การจำแนกชนิดปลาซิววงศ์ย่อย Rasborinae 12 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Species identification of 12 Rasborine fish using DNA barcode

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์[1,2*], บุษบง ศรีอ่อนคง[3] และ นนทรี ปานพรหมมินทร์[4]

Dutrudi Panprommin[1,2*], Budsabong Srionkong[3] and Nontree Panprommin[4]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase I; COI (ดีเอ็นเอบาร์โค้ด) ในปลาซิววงศ์ย่อย Rasborinae จำนวน 12 ชนิด และปลาซิวข้าวสารซึ่งเป็นปลานอกกลุ่ม จากการศึกษาพบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาทั้ง 13 ชนิดมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 634 คู่เบส และอยู่ในช่วง 591-648 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่า มีปลาซิวจำนวน 4 และ 3 ชนิด ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งหมด พบว่าสามารถแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มของปลาซิวในวงศ์ Cyprinidae วงศ์ย่อย Rasborinae และปลาซิวข้าวสารที่อยู่ในวงศ์ Adrianichthyidae นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งสกุลของปลาซิวในวงศ์ย่อย Rasborinae ได้อย่างชัดเจนอีกด้วย

คำสำคัญ: การจำแนก ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ยีน Cytochrome c oxidase I ปลาซิว

ABSTRACT: The aim of this study is to determine the COI sequences of 12 Rasborine fish and out group species (*Oryzias* sp.). The average of COI sequence length from 13 fish species was 634 bp (ranged from 591-648 bp). The similarity search was found that there are only 4 and 3 species not reported on GenBank and BOLD database, respectively. These sequences of COI gene were increased in the both database. The phylogenetic tree was constructed for analysis the evolution relationship of 13 fish species. The nodes of tree were clearly separated into 2 major branches belonging to Family Cyprinidae and Adrianichthyidae. The results proved that the COI gene (DNA barcode) is an efficiency tool to identify the 12 Rasborine fish.

Keywords: Identification, DNA barcode, Cytochrome c oxidase I, Rasborine fish

[1] สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000
Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

[3] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000
Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

[4] สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ กรมประมง ปทุมธานี 12120
Aquatic Plant and Ornamental Fish Research Institute, Department of Fisheries, PathumThani 12120

* Corresponding author: dutrudeep@yahoo.com

บทนำ

ปลาซิวเป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก พบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย เป็นปลาที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Cyprinidae วงศ์ย่อย Rasborinae (หรือ Danioninae) โดยพบปลาในวงศ์ย่อยนี้ทั่วโลกประมาณ 50 สกุล 300 ชนิด (Tang et al., 2010) พบในประเทศไทย 20 สกุล เนื่องจากปลาในวงศ์ย่อยนี้มีความหลากหลายของชนิดสูง ทำให้มีปัญหาในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์จากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ ไม่สามารถจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน ประกอบกับสภาพแวดล้อมและการดำรงชีวิตที่แตกต่างกันมีผลทำให้ลักษณะภายนอกของปลาเปลี่ยนแปลงไปได้ แม้จะเป็นปลาชนิดเดียวกันก็ตาม หรือถ้าตัวอย่างปลานั้นอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ หรือเป็นไข่ปลา หรือลูกปลาวัยอ่อนก็ทำให้มีปัญหาในการจำแนกชนิดได้เช่นกัน ปัจจุบันนิยมใช้วิธีการทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยเทคนิคที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Hebert et al., 2003) มีลักษณะเป็นแท่งรหัสดีเอ็นเอสายสั้นๆ ของยีนบางชนิด คือ ยีน Cytochrome c oxidase I (COI) ที่อยู่บนไมโตคอนเดรียของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ ทำให้ง่ายต่อการจำแนก ตรวจสอบ ติดตาม และศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีคุณสมบัติเฉพาะตัวในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต ทำให้มีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ นก (Hebert et al., 2004) แมงมุม (Barrett and Hebert, 2005) และผีเสื้อ (Hausmann et al., 2011) เป็นต้น สำหรับในปลาก็มีการศึกษามากมายถึงการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดเช่นกัน ได้แก่ ปลาการ์ตูน (Steinke et al., 2009) ปลากะพงขาว (John et al., 2010) ปลาเศรษฐกิจในแม่น้ำปิง (ประภาส และ ดุจฤดี, 2555) เป็นต้น

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดปลาซิวในวงศ์ย่อย Rasborinae จำนวน 12 ชนิด ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ทำให้สามารถจำแนกชนิดของปลาได้อย่างชัดเจน และยังสามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาได้อีกด้วย โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ถูกรวบรวมเป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในประเทศไทยต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างปลา

ทำการรวบรวมตัวอย่างปลาซิวในวงศ์ย่อย Rasborinae จำนวน 12 ชนิดๆ ละ 1-4 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลาสวยงาม ได้แก่ ปลาซิวเขียว (*Microdevario kubotai*) ปลาซิวหางแดงกระโดงแดง (*Rasbora rubrodorsalis*) ปลาซิวหางดอก (*Rasbora caudimaculata*) ปลาซิวหางกรรไกร (*Rasbora trilineata*) ปลาซิวควายแถบดำ (*Rasbora paviana*) ปลาซิวหนู (*Boraras urophthalmoides*) ปลาซิวเพชรน้อย (*Boraras maculatus*) ปลาซิวสามจุด (*Boraras micros*) ปลาซิวข้างขวานเล็ก (*Trigonostigma espei*) ปลาซิวข้างขวานใหญ่ (*Trigonostigma heteromorpha*) ปลาซิวหนวดยาว (*Esomus metallicus*) และปลาซิวอ้าว (*Luciosoma bleekeri*) โดยใช้ปลาซิวข้าวสาร (*Oryzias* sp.) ที่อยู่ในวงศ์ Adrianichthyidae เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม จากนั้นนำไปแช่ใน Absolute ethanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้

การสกัดดีเอ็นเอจากครีบปลาตัวอย่าง

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากครีบของปลาตัวอย่างด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1% Agarose gel electrophoresis

การเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 18.75 ไมโครลิตร, 10X *Taq* Buffer ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$

ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร, 0.01 mM Primers ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร, 0.05 mM dNTPs ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร, 0.625 U *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการศึกษาของ Ward et al. (2005) **(Table 1)**

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1% Agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยใช้ Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990) และฐานข้อมูล BOLD (http://www.boldsystems.org; Barcode of Life Data System)

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson et al., 1994) และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Genetyx version 5.0 (Genetyx Corp., Japan) วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน COI ได้ในปลาทุกชนิด โดยมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 634 คู่เบส และอยู่ในช่วง 591-648 คู่เบส **(Table 2)** ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงทิศทางเดียวเท่านั้น คือ ทิศทางด้านปลาย 5' ของผลผลิต โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1 และ FishF2 ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ Ward et al. (2005) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านของผลผลิต คือ ทิศทางทั้งด้านปลาย 5' และ 3' โดยใช้ไพรเมอร์ FishF1, FishF2, FishR1 และ FishR2 ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ได้ยีนที่มีความยาวมากกว่า คือ 655 คู่เบส นอกจากนี้ทุกๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่พบตำแหน่งของ stop codon เลย

Table 1 Gene specific primers used for amplification of COI gene

Primer names	Sequences from 5' to 3'
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA

Source: Ward et al. (2005)

Table 2 Summary of COI sequences of 12 Rasborine fish and out group species.

Species	Thai name	Genus	No. of COI sequences	Sequence length (bp)	Accession number
M. kubotai	ปลาซิวเขียว	*Microdevario*	4	636	KC456370-KC456373
R. rubrodorsalis	ปลาซิวหางแดงกระโดงแดง	*Rasbora*	3	630	KC456374-KC456376
R. caudimaculata	ปลาซิวหางดอก	*Rasbora*	2	636	KC456377-KC456378
R. trilineata	ปลาซิวหางกรรไกร	*Rasbora*	1	591	KC456379
R. paviana	ปลาซิวควายแถบดำ	*Rasbora*	4	636	KC456380-KC456383
B. urophthalmoides	ปลาซิวหนู	*Boraras*	4	633	KC456384-KC456387
B. maculatus	ปลาซิวเพชรน้อย	*Boraras*	4	636	KC456388-KC456391
B. micros	ปลาซิวสามจุด	*Boraras*	1	636	KC456392
T. espei	ปลาซิวข้างขวานเล็ก	*Trigonostigma*	2	621	KC456393-KC456394
T. heteromorpha	ปลาซิวข้างขวานใหญ่	*Trigonostigma*	4	636	KC456395-KC456398
E. metallicus	ปลาซิวหนวดยาว	*Esomus*	1	621	KC456399
L. bleekeri	ปลาซิวอ้าว	*Luciosoma*	2	636	KC456400-KC456401
Oryzias sp.	ปลาซิวข้าวสาร	*Oryzias*	4	648	KC456402-KC456405

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลา จำนวน 13 ชนิดกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD โดยพิจารณาจากค่า % similarity **(Table 3)** พบว่า ทั้งในฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลา จำนวน 4 ชนิด กล่าวคือ ในฐานข้อมูล GenBank ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาซิวหางดอก ปลาซิวสามจุด ปลาซิวอ้าว และปลาซิวข้าวสาร ในขณะที่ฐานข้อมูล BOLD ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาซิวหางดอก ปลาซิวหางกรรไกร ปลาซิวสามจุด และปลาซิวข้าวสาร คิดเป็นร้อยละ 30.8 ของจำนวนปลาทั้งหมดที่ทำการศึกษา ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปลาในฐานข้อมูลทั้งสองนี้ได้

การเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในปลาแต่ละชนิด พบว่า มีปลาเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่ไม่มีความแตกต่างกันภายในชนิดเลย คือ ปลาซิวข้างขวานเล็ก ปลาซิวข้างขวานใหญ่ ปลาซิวอ้าว และปลาซิวข้าวสาร ในขณะที่ปลาซิวตาเขียว ปลาซิวหางแดงกระโดงแดง ปลาซิวหางดอก ปลาซิวควายแถบดำ ปลาซิวหนู และปลาซิวเพชรน้อย มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 1, 2, 1, 15, 2 และ 2 คู่เบส ตามลำดับ ทำให้ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในปลาแต่ละชนิดเท่ากับ 99.8, 99.7, 99.8, 97.6, 99.7 และ 99.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับในปลาซิวหางกรรไกร ปลาซิวสามจุด และปลาซิวหนวดยาวไม่สามารถศึกษาความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในชนิดได้ เนื่องจากปลาทั้งสามชนิดนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 เส้น เท่านั้น

Table 3 COI identification using GenBank and BOLD database (Search on 15 December 2012)

Accession no.	Species	Species identification (%Similarity)	
		GenBank	BOLD
KC456370	*M. kubotai*	*Microrasbora kubotai* (100%)	*Microdevario kubotai* (100%)
KC456374	*R. rubrodorsalis*	*Rasbora rubrodorsalis* (99%)	*Rasbora rubrodorsalis* (99.68%)
KC456377	*R. caudimaculata*	*Rasbora vulgaris* (94%)	-
KC456379	*R. trilineata*	*Rasbora trilineata* (95%)	-
KC456380	*R. paviana*	*Rasbora cf. paviana* (99%)	*Rasbora paviana* (98.96%)
KC456385	*B. urophthalmoides*	*Boraras urophthalmoides* (98%)	*Boraras urophthalmoides* (100%)
KC456388	*B. maculatus*	*Boraras maculatus* (99%)	*Boraras maculatus* (99.84%)
KC456392	*B. micros*	-	-
KC456393	*T. espei*	*Trigonostigma espei* (100%)	*Trigonostigma espei* (100%)
KC456395	*T. heteromorpha*	*Trigonostigma heteromorpha* (100%)	*Trigonostigma cf. heteromorpha* (99.84%)
KC456399	*E. metallicus*	*Esomus metallicus* (100%)	*Esomus metallicus* (100%)
KC456400	*L. bleekeri*	*Luciosoma setigerum* (88%)	*Luciosoma bleekeri* (98.74%)
KC456402	*Oryzias* sp.	*Halichoeres leucurus* (84%)	-

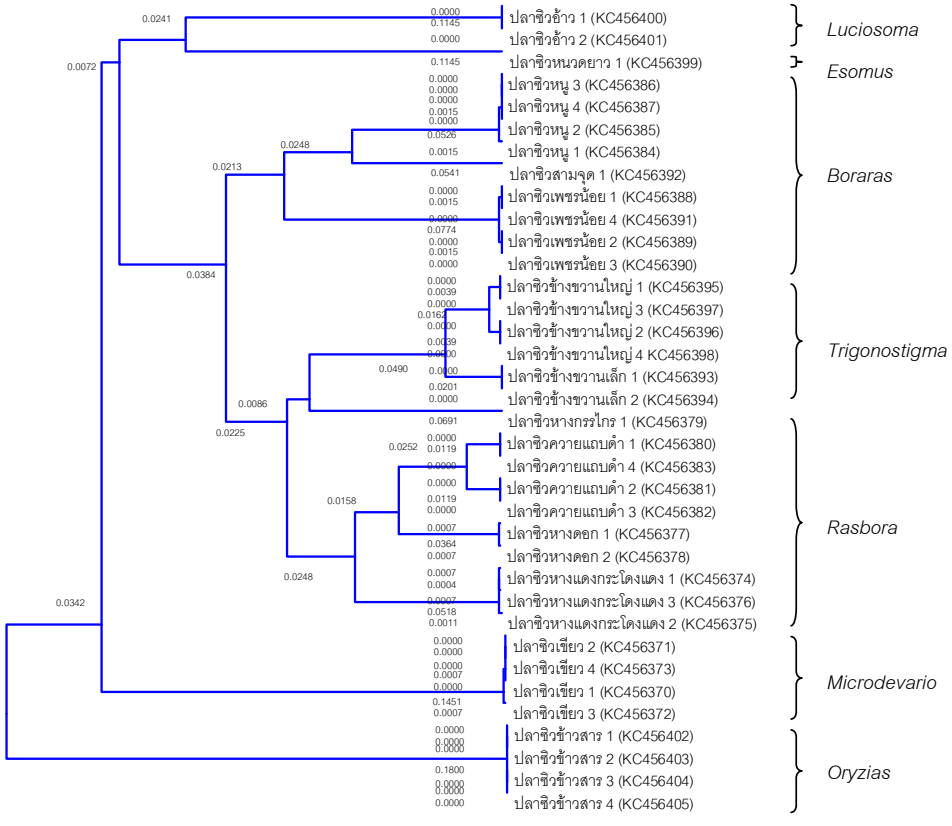

Figure 1 Phylogenetic tree of COI sequences from 12 Rasborine fish. *Oryzias* sp. used as an out group species.

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI จากปลาซิวข้าวสารเป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม พบว่า สามารถแยกปลาซิวในวงศ์ย่อย Rasborinae ออกจากปลาซิวข้าวสาร (*Oryzias* sp.) ที่อยู่ในวงศ์ Adrianichthyidae ได้อย่างชัดเจน **(Figure 1)** นอกจากนี้ยังสามารถแยกสกุลของปลาในวงศ์ย่อย Rasborinae ได้อีกด้วย คือ สกุล *Luciosoma* (ปลาซิวอ้าว), *Esomus* (ปลาซิวหนวดยาว), *Boraras* (ปลาซิวหนู, ปลาซิวสามจุด และปลาซิวเพชรน้อย), *Trigonostigma* (ปลาซิวข้างขวานใหญ่ และปลาซิวข้างขวานเล็ก), *Rasbora* (ปลาซิวหางกรรไกร ปลาซิวควายแถบดำ ปลาซิวหางดอก และปลาซิวหางแดงกระโดงแดง) และ *Microdevario* (ปลาซิวเขียว) โดยสอดคล้องกับการจำแนกปลาตามระบบอนุกรมวิธานของ Nelson, 2006 และ Rainboth, 1996 และสอดคล้องกับการศึกษา Phylogenetic tree ของ Mabee et al., 2007, Mayden et al., 2007 และ Mayden et al., 2009

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเห็นได้ว่า ปลาซิวในสกุล *Boraras*, *Trigonostigma* และ *Rasbora* มีความใกล้ชิดกันมาก เนื่องจากปลาซิวในสกุล *Rasbora* มีความหลากหลายของชนิดสูง ประมาณ 70 ชนิด (Tang et al., 2010) โดยสกุล *Boraras* และ *Trigonostigma* ถูกแยกออกมาจากสกุล *Rasbora* นั่นเอง (Tang et al., 2010) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Mabee et al. (2007) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาในวงศ์ Cyprinidae โดยใช้ยีนจากนิวเคลียสและไมโตคอนเดรียร่วมกัน

สรุป

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดของปลาซิววงศ์ย่อย Rasborinae และสามารถแยกความแตกต่างของปลาแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะถูกรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาในประเทศไทยต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประภาส ยมเกิด และดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2555. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาเศรษฐกิจ 5 ชนิดในแม่น้ำปิง จังหวัดตาก. น. 162. ใน การประชุมพะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 12-13 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Barrett, R.D.H., and P.D.N. Hebert. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. NRC Canada. 83:481-491.

Hausmann, A., G. Haszprunar, A.H. Segerer, W. Speidel, G. Behounek, and P.D.N. Hebert. 2011. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). Spixiana 34(1):47-58.

Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270:313-321.

Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak, and C.M. Francis. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology 2(10):1657-1663.

John, A., C. Prasannakuma, P.S. Lyla, S.A. Khan, and K.C.A. Jalal. 2010. DNA barcoding of *Lates calcarifer* (Bloch, 1970). Medwell Journais. 5(6):414-419.

Mabee, P.M., G. Arratia, M. Coburn, M. Haendel, E.J. Hilton, J.G. Lundberg, R.L. Mayden, N. Rios, and M. Westerfield. 2007. Connecting evolutionary morphology to genomics using ontologies: A case study from Cypriniformes including zebrafish. J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.) 308B:655-668.

Mayden, R.L., K.L. Tang, K.W. Conway, J.R. Freyhof, S. Chamberlain, M. Haskins, L. Schneider, M. Sudkamp, R.M. Wood, M. Agnew, A. Bufalino, Z. Sulaiman, M. Miya, K. Saitoh, and S. He. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: A framework for comparative and evolutionary studies of a model species. J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.) 308B:642-654.

Mayden, R.L., W.-J. Chen, H.L. Bart, M.H. Doosey, A.M. Simons, K.L. Tang, R.M. Wood, M.K. Agnew, L. Yang, M.V. Hirt, M.D. Clements, K. Saitoh, T. Sado, M. Miya, and M. Nishida. 2009. Reconstructing the phylogenetic relationships of the earth's most diverse clade of freshwater fishes-order Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): A case study using multiple nuclear loci and the mitochondrial genome. Molecular Phylogenetics and Evolution 51:500-514.

Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 601 p.

Rainboth, W.J. 1996. FAO species identification field guide for fishery purposes. Fishes of the Cambodian Mekong. Rome, FAO. 265 p.

Steinke, D., S.Z. Tyler, and P.D.N. Hebert. 2009. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. Plos one 4(7):1-5.

Tang, K.L., M.K. Agnew, M.V. Hirt, T. Sado, L.M. Schneider, J. Freyhof, Z. Sulaiman, E. Swartz, C. Vidthayanon, M. Miya, K. Saitoh, A.M. Simons, R.M. Wood, and R.L. Mayden. 2010. Systematics of the subfamily Danioninae (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 57:189-214.

Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last, and P.D.N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B.:1-11.