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis* Bleeker)的食物组成,对关键鱼种的食物组成进行年间变化的研究,研究主要饵料生物的资源波动情况。林龙山^[38]对长江口近海小黄鱼的食性和营养级进行研究,在胃含物分析过程中进行了比较详细的分析,其通过观察形态来鉴别个体较大、消化程度较低的胃含物,对于消化比较充分的胃含物则通过如耳石、鳞片、眼睛水晶体等较难消化的器官进行分析鉴定,并尽可能定到种;而对于个体较小的胃含物则利用显微镜(>40X)进行观察,数量太大时则利用计数器计数,但仍未涉及到对于消化程度较高的成分如何鉴定。颜云榕^[39]对鱼类的食性分析进行了较为详细的介绍,对北部湾的带鱼(*Trichiurus lepturus*)、珠带鱼(*Trichiurus margarites*)、多齿蛇鲭(*Saurida tumbil*)、宝刀鱼(*Chirocentrus dorab*)、斑鳍白姑鱼(*Pennahia pawak*)利用传统的形态学方法进行了生物学测量,并应用碳、氮稳定同位素研究北部湾带鱼食性及营养级。在国外研究胃含物组成的文章中,WÜRZBERG等^[40]利用脂肪酸标记来研究底栖鱼类食性,MCINTYRE^[35]提出结合使用四甲基氢氧

化铵和气相色谱-质谱联用仪的热化学法对胃含物组成进行定性和定量分析,可以提高对胃含物成分分析的准确度(样本重量为0.5~2.0 mg)。ALFARO^[41]使用脂肪酸标记和稳定同位素来研究红树林中粗纹玉黍螺(*Littoraria scabra*)的同化的食物类型。BUDARF等^[42]使用编码被子植物的trnH-psbA作为最优基因区间来鉴定鱼类胃里的海藻,PCR和SSCP(single-strand conformational polymorphism,单链构象多态性)能够保证从不可辨认的胃含物中辨别出3种海藻科,并发现这种鉴定方法更加准确。因此,可以将DNA条形码技术引入到鱼类食性分析中,帮助我们更加准确地分辨出不可辨认的胃含物组分中生物种类,尽管现在大多数处于定性分析阶段,但通过国内外相关学者的不断尝试,将有望发展出可以定性定量分析胃含物种类的可推广的新方法。

4 DNA条形码与鱼类胃含物鉴定

目前,DNA条形码已被广泛应用在藻类、甲壳类、软体动物和鱼类的物种分类中。FISH-BOL(鱼类DNA条形码计划)组织计划建立将近30 000种鱼类的DNA条形码数据库,主要对15 000种海洋鱼类的条形码数据进行收集。目前为止,该组织已经获得2 538种鱼类的条形码数据^[3]。这将促进利用DNA条形码鉴定肉食性鱼类胃含物中形态学观察无法鉴定的生物种类。一旦条形码的数据库完善,研究鱼类胃含物的实验技术进展将迅速加快。但目前,国内从事DNA条形码鉴定生物种类的专业人员不多,还有大量的相关工作亟待完成。

使用分子手段鉴定肉食性鱼类胃含物时,首先要解决的是DNA条形码的选择问题。由于不同的物种需要选择不同的基因编码区作为条形码以及对应不同的PCR引物,这就为准确鉴定初期工作带来困难。例如,LERAY等^[43-45]在研究使用分子手段确定珊瑚礁区域鱼类胃含物成分时,对引物的使用进行了创新,采用CO I标记取代了传统的核糖体基因标记,并使用设计的*mlCOIintF*引物结合*igHCO2198*反向引物定位一个313 bp特异性的CO I序列区,所得鉴定结果比使用传统的DNA条形码标记引物*LCO1490*/*HCO2198*要精确的多。另外,LERAY对不同的引物6种组合进行了实验分析,发现*mlCOIintF*/

hgCO2198 的扩增效果最好,达到 91%;还强调排除捕食者自身 DNA 模板的干扰有助于提高鉴定结果的准确度。因此,在准备胃含物鉴定初期工作时,必须充分考虑所使用的引物能否更加精确地扩增出目的片段,是否需要尝试几种引物结合使用来获取更加准确的效果。

另外,进行胃含物不可辨认组分基因扩增时,必须考虑捕食者自身的基因干扰情况,包括调查该物种在此阶段是否存在自食现象,以及扩增出捕食者自身的序列是否能通过形态学观察判断出其来自于食物团。对此,JO 等^[46]使用 *LC01490/HCO2198* 通用引物对韩国淡水生态系统的肉食性鱼类进行胃含物 DNA 扩增,同样提出使用限制酶和寡核苷酸阻断捕食者自身的 DNA 干扰。但是,DUNSHEA^[47]提出这种阻断干扰的方法需要大量的经验测试,而且目前没有统一的标准来划分是否能够阻断捕食者自身或猎物的 DNA 扩增。因此,解决捕食者自身 DNA 干扰问题仍需进一步探索。

与此同时,针对鉴定不同组成的胃含物种类,考虑不同的条形码,肉食性鱼类和植食性鱼类的胃含物鉴定引物的选择必然不同。对此,可参考物种鉴定的引物设计。例如,裴英才和陈步峰^[7]在研究中发现在鉴定动物种类时,需要的是线粒体基因编码区的 *CO I*;鉴定植物种类需要使用叶绿素基因编码区的 *rbcl*、*matK*、*trnL-F* 和叶绿体非编码基因间隔区的 *ITS*,以及核基因非编码基因间隔区的 *trnH-psbA* 等作为 DNA 条形码;鉴定微生物种类时,需要核基因非编码基因间隔区的 *ITS* 和核基因编码区的 18S rDNA 作为条形码。不同的条形码对应不同的扩增引物,不同的引物又具有自己特有的 PCR 退火温度。因此,对于同一个胃含物实验样品在鉴定初期需要对其样本进行简单的分类,对不能辨别的生物组织进行初步判断,尽量辨别出其是鱼类、虾蟹类或者藻类等并分开保存,从而有利于选择对应的条形码以及选择相应的 PCR 引物。此外,条形码数据库的构建程度也影响所扩增出的饵料生物序列的匹配^[44]。

5 小结与展望

DNA 条形码作为一种分子生物学技术,可以快速实现物种水平上对未知生物材料的鉴定和

识别^[1,8],并结合传统的形态学分析生物种类^[6],因此,它能够推进分类学和生物多样性保护的研究^[48-49]。但条形码技术本身并不能够取代传统的分类学,而是作为一种可以有效鉴定未知生物种类的辅助工具。CBOL 将它视为分类学的一部分,用来鉴定未知物种、辅助形态学分析和界定物种边界^[50]。但是,DNA 条形码不同于以往传统的形态学鉴别方法,对于研究者的专业技能要求不高,任何研究者都可以在较短时间内掌握该技术,在这个基础上,我们将其引入胃含物物种鉴定并作为辅助食性分析的工具。国际上,不少组织已经开展动物条形码计划,例如,ABBI(鸟类 DNA 条形码计划)、FISH-BOL、FBI(实蝇 DNA 条形码计划)、MBI(蚊子 DNA 条形码计划)等^[51]。目前(Barcode of Life Data Systems, BOLD)中已经收录近 50 万条记录,涵盖了动物界 46 000 多个物种,并且该数据库仍在不断扩大^[36]。因此,随着条形码数据库的不断完善,该技术将更好地发挥其在生物多样性中的作用,并可以为食性分析、食物网的构建提供更加准确的分析依据以及技术支持。

参考文献:

- [1] HEBERT P, CYWINSKA A, BALL S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, a270:313-321.
- [2] HEBERT P, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, b270: S96-S99.
- [3] 薛银刚,许霞,蔡焕兴,等. DNA 条形码技术在水生生物分类中的研究进展[J]. 环境监测与预警, 2012, 4(6):23-26.
XUE Y G, XU X, CAI H X, et al. The Research Progress of DNA Barcoding in Aquatic Taxonomy [J]. Environmental Monitoring and Forewarning, 2012, 4(6):23-26.
- [4] ROE A D, SPERLING F A. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44:325-345.
- [5] 肖金花,肖晖,黄大卫. 生物分类学的新动向——DNA 条形码[J]. 动物学报, 2004, 50(5):852-855.
XIAO J H, XIAO H, HUANG D W. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy [J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50(5):852-855.
- [6] 彭居俐,王绪楨,何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6):916-919.

- PENG J L, WANG X Z, HE S P. The progress and application of DNA barcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008,32(6):916-919.
- [7] 裴男才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. *生物多样性*, 2013,21(5):616-627.
- PEI N C, CHEN B F. DNA barcoding of life: a classification of uses according to function and scale after ten years of development[J]. *Biodiversity Science*, 2013,21(5):616-627.
- [8] 陈士林, 庞晓慧, 罗焜等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. *生命科学*, 2013,25(5):451-459.
- CHEN S L, PANG X H, LUO H, et al. DNA barcoding of biological resources[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013,25(5):451-459.
- [9] 第五届国际生命条形码大会将在中国昆明召开[J]. *植物分类与资源学报*, 2013,35(2):219-220.
- Fifth international barcode of life conference will be held in Kunming, China[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2013,35(2):219-220.
- [10] ZHANG A B, SIKES D S, MUSTER C, et al. Inferring species membership using DNA sequences with back-propagation neural networks[J]. *Systematic Biology*, 2008,57(2):202-215.
- [11] BUCKLIN A, HOPCROFT R R, KOSOBOKOVA K N, et al. DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2010,57:40-48.
- [12] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 CO1 基因的 DNA 条形码在石首鱼科 (Sciaenidae) 鱼类系统分类中的应用[J]. *海洋与湖沼*, 2010,41(2):223-232.
- LIU S F, CHEN L L, DAI F Q, et al. Application Of DNA Barcoding Gene CO I For Classifying Family Sciaenidae[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2010,41(2):223-232.
- [13] ZHU S R, FU J J, WANG Q, et al. Identification of *Channa* species using the partial cytochrome c oxidase subunit I (CO I) gene as a DNA barcoding marker[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013,51:117-122.
- [14] BUCKLIN A, WIEBE P H, SMOLENACK S B, et al. DNA barcodes for species identification of euphausiids (euphausiacea, crustacea) [J]. *Journal of Plankton Research*, 2007,29(6):483-493.
- [15] 麦维军, 张吕平, 沈琪, 等. 中国近海 13 种对虾分子系统演化和近似种问题的研究[J]. *安徽农业科学*, 2011,39(18):11122-11126.
- MAI W J, ZHANG L P, SHEN Q, et al. Study on Molecular Evolutionary of 13 Kinds of Penaeidae in the Offshore of China and Allied Species[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011,39(18):11122-11126.
- [16] DONG L, HUANG Z, AI H, et al. Sequence analysis of mitochondrial CO I gene in three Nemipterus species from Beibu Gulf[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013,18(3):508-514.
- [17] 刘敏, 程家骅, 马凌波, 等. 东黄海沙海蜇群体线粒体 CO I 基因序列多态性[J]. *海洋渔业*, 2010,32(3):120-124.
- LIU M, CHENG J Y, MA L B, et al. Polymorphism of mtDNA CO I gene sequence in *Stomolophus meleagris* of Yellow and East China Sea[J]. *Marine Fisheries*, 2010,32(3):120-124.
- [18] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 等. 银鲳 3 个野生群体线粒体 CO I 基因的序列差异分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2009,18(4):398-402.
- PENG S M, SHI Z H, HOU J L, et al. Genetic diversity of three wild populations based silver pomfret (*Pampus argenteus*) on CO I gene sequences[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2009,18(4):398-402.
- [19] 胡文革, 段子渊, 王金富, 等. 新疆 3 种雅罗鱼线粒体 DNA 控制区序列的差异和系统进化关系[J]. *遗传学报*, 2004,31(9):970-975.
- HU W G, DUAN Z Y, WANG J F, et al. Divergence and Systematical Evolution of Three Leuciscus Species in Xinjiang Based on Mitochondrial DNA Control Region Sequences[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2004,31(9):970-975.
- [20] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 两种鲷属鱼类线粒体 CO I 基因片段序列的比较[J]. *上海水产大学学报*, 2006,15(4):403-408.
- ZHANG F Y, MA L B, SHI Z H, et al. Studies on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I fragments of two genera of Sparus fish [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006,15(4):403-408.
- [21] 侯新元, 祝斐, 张丽娟, 等. 基于线粒体 D-loop 基因序列研究我国 5 种虾虎鱼类的系统进化关系[J]. *海洋渔业*, 2013,35(1):1-7.
- HOU X Y, ZHU F, ZHANG L J, et al. Phylogenetic relationships of 5 gobioid species based on sequences of mitochondrial DNA D-loop[J]. *Marine Fisheries*, 2013,35(1):1-7.
- [22] 崔朝霞, 张岷, 宋林峰, 等. 中国重要海洋动物遗传多样性的研究进展[J]. *生物多样性*, 2011,19(6):815-833.
- CUI Z X, ZHANG H, SONG L F, et al. Genetic diversity of marine animals in China: a summary and prospectiveness[J]. *Biodiversity Science*, 2011,19(6):815-833.
- [23] 申欣, 田美, 孟学平. 10 种软骨鱼线粒体基因组特征分析[J]. *渔业科学进展*, 2011,32(3):26-32.
- SHEN X, TIAN M, MENG X P. Analysis of the characteristics of ten cartilaginous fishes mitochondrial genomes[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011,32(3):26-32.
- [24] 陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011(3):13-25.
- CHEN S H, QU Y J, LI J E. Mitochondrial DNA and Its Progresses in Fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(3):13-25.
- [25] 杜民, 尹绍武, 刘艳红, 等. 4 种裸胸鳔的分子遗传多样性

- 和亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 海洋通报, 2013,32(3): 321-327.
- DU M, YIN S W, LIU Y H, et al. RAPD analysis of molecular genetic diversity and genetic relationship of four *Gymnothorax* species[J]. *Marine Science Bulletin*, 2013,32(3):321-327.
- [26] LELIAERT F, SMITH D R, MOREAU H, et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2012,31:1-46.
- [27] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994,3:294-299.
- [28] 焦明超, 赵大显, 欧阳珊, 等. DNA 条形码技术在生物分类学中的应用前景[J]. *湖北农业科学*, 2011,50(5): 886-890.
- JIAO M C, ZHAO D X, OUYANG S, et al. Application Prospect of DNA Barcode Technology in Taxonomy[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011,50(5):886-890.
- [29] AMANDA D R, FELIX A S. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2007,44: 325-345.
- [30] 洪巧巧. 长江口中国花鲈的食性及分子生物学在食性分析上的应用[D]. 上海:华东理工大学, 2012.
- HONG Q Q. Feeding habits of *Lateolabrax maeulatus* in Yangtze River estuary[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012.
- [31] 窦硕增. 鱼类胃含物分析的方法及其应用[J]. *海洋通报*, 1992,11(2):28-31.
- DOU S Z. Method and its application of fish stomach content analysis[J]. *Marine Science Bulletin*, 1992,11(2):28-31.
- [32] 窦硕增. 鱼类摄食生态研究的理论及方法[J]. *海洋与湖沼*, 1996,27(5):556-561.
- DOU S Z. Theory and methods of fish feeding ecology[J]. *Marine Science Bulletin*, 1996,27(5):556-561.
- [33] PETERSON B J. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs; a review[J]. *Acta Oecologica*, 1999,20:479-487.
- [34] 刘学勤. 湖泊底栖动物食物组成与食物网研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 2006.
- LIU X Q. Food composition and food webs of zoobenthos in Yangtze lakes[J]. Wuhan: Institute of Hydrobiology Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [35] MCINTYRE C P, WRESSNIG M A, MCRAE C R. Fish gut content analysis by thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2007,80:6-15.
- [36] RONALD B, BUCKLAND A, MARCUS S. Fish gut content analysis: robust measures of diet composition[J]. *Fish and Fisheries*, 2014,15:170-177.
- [37] 薛莹, 金显仕, 张波, 等. 黄海中部小黄鱼的食物组成和摄食习性的季节变化[J]. *中国水产科学*, 2004,11(3): 237-243.
- XUE Y, JIN X S, ZHANG B, et al. Diet composition and seasonal variation in feeding habits of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* Bleeker in the central Yellow Sea[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004,11(3):237-243.
- [38] 林龙山. 长江口近海小黄鱼食性及营养级分析[J]. *海洋渔业*, 2007,29(1):44-48.
- LIN L S. Study on feeding habit and trophic level of redlip croaker in Yangtze River estuary[J]. *Marine Fisheries*, 2007,29(1):44-48.
- [39] 颜云榕. 北部湾主要鱼类摄食生态及食物关系的研究[D]. 北京:中国科学院研究生院, 2010.
- YAN Y R. Feeding ecology and food relations of the main fishes in the Beibu Gulf, South China Sea[D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2010.
- [40] WURZBERG L, PETERS J, FLORES H, et al. Demersal fishes from the Antarctic shelf and deep sea: A diet study based on fatty acid patterns and gut content analyses[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011,58:2036-2042.
- [41] ALFARO A C. Diet of *Littoraria scabra*, while vertically migrating on mangrove trees: Gut content, fatty acid, and stable isotope analyses[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2008,79:718-726.
- [42] CHELSKY B A, BURFEIND D D, LOH W K, et al. Identification of seagrasses in the gut of a marine herbivorous fish using DNA barcoding and visual inspection techniques[J]. *Journal of Fish Biology*, 2011,79: 112-121.
- [43] LERAY M, YANG J Y, MEYER C P, et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial *CO I* region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents[J]. *Front Zool*, 2013,10:1-14.
- [44] LERAY M, BOEHM J T, MILLS S C, et al. Moorea BIOCODE barcode library as a tool for understanding predator-prey interactions: insights into the diet of common predatory coral reef fishes[J]. *Coral Reefs*, 2012,31:383-388.
- [45] LERAY M, AGUDELO N, MILLS S C, et al. Effectiveness of Annealing Blocking Primers versus Restriction Enzymes for Characterization of Generalist Diets: Unexpected Prey Revealed in the Gut Contents of Two Coral Reef Fish Species[J]. *PLoS One*, 2013,8(4):1-11.
- [46] JO H, GIM J A, JEONG K S, et al. Application of DNA barcoding for identification of freshwater carnivorous fish diets: Is number of prey items dependent on size class for *Micropterus salmoides*[J]. *Ecol Evol*, 2014,4(2):219-229.

- [47] DUNSHEA G. DNA-Based Diet Analysis for Any Predator [J]. *PLoS One*, 2009,4:9.
- [48] MEHRDAD H , GREGORY A C , HEBERT D N . DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics [J]. *TRENDS in Genetics*, 2007,23(4):167 - 172.
- [49] HARDY C M, ADAMS M, JERRY D R, et al. DNA barcoding to support conservation: species identification, genetic structure and biogeography of fishes in the Murray-Darling River Basin, Australia[J]. *Mar Freshw Res*, 2011, 62:887 - 901.
- [50] SCHINDEL D E, MILLER S E. DNA barcoding:a useful tool for taxonomists[J]. *Nature*, 2005,435:17.
- [51] HEBERT P , GREGORY T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. *Systematic Biology*, 2005,54(5): 852 - 859.

Application of DNA barcoding in species analysis of fish stomach content

XI Xiaoqing¹, BAO Baolong², ZHANG Shouyu¹

(1. *College of Marine Science ,Shanghai Ocean University Shanghai,Shanghai 201306,China*;2. *College of Fisheries and Life Science,Shanghai Ocean University , Shanghai 201306,China*)

Abstract: DNA barcoding (a technology to provide rapid, accurate and automated species identifications by using short orthologous DNA sequences) has been fundamentally important in the past few years in system classification , molecular genetic diversity and species relationships of marine organisms as well as evolutionary relationships, and so on. The data set in DNA barcoding is obtained from a single specimen without regard to life stage or morphological characters of targets. Many times foreign scholars elucidated the impact of some predation on prey populations using DNA barcoding, nevertheless, we did less. Herein we introduce DNA barcodes, then discuss the relative merits in relation to the utility of DNA barcoding in identifying prey items of fish diets. The DNA barcoding shows promise in providing a practical, species-level identification tool that can be used for taxonomy and ecological studies, and many more.

Key words: species identification; DNA barcoding; DNA taxonomy; fish diet; feeding ecology