

基于线粒体 *CO1* 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用

彭居俐^{1,2} 王绪祯¹ 王 丁¹ 何舜平¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:本研究探讨了线粒体 *CO1* 基因作为 DNA 条形码对鲃属鱼类进行物种鉴定的可行性。研究中获得了鲃属 4 种鱼类共 32 个个体长度为 816bp 的 *CO1* 基因序列。利用 MEGA 软件计算鲃属鱼类种间及种内遗传距离, 利用邻接法、最大简约法、最大似然法和 Bayesian 方法分别构建分子系统树。结果显示, 鲃属鱼类的种间遗传距离显著大于种内遗传距离。在系统树中, 鲃属鱼类每一物种的个体分别形成各自独立的分支。基于 *CO1* 基因的 DNA 条形码在识别鲃属鱼类物种方面和传统形态学基本一致, 而且该基因可以探讨鲃属鱼类种间的系统发育关系。本研究表明以 *CO1* 基因作为鲃属鱼类 DNA 条形码进行物种鉴定具有一定的可行性。

关键词: DNA 条形码; *CO1* 基因; 鲃属; 物种鉴定

中图分类号: Q349⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)02-0271-06

鲃属 (*Culter*) 隶属于鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Cultrinae), 是东亚特有鲤科鱼类的一个重要组成部分。该属广泛分布于中国、越南、朝鲜和俄罗斯, 在我国除青藏高原外, 其他各地均有分布^[1]。该属大部分物种都是重要的经济鱼类。

DNA 条形码 (DNA Barcoding) 通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析从而对相关物种进行鉴定。作为一种新的物种鉴定手段, DNA 条形码由于其快速简便的操作过程而能够广泛地进行科学应用, 尤其是在保护生物学和生物多样性调查等领域^[2]。用于 DNA 条形码研究的标准基因, 一方面应该足够保守, 能够利用通用引物进行大范围的扩增; 另一方面应该有足够的变异来区分不同物种 DNA 序列, 从而进行鉴定。因此, 在鉴定不同物种时需要选择有效的目的基因^[3]。Hebert, *et al.* 对动物界 11 个门 13320 个物种的研究结果显示, 线粒体 *CO1* 基因 (细胞色素氧化酶亚基 1) 靠近 5' 端的一段序列能够对动物界的物种进行有效的鉴定, 并且在多数动物类群中, *CO1* 基因都存在显著的序列变异^[4]。目前, 对动物界物种进行 DNA 条形码研究所通常选择

的基因就是 *CO1* 基因。但现在还没有利用线粒体 *CO1* 基因作为鲤科鱼类 DNA 条形码进行物种鉴定的相关研究报道。

东亚特有鲤科鱼类是在青藏高原隆起过程中, 在东亚季风条件下经历了爆发式的物种形成, 然后迅速在东亚地区扩散开来^[5]。这些种类是在短时间内经历了显著的物种辐射后形成的, 例如它们的 16S rRNA 基因、*rpS7* 基因和 *RAG2* 基因的 DNA 序列具有高度的相似性^[6,7]。鲃属是东亚特有鲤科鱼类中较为重要的一个类群, 经历了相同的短时间物种爆发过程。作为一群快速分化的物种, 其基因序列的变异度相对较小。基因变异度是物种 DNA 条形码研究的关键。在鲃属这类快速进化物种中, *CO1* 基因序列能否作为 DNA 条形码研究的标准基因进行有效的物种鉴定有待于进一步的探讨。

本研究通过对鲃属 4 种 32 个个体的线粒体 *CO1* 基因序列进行对比分析, 研究 *CO1* 基因在鲃属鱼类种间及种内的序列变异, 构建分子系统树, 进而检验 *CO1* 基因序列作为鲃属鱼类 DNA 条形码的标准基因进行物种鉴别的有效性。

收稿日期: 2007-03-22; 修订日期: 2008-06-15

基金项目: 自然科学基金项目 (批准号: 30300036, 30225008 和 30530120) 资助

作者简介: 彭居俐 (1981—), 女, 湖北省崇阳县人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类分子进化

通讯作者: 何舜平, E-mail: clad@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 样品采集 本研究涵盖了中国鲌亚科鲌属的 4 个种,共 32 个体。所分析物种的采集地、标本号和 GenBank 序列号(表 1)。选用鲫(*Carassius caras-*

sius)和鲤(*Cyprinus carpio*)作为外类群。所有鱼类标本及其组织均固定和保存在 95% 的酒精中,标本的存放和鉴定工作都在中国科学院水生生物研究所内进行。

表 1 研究材料的标本名录及相关信息

Tab. 1 Species, catalog numbers, and collecting sites of samples in this study

物种名称 Species	拉丁名 Latin name	实验编号 ID	标本编号 Catalog No.	采集地 Collecting site	GenBank 序列号 GenBank No.
翘嘴鲌	<i>Culter alburnus</i>	HJ01	2603010	黑龙江佳木斯	EF467604
		HS01	2603102	哈尔滨松花江	EF467607
		JX01	2603056	江西鄱阳湖	EF467596
		JX02	2603060	江西鄱阳湖	EF467600
		JX03	2603073	江西鄱阳湖	EF467601
		HN01	2603090	湖南洞庭湖	EF467599
		HN02	2603091	湖南洞庭湖	EF467598
		HN03	2603092	湖南洞庭湖	EF467605
		HN04	2603046	湖南桃源	EF467617
		HB01	2603093	湖北黄梅	EF467597
		HB02	2603094	湖北黄梅	EF467606
		HB03	2603095	湖北黄梅	EF467603
		HB04	2603096	湖北黄梅	EF467602
		HB05	2603097	湖北黄梅	EF467608
		达氏鲌	<i>Culter dabryi</i>	SC01	2603017
SC02	2603019			四川泸州	EF467625
JX04	2603055			江西鄱阳湖	EF467622
JX05	2603059			江西鄱阳湖	EF467594
JX06	2603075			江西鄱阳湖	EF467618
JX07	2603076			江西鄱阳湖	EF467620
HB06	2603077			武汉金口	EF467621
HB07	2603078			武汉金口	EF467619
HB08	2603098			湖北黄梅	EF467595
蒙古鲌	<i>Culter mongolicus</i>	HN05	2603039	湖南桃源	EF467613
		HN06	2603048	湖南桃源	EF467615
		HN07	2603052	湖南桃源	EF467614
		HN08	2603089	湖南洞庭湖	EF467611
		JX08	2603057	江西鄱阳湖	EF467610
		JX09	2603058	江西鄱阳湖	EF467616
		JX10	2603074	江西鄱阳湖	EF467612
		HN09	2603047	湖南桃源	EF467609
拟尖头鲌	<i>Culter oxyrphsloides</i>	HN09	2603047	湖南桃源	EF467609
鲫鱼*	<i>Carassius carassius</i>	OUT2			NC006291
鲤鱼*	<i>Cyprinus carpio</i>	OUT1			NC001606

* 表示从 Genbank 中下载的序列

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定 取鱼背部肌肉 50mg 用蒸馏水、TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液浸泡直至将组织中的酒精去净。加入 600 μ L SET (0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液、12 μ L 蛋白酶 K (10 μ g/ μ L) 和 60 μ L 10% SDS 消化, 56 $^{\circ}$ C 恒温作用直至消化完全。平衡酚、氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 50 μ L TE 缓冲液溶解, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

PCR 扩增的目的片段是 CO1 基因靠近 5' 末端的长度为 820bp 左右的序列。其扩增和测序引物均为 L5956-CO1 (5'-CAC AAA GAC ATT GGC ACC CT-3') 和 H6855-CO1 (5'-AGT CAG CTG AAK ACT TTT AC-3')^[8]。PCR 反应使用大约 100ng 基因组 DNA 作为模板, 每一样品的扩增体积为 50 μ L, 其中 10 \times 缓冲液 5 μ L, dNTPs 2 μ L (各 2.5mmol/L), 引物各 1 μ L, *Taq* 酶 2.0U。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 56—62 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照。扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测后由上海基康公司完成测序工作。

1.3 数据分析方法 利用 Clustal X^[9] 和 Sea-view^[10] 程序对序列进行排序并辅以手工校正; 使用 MEGA3.0^[11] 计算所得序列的碱基组成、序列间的碱基变异频率和序列间的转换颠换频率及其比率。分子系统树的构建采用邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML) 和 Bayesian 方法。其中, NJ、MP 和 ML 方法是在 PAUP4.0b10^[12] 中运行的。

最大简约法分析使用启发式搜索, 参数设置如下: 1000 random stepwise addition sequence replicate。构树方法采用二等分再连接 (Tree-bisection reconnection, TBR), 所有数据均未加权, 获得 50% 一致性的树, 可靠性由 1000 次自展分支检验。邻接法分析采用 HKY85 遗传距离, 进行 1000 次自展分支检验。最大似然法选择启发式搜索 (Heuristic searches), 树

二等分支再连接。替代模型的选择采用 Modeltest3.06^[13] 程序进行分析, 按 hLRTs 标准, 最适合的替代模型为 HKY + G。采用自展分析方法, 进行 100 次重复, 估计支持率。

Bayesian 分析运用 MrBayes3.0b 软件^[14], 采用 HKY + G 模型, 马可夫蒙特卡洛 (MCMC) 参数如下: number of generations (代数) = 1000000, number of chains = 4, sample frequency = 20, temperate = 0.5, starting tree = random。Burn-in 设定在 20000 generations (burn-in = 1000)。

2 结 果

2.1 CO1 基因序列特征及其变异

通过 PCR 扩增, 获得鲌属翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)、达氏鲌 (*Culter dabryi*)、蒙古鲌 (*Culter mongolicus*) 和拟尖头鲌 (*Culter oxycephaloides*), 共 32 个体以及外类群的线粒体 CO1 基因部分序列。本研究中, 所获得序列是 CO1 基因 5' 端的一段长度为 816bp 的片段, 编码 272 个氨基酸, 没有任何碱基的插入、缺失。在 816 个排列位点中, 变异位点 241 个, 约占 30%; 简约信息位点 171 个, 约占 20%; 不变位点 575 个。A、T、C、G 碱基平均含量分别为 26.1%、28.4%、27.1%、18.5%, 其中 A + T 含量 (54.4%) 明显高于 G + C 含量 (45.6%), 核苷酸碱基构成的偏倚是线粒体蛋白质编码基因的一个显著特征。

表 2 显示, 蒙古鲌的 G + C 含量 (46.5%) 大于所有个体的平均 G + C 含量 (45.6%), 这种差异的产生主要是由于第三密码子位点 G + C 含量的差异 (蒙古鲌 43.5%, 平均 42.3%) 引起, 其次是第二密码子位点的差异 (蒙古鲌 43.9%, 平均 42.8%), 影响最小的是第一密码子位点 (蒙古鲌 52.0%, 平均 51.6%)。对所有物种而言, 第一密码子位点的 G + C 含量最高, 其次是第二密码子位点的含量, 最低的是第三密码子位点 G + C 含量。所有个体的序列变异位点 (表 3), 约 93% 的碱基替换发生在第三密码子位点。

表 2 鲇属 4 种鱼类共 32 个体不同密码子位点的 GC 含量及其所有位点的平均 GC 含量

Tab. 2 The GC content for species of genus *Culter* in all position and each codon position

Taxa	Number	平均 GC 含量 Average GC content (%)			
		全部位点 All positions	1 st 位点 1 st codon	2 nd 位点 2 nd codon	3 rd 位点 3 rd codon
翘嘴鲇	14	45.5	51.6	42.7	42.0
达氏鲇	10	45.0	51.3	42.0	41.7
蒙古鲇	7	46.5	52.0	43.9	43.5
拟尖头鲇	1	45.8	51.3	42.7	42.4
所有个体	32	45.6	51.6	42.8	42.3

表 3 对鲇属 4 物种 32 个体以及外类群的 CO1 序列各密码子位点的碱基变异情况

Tab. 3 Sequences variation of the MtDNA CO1 gene of the *Culter* and outgroup taxa analyzed

	不变位点(个) Invariable sites	转换位点(个) Transition sites	颠换位点(个) Transversion sites
1 st 位点	269	3	0
2 nd 位点	272	0	0
3 rd 位点	229	35	8
全部位点	770	38	8

种间和种内遗传距离的大小是进行物种鉴别的主要标准。在我们研究的鲇属 4 个物种中,蒙古鲇的种内遗传距离最大为 0.37%,发生在湖南桃源地理种群内以及湖南桃源—鄱阳湖地理种群间,平均遗传差异为 0.20%;翘嘴鲇种内序列差异最大,为 0.62%,在鄱阳湖地理种群内发生,也在鄱阳湖—湖南桃源、鄱阳湖—湖北黄梅等的地理种群间出现,平均遗传距离 0.14%;达

氏鲇种内遗传距离范围是 0.00%—0.37%,平均遗传差异为 0.13%。4 种鲇属鱼类的种内遗传距离均小于 0.7%,显著低于 Hebert 所推荐的物种鉴定最小种间遗传距离 2%。4 种鲇属鱼类两两比对的种间平均遗传距离(表 4)都大于 Hebert 设定的 2% 的遗传差异,最小的种间距离是拟尖头鲇和蒙古鲇(2.49%),最大的种间差异发生在拟尖头鲇和达氏鲇(5.00%)。

表 4 鲇属 4 个物种两两比对的种间平均遗传距离和种内遗传距离

Tab. 4 Genetic distance within each species and pairwise distance between species in *Culter*

	达氏鲇 <i>Culter dabryi</i>	蒙古鲇 <i>Culter mongolicus</i>	翘嘴鲇 <i>Culter alburnus</i>	种内遗传距离 Distance within species
达氏鲇				0.13%
蒙古鲇	4.58%			0.20%
翘嘴鲇	3.46%	3.17%		0.14%
拟尖头鲇	5.00%	2.49%	4.07%	—

2.2 分子系统树

利用本研究获得的 CO1 基因序列,构建鲇属鱼类的分子系统发育树。基于 HKY85 遗传距离进行 1000 次自展检验构建的 50% 多数一致性 NJ 树(图 1)。蒙古鲇的所有 7 个体形成一个单系,节点支持率是 100%。达氏鲇共 10 个体以及翘嘴鲇共 14 个

体各自形成单系,均具有很高的节点支持率(100% 和 99%),并且达氏鲇和翘嘴鲇互为姐妹群,其支持率为 64%。蒙古鲇共 7 个体形成支持率为 100% 的单系,拟尖头鲇与蒙古鲇形成的姐妹群具 97% 的支持率,位于系统树的基部。同时蒙古鲇与拟尖头鲇、翘嘴鲇与达氏鲇互为姐妹群并构成单系(支持率 100%)。

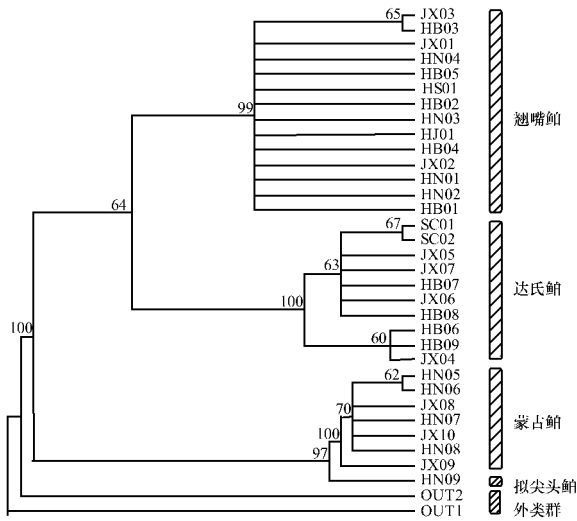


图1 利用 CO1 序列基于 HKY85 距离构建的 50% 多数一致性 NJ 树

Fig. 1 50% majority-rule consensus of the 1000 bootstrap major-joining trees resulting from analysis of the MtDNA CO1 gene data using the HKY85 model

通过自展分析各节点支持率标识在节点上方;翘嘴鲌、达氏鲌和蒙古鲌都形成高支持率的单系,拟尖头鲌仅一个体与蒙古鲌支系形成姐妹群,位于系统树的基部

Numbers of the nodes represent bootstrap values with 1000 replications. *Culter dabryi*, *Culter alburnus* and *Culter mongolicus* form three strong monophyly separately. *Culter mongolicus* is the sister group of *Culter oxycephaloides*, and the clade of two species stood as the basal clade

Bayesian 法构建的 50% 多数一致树以及最大简约法构建的 50% 多数一致树与邻接树具有相似的拓扑结构,翘嘴鲌、达世鲌、蒙古鲌和拟尖头鲌都形成单系,并且具有较高的节点支持率。最大简约树中 4 个物种形成的是多歧分支。

3 讨论

本研究通过对鲌属 4 物种 32 个体的 CO1 序列分析,发现这个类群中 CO1 序列能够很好的区分各物种,对鲌属物种而言是一个有效的 DNA 条形码序列。

本研究中,鲌属鱼类的 CO1 基因序列 G + C 含量平均为 45.6%。Ward, *et al.* 对澳大利亚鱼类 CO1 基因序列研究中得出软骨鱼类的 G + C 含量平均为 42.2%,并且硬骨鱼类的平均 G + C 含量高于软骨鱼类的平均 G + C 含量^[15]。Saccone, *et al.* 对 9 种硬骨鱼和 3 种软骨鱼的线粒体基因组全序列进行分析^[16],结果同样支持硬骨鱼类的平均 G + C 含量显著高于软骨鱼类。本研究鲌属鱼类的平均 G + C 含量

(45.6%) 高于 Ward 和 Saccone, *et al.* 得出的软骨鱼类的平均 G + C 含量,与 Ward, *et al.* 和 Saccone, *et al.* 的研究结果一致。蒙古鲌的 G + C 含量(46.5%) 大于所有个体的平均 G + C 含量(45.6%) 主要是由第三密码子位点的 G + C 含量高于平均水平。

Hebert, *et al.* 提出利用 CO1 序列有效地进行物种鉴别的关键点是种间的遗传距离必须大于种内的遗传距离,并且距离差异大约为 10 倍^[17]。另外 Hebert, *et al.* 对动物界 11 个动物门 13320 个物种进行分析得出物种内的遗传距离很少有大于 2% 的,大部分的种内距离是小于 1%。本研究中,翘嘴鲌、蒙古鲌和达氏鲌最大的种内遗传距离分别为 0.62%、0.37% 和 0.37%,均显著小于 1%,与 Hebert 得到的结论一致。种间平均遗传距离远远大于种内平均遗传距离(表 3),大约为 15—20 倍,此结果同样与 Hebert, *et al.* 的结论相吻合。由于较大的种间序列差异是对物种进行准确鉴定的先决条件。鲌属物种 CO1 序列的种间遗传距离显著高于种内遗传距离,说明 CO1 序列能够对鲌属物种进行有效的物种鉴定。

分子系统树显示,翘嘴鲌、达世鲌、蒙古鲌和拟尖头鲌各自的所有个体都形成单系。综上所述,本研究结果表明 CO1 基因不但可以用于鲌属鱼类物种间系统发育关系的探讨,同时也为探讨以 CO1 基因作为 DNA 条形码对鲌属鱼类进行物种识别的可行性,提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] Chen Y Y. Fauna Sinica. Osteichthyes, Cypriniformes II [M]. Beijing: Sciences Press. 1998 [陈宜瑜. 中国动物志. 硬骨鱼纲, 鲤形目. 中卷. 北京: 科学出版社. 1998]
- [2] Witt J D S, Therloff D L, Hebert P D N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation [J]. *Mol Ecol*, 2006, **15**: 3073—3082
- [3] Savolainen V, Cowan R S, Vogler A P, *et al.* Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding [J]. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2005, **360**: 1805—1811
- [4] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, **270**: 96—99
- [5] He S P, Liu H, Chen Y Y, *et al.* Molecular phylogenetic relationships of Eastern Asian Cyprinidae (Pisces: Cypriniformes) inferred from cytochrome b sequences [J]. *Science in China*, 2004, **47**: 130—138
- [6] Wang X Z. Molecular phylogeny of Eastern Asian cyprinids (Pis-

- ces; Cypriniformes) [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2005 [王绪楨. 东亚鲤科鱼类的分子系统发育研究. 博士学位论文. 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2005]
- [7] Kong X H, He S P. Progress on species-characteristics size control in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (5): 614—620 [孔祥会, 何舜平. 鱼类物种特征尺寸控制因素研究进展. 水生生物学报, 2006, **30**(5): 614—620]
- [8] Miya M, Nishida M. Use of mitochondrial information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, **17**: 437—455
- [9] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [10] Galtier N, Gouy M, Gautier C, *et al.* Seaview and Phylo-Win: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny [J]. *Comput Appl Biosci*, 1996, **12**: 543—548
- [11] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150—163
- [12] Swofford D L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4.0b10 [M]. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts. 1998—2001
- [13] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Bioinformatics*, 1998, **14**(9): 817—818
- [14] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 754—755
- [15] 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
- [16] Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, *et al.* Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system [J]. *Gene*, 1999, **238**: 195—209
- [17] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identification through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, **270**: 313—321

APPLICATION OF DNA BARCODING BASED ON THE MITOCHONDRIAL *CO1* GENE SEQUENCES IN CLASSIFICATION OF *CULTER* (PISCES: CYPRINIDAE)

PENG Ju-Li^{1,2}, WANG Xu-Zhen¹, WANG Ding¹ and HE Shun-Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: DNA Barcoding is becoming more and more attractive to biologists as a new method for species identification. The core idea of DNA barcoding is based on the fact that species can be differentiated by short pieces of standard gene sequences. It is very important to choose appropriate genetic marker for species identification. Mitochondrial *CO1* gene sequence was a popular marker of DNA barcoding for species identification in the kingdom of animals. In this paper, we discussed the validation of *CO1* gene sequence to efficiently identify the species of genus *Culter*. Original nucleotide sequence data of partial mitochondrial *CO1* gene, about 816 base pairs, were collected from 4 species of *Culter* and totally 32 specimens. Sequences analysis was conducted by using MEGA3.1. Genetic variation among species and variation within species were calculated, and it was found that pairwise genetic distance among 4 species was more than 2%, and obviously higher than the distance within a species. Phylogenetic analysis was carried out with different methods, including neighbor-joining, maximum parsimony, maximum likelihood and bayesian analysis. The topology of each final trees revealed that all individuals of each species formed a strong monophyletic group. Specie identification with *CO1* sequences in *Culter* supported the taxonomy based on morphological characters, and it was proposed that *CO1* sequences could be a probable marker to resolve the phylogenetic relationship of the genus. The conclusion of our research suggested that mitochondrial *CO1* gene was a valid DNA barcoding gene for specie identification in genus *Culter*.

Key words: DNA Barcoding; *CO1* sequence; *Culter*; Species identification