

基于5.8S rDNA-ITS序列的我国浙江沿海铜藻群体遗传多样性分析

蔡一凡^{1a,1b,2,3}, 张鹏^{2,3}, 王铁杆^{2,3}, 陈少波^{1a,1b,2,3}, 谢起浪^{1a,1b,2,3*}

(1. 温州医学院, a. 生命科学学院; b. 海洋科学研究所, 浙江 温州 325035; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005; 3. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

摘要: 为了调查我国浙江沿海铜藻(*Sargassum horneri*)群体遗传多样性,对浙江省南麂岛火焜岙、洞头岛、枸杞岛的野生群体和南麂岛马祖岙养殖群体的铜藻 44 个样品的 5.8S rDNA-ITS 序列进行了 PCR 扩增和序列分析,获得 DNA 片段长度为 1485 bp,包括部分 ITS1、完整的 5.8S rDNA 和部分 ITS2 序列。序列分析表明仅有 1 个变异位点,说明群体间没有明显的遗传分化,遗传多样性较低。另外,将包含这一变异位点的基因型与 GenBank 公共数据库中另外 2 株铜藻的 5.8S rDNA-ITS 区序列进行比对,共有 31 个变异位点,其中插入/缺失位点 10 个。因此,建议加快人工铜藻场的建设以及野生铜藻场的恢复,保持铜藻场的生态平衡。

关键词: 铜藻; 5.8S rDNA-ITS; 遗传多样性; 浙江沿海

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.02.008

Genetic Analysis Based on 5.8S rDNA-ITS Sequence of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh in the Coastal Areas of Zhejiang Province, China

CAI Yi-fan^{1a,1b,2,3}, ZHANG Peng^{2,3}, WANG Tie-gan^{2,3}, CHEN Shao-bo^{1a,1b,2,3}, XIE Qi-lang^{1a,1b,2,3*}

(1a. School of Life Science; 1b. Institute of Marine Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China)

Abstract: The purpose was to investigate genetic diversity of *Sargassum horneri* populations in the coastal areas of Zhejiang Province, China. The 5.8S rDNA-ITS sequences from 44 individuals of *S. horneri* were amplified by PCR and analyzed, including wild populations from Huokun'ao of Nanji Island, Dongtou Island and Gouqi Island and Mazhao cultured population from Nanji Island in Zhejiang Province. The whole-length of sequence from all individuals was 1485 bp, including partial ITS1, ITS2 sequences, and complete 5.8S rDNA sequence. Among them, there was only one variable nucleotide site. It was suggested that there was no distinct genetic differentiation among populations with relatively low genetic diversity. In addition, 5.8S rDNA-ITS sequences from two haplotypes with the only one variable nucleotide site and another two sequences from GenBank public database were aligned, 31 variable nucleotide sites were detected, and 10 of them were insert or delete sites. Therefore, it was proposed to speed up the construction of artificial *S. horneri* field and restore wild *S. horneri* field in order to maintain an ecological balance.

Key words: *Sargassum horneri*; 5.8S rDNA-ITS; Genetic diversity; Coastal areas of Zhejiang Province

收稿日期: 2012-08-17

接受日期: 2012-11-15

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项经费项目(201105008);浙江省海洋与渔业项目;浙江省省属科研院所扶持专项计划项目(2012F20028) 资助

作者简介: 蔡一凡,男,硕士,主要从事铜藻分子遗传学研究。E-mail: tsaievan@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xie_qi2002@163.com

铜藻(*Sargassum horneri*)隶属于褐藻门(Phaeophyta)墨角藻目(Fucales)马尾藻属,为北太平洋特有的暖温带性海藻,在我国沿海呈不连续分布。铜藻多生长在低潮带深沼中或大干潮线下深至4 m处的岩石上^[1],藻株高大、分枝繁茂,成片漂浮在水面,被称为“海中森林”,形成的铜藻场中栖息生活着多种门类的海洋动物,为其提供了避敌、索饵、产卵的场所,因而又被称为“生态渔礁”。同时,铜藻还被广泛应用于海藻工业、医药、食品、饲料和有机肥料方面,具有较高的商业价值。然而近几年来,由于全球气候变化、海洋环境污染、人为干扰等因素,铜藻海藻场不断退化,因此,人工铜藻场的建设以及野生铜藻场的恢复就显得尤为重要^[2-4]。

目前,国内外对于铜藻的研究主要集中在资源调查^[1]、形态学^[1-2,4]、生活史^[5-8]、生态学^[5,9]、人工增殖^[2-4,10]和繁殖生物学^[2,10-12]等方面。Oak等^[13]在利用分子生物学技术研究马尾藻属不同物种之间的系统发育关系时涉及到了铜藻,但未对其进行深入的、有针对性的研究;Uwai等根据线粒体COX III单倍型研究了*S. horneri* / *filicinum*复合体的地理遗传结构^[14]。然而,国内利用DNA分子标记技术分析铜藻遗传变异和分化的研究较少,仅见Hu等^[15]利用铜藻线粒体COX III基因序列和叶绿体*rbcL*基因序列研究了铜藻不同地理居群间的遗传交流、影响因素及其系统发育关系。

真核生物中的核糖体 rRNA 基因以 18S rRNA

基因、5.8S rRNA 基因和 26S rRNA 基因的顺序组成一个转录单元,彼此被内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分开, ITS 区作为非编码区,承受的进化选择压力相对较小,进化速率相对较快^[16-18],且由于协同进化作用,使得同一基因组中 ITS 区序列的不同拷贝间趋向一致,这给 PCR 扩增和测序带来了便利,因而被广泛应用于多种细菌、藻类、动植物种间甚至种下水平的系统发育研究^[13,18-22]。

本研究以采自浙江省南麂岛火焜岙、洞头岛、枸杞岛的铜藻野生居群和南麂岛马祖岙养殖铜藻居群为材料,对其 5.8S rDNA-ITS 区进行了扩增、测序和分析,并与 GenBank 数据库中的 2 株铜藻 *S. horneri* (A)、*S. horneri* (B) 的 5.8S rDNA-ITS 区序列进行比较,分析铜藻资源的遗传背景、不同地理居群的亲缘关系,从 DNA 分子水平上探讨漂浮型铜藻和其它野生铜藻之间的关系,以期对铜藻遗传多样性保护和铜藻场生态修复活动提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料采集和处理

铜藻(*Sargassum horneri*)样品采集地点分别为浙江省南麂岛火焜岙、南麂岛马祖岙、洞头岛和枸杞岛(表 1 和图 1),每个地点采集 11 个样品,共计 44 个样品。采样时,剪取铜藻藻株顶端的幼嫩部位,

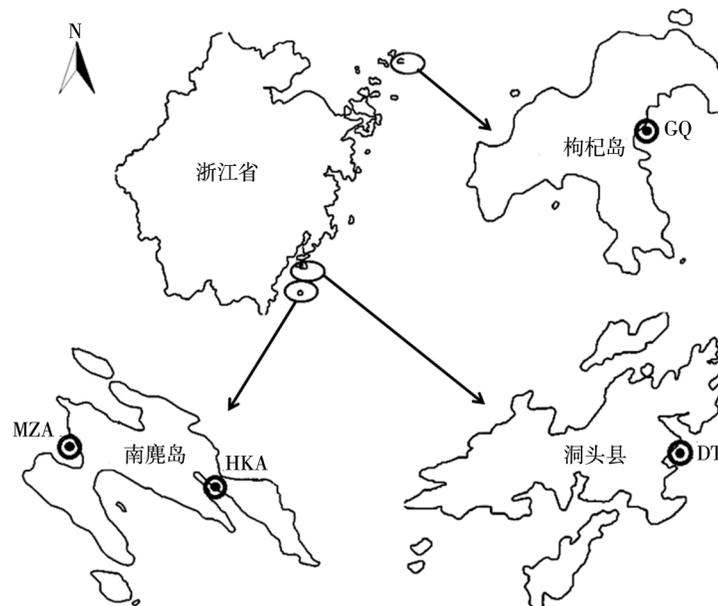


图 1 样品采集点分布图

Fig. 1 Distribution of sampling plots of *Sargassum horneri* populations

表1 铜藻采样信息

Table 1 Sample information of *Sargassum horneri*

采样地点 Sampling location	类型 Type	数量 Number	标本编号 No.	日期 Date (Y / M / D)
南麂火焜岙 Huokun'ao of Nanji Island	野生型 Wild	11	HKA 01 ~ HKA 11	2011 / 4 / 18
南麂马祖岙 Mazuao of Nanji Island	养殖型 Cultural	11	MZA 01 ~ MZA 11	2011 / 4 / 18
洞头岛 Dongtou Island	漂浮型 Floating	11	DT 01 ~ DT 11	2011 / 6 / 15
枸杞岛 Gouqi Island	野生型 Wild	11	GQ 01 ~ GQ 11	2011 / 12 / 16

用冰盒运回实验室,先用毛笔刷去污物,然后用消毒海水及灭菌水清洗干净,进行DNA提取。

1.2 DNA的制备

取处理好的铜藻新鲜叶片或气囊 200 mg,在液氮中迅速研磨成粉末,转至 1.5 mL 离心管中,加入 600 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 水浴预热的 4 \times CTAB 提取液^[23] [4% CTAB, 0.2 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 40 mmol L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 1.4 mol L⁻¹ NaCl, 2% β -巯基乙醇, 1% PVP],充分混匀后放入 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,每 10 min 混匀一次;加入 2 μ L RNase A (10 mg mL⁻¹), 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加入 600 μ L 苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, V/V/V)并混匀;在 5900 $\times g$ 下离心 10 min,吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中;加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V)并混匀,在 5900 $\times g$ 下离心 10 min,吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中;加入 0.1 倍体积 3 mol L⁻¹ NaAc 溶液(pH 5.2)和 2 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇,混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h,在 13400 $\times g$ 下离心 10 min,倒去上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,风干后加适量 TE 缓冲液溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 ITS区片段扩增、产物鉴定及测序

ITS 序列的扩增使用 White 等^[24]设计的通用引物,上游引物 ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAG-3',下游引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3',由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系共 50 μ L,包含 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, 25 mmol L⁻¹ MgCl₂ 3.0 μ L, 2.5 mmol L⁻¹ dNTPs 4.0 μ L,上、下游引物(20 μ mol L⁻¹)各 1.0 μ L,模板 DNA 20 ng, *Taq* DNA 聚合酶(5 U μ L⁻¹) 0.25 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 48 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;末次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min^[13]。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并将扩增产物送上海生工生物工

程有限公司双向测序,测序引物同 PCR 扩增引物。

1.4 序列分析

用 CodonCode Aligner 4.0.2 软件将测得的序列进行手工校正,并进行序列拼接。然后将拼接成功的序列输入到 GenBank 中做 BLASTn 同源性分析,再用 MEGA 5.05 软件对序列进行比对分析,手工进一步调整,确定序列长度,计算不同序列间的碱基组成、变异位点。将测得的不同基因型的序列和来自 GenBank 数据库中的 2 株铜藻 *S. horneri* (A)、*S. horneri* (B)的 5.8S rDNA-ITS 序列以及作为外类群的羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)的 5.8S rDNA-ITS 序列用 Clustal W 进行序列比对,然后用 MEGA 5.05 软件,选择 Kimura 2-parameter 模型^[25]计算不同铜藻基因型间的遗传分化距离并构建系统树。

2 结果

2.1 BLASTn结果及ITS区序列分析

BLASTn 分析结果表明:GenBank 公共数据库中两株铜藻 *S. horneri* (A)、*S. horneri* (B) (序列号分别为 AY149998.1 和 AY149999.1)的 5.8S rDNA-ITS 序列与本研究的 44 个样品序列的最大相似性(Max ident)均分别为 99% 和 98%,其 BLAST 分值分别是 Total score = 2732, E-value = 0.0; Total score = 2577, E-value = 0.0。这证实本研究中的 PCR 产物确实是铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列。

本研究中所有样品的 5.8S rDNA-ITS 序列长度均为 1485 bp,包括部分 ITS1、完整的 5.8S rDNA 和部分 ITS2 序列,ITS1 序列长度为 763 bp, 5.8S rDNA 长度为 159 bp, ITS2 序列长度为 563 bp。只有 HKA01、HKA03、HKA04 藻株的 5.8S rDNA-ITS 序列的第 1012 位点发生了 C \rightarrow T 的变异。该变异位点产生了两种基因型,且均为南麂岛火焜岙铜藻居群。由于只有一个变异位点,所以所有样品

的碱基 A、G、T、C 含量基本一致,分别为 18.59%、33.54%、24.85% 和 26.06%。

2.2 铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列的多态性分析

将包含第 1012 位 C → T 变异位点的两种基因型命名为 DT 01 和 HKA 01,并与 GenBank 公共数据库中两株铜藻 *S. horneri* (A)、*S. horneri* (B) (序列号分别为 AY149998.1 和 AY149999.1) 的 5.8S rDNA-ITS 区序列进行比对,发现共有 31 个变异位点,其中转换位点 17 个(T / C 13 处, A / G 4 处),颠换位点 4 个(G / T 2 处, A / C 1 处, A / T 1 处),插入 / 缺失位点 10 个。31 个变异位点中仅有 1 个发生在 ITS2 区,其余全部发生在 ITS1 区。5.8S rDNA 序列最为保守,没有发生任何形式的突变(图 2)。

2.3 不同铜藻基因型间的遗传距离

铜藻 4 种基因型间的遗传分化距离变异范围为 0.0007 ~ 0.0146, 其 5.8S rDNA-ITS 区存在遗传变异,但遗传变异率较低,亲缘关系较近。其中 *S. horneri* (B) 与 HKA 01 的遗传分化距离最大,为 0.0146; HKA 01 与 DT 01、*S. horneri* (A) 与 DT 01 之间的遗传分化距离最小,均为 0.0007。而作为外群的羊栖菜和铜藻 DT 01 的遗传分化距离最大,为 0.0725; 和 *S. horneri* (B) 的遗传分化距离最小,为 0.0663 (表 2)。

2.4 构建系统发生树

从图 3 可以看出,铜藻 4 种基因型 HKA 01、DT 01、*S. horneri* (A) 和 *S. horneri* (B) 聚类为一谱系支,作为外类群的羊栖菜为另一谱系支。4 种基因型铜藻所聚类的谱系支内,DT 01、*S. horneri* (A) 首先聚为一支,然后再和 HKA 01 聚为一支,但 *S. horneri* (B) 的变异较为明显,自为单系树。

3 讨论

3.1 铜藻的 5.8S rDNA-ITS 序列

核糖体内转录间隔区(ITS)在核基因组中高度重复,其侧翼为高度保守的编码区,为设计通用型引物进行 PCR 扩增带来了便利,且由于协同进化作用,使同一基因组内部不同 ITS 拷贝间的序列趋向或完全一致,因而对 PCR 产物直接测序成为可能^[16-18]。尽管在苏铁等裸子植物中存在显著的协同

进化不完全现象而造成基因组内部 ITS 多态性^[26],使得 ITS 区序列无法通过对 PCR 产物直接测序得到。本研究首先对铜藻单个个体的 5.8S rDNA-ITS 进行了 PCR 产物直接测序,结果表明其完全能够反映出铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列。通过对双向测序结果进行拼接调整,得到了长度为 1485 bp 的序列,其中包括部分的 ITS1,完整的 5.8S rDNA 和部分的 ITS2 序列。实验结果显示铜藻基因组内部不同 ITS 拷贝间的纯合度很高,因而本研究所涉及的测序工作均为 PCR 产物直接测序。

由于 GenBank 公共数据库中尚无铜藻核糖体 18S rRNA 基因和 26S rRNA 基因的序列,因而暂未设计出用来扩增铜藻 5.8S rDNA-ITS 区的特异性引物。本文采用 White 等^[24]设计的通用引物,这导致扩增出的铜藻 rDNA ITS1 和 ITS2 区都不完整,在一定程度上影响了对 ITS1 和 ITS2 区的分析,其长度、G + C 含量、潜在的变异位点等都无法确定。丁小余等^[27]利用石斛属(*Dendrobium*)植物的核糖体 18S rRNA 基因和 26S rRNA 基因的保守序列设计引物进行 PCR 扩增,得到了枫斗类石斛完整的 5.8S rDNA-ITS 区片段;李敏等^[28]利用龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*) 的相近物种 *Gracilaria gracilis*、*Gracilaria verrucosa* 等的核糖体 18S rRNA 基因和 26S rRNA 基因的保守序列设计引物,并扩增龙须菜的 5.8S rDNA-ITS 区片段。因此,今后可以考虑利用其它马尾藻属物种的核糖体 18S rRNA 基因和 26S rRNA 基因的保守序列来设计扩增铜藻 5.8S rDNA-ITS 区的引物,以期能扩增出铜藻完整的 5.8S rDNA-ITS 区片段。

3.2 铜藻居群间的基因交流

本研究中的 44 株铜藻个体的 5.8S rDNA-ITS 序列中只有 3 株铜藻个体出现了第 1012 位点 C → T 的变异,其他 41 株铜藻个体的 5.8S rDNA-ITS 序列完全相同,其中也包括 11 株采自于洞头海区的漂浮型铜藻。GenBank 数据库中的两株铜藻的 5.8S rDNA-ITS 序列,其中藻株 *S. horneri* (A) 于 1994 年采自韩国江陵市海区,而藻株 *S. horneri* (B) 于同年采自韩国仁川市海区,*S. horneri* (A) 与 *S. horneri* (B) 的 5.8S rDNA-ITS 区间存在 29 个变异位点,其中插入 / 缺失位点 10 个^[13]。虽然 Oak 等^[13]并未讨论二者产生如此显著差异的原因,但笔者认为 *S. horneri* (B) 所在的韩国仁川市海区的铜

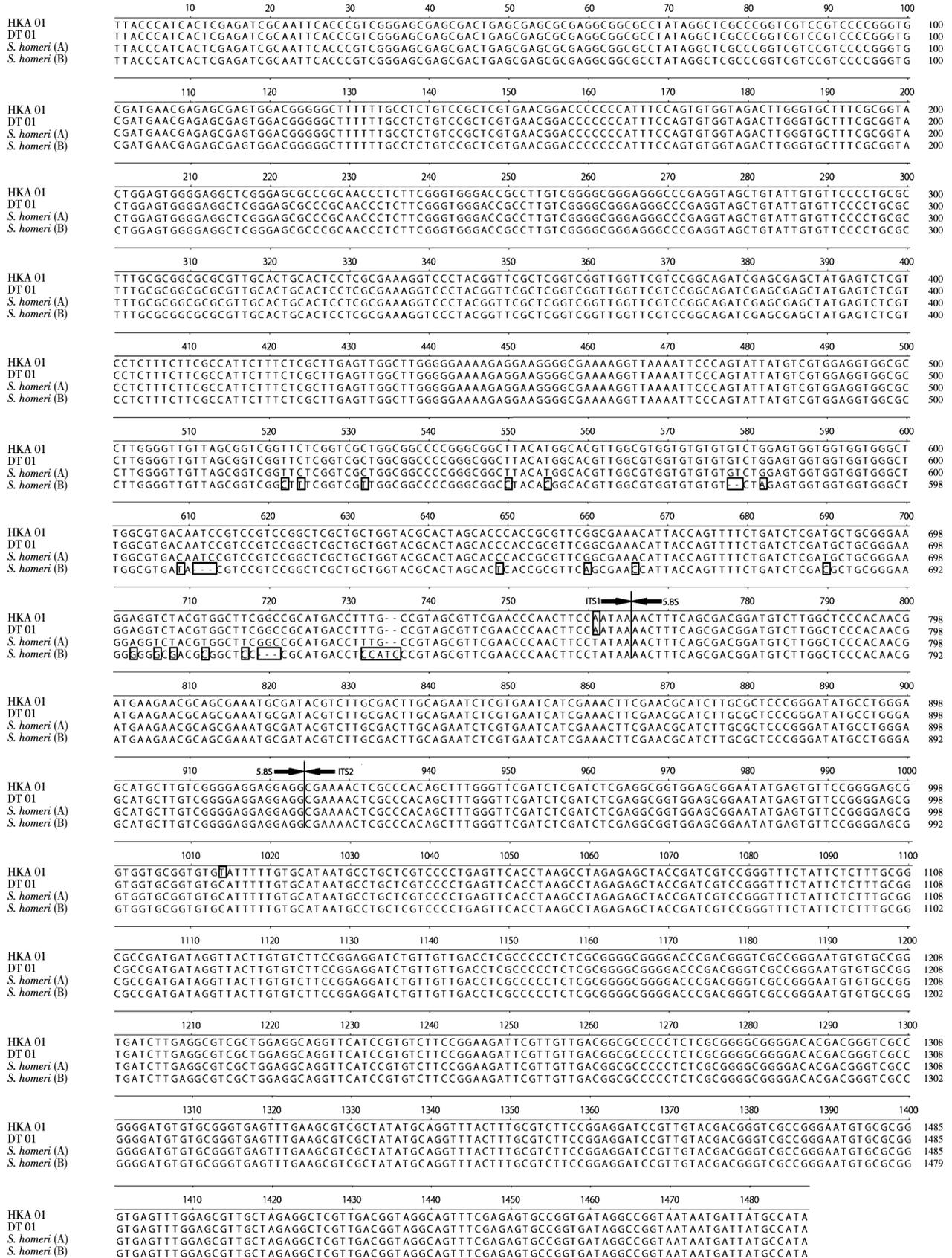


图 2 4 个基因型铜藻的 5.8S rDNA-ITS 序列比对。□: 变异位点。

Fig. 2 Alignment of 5.8S rDNA-ITS sequences from 4 haplotypes of *Sargassum horneri*. □: Variable nucleotide sites.

表 2 利用 ITS 序列计算的铜藻 Kimura 2-parameter 遗传分化距离

Table 2 Kimura 2-parameter genetic distance among 4 haplotypes of *Sargassum horneri* based on ITS sequence

	HKA 01	DT 01	<i>S. horneri</i> (A)	<i>S. horneri</i> (B)	<i>S. fusiforme</i>
HKA 01					
DT 01	0.0007				
<i>S. horneri</i> (A)	0.0014	0.0007			
<i>S. horneri</i> (B)	0.0146	0.0139	0.0132		
<i>S. fusiforme</i> *	0.0717	0.0725	0.0724	0.0663	

*:羊栖菜作为外类群。

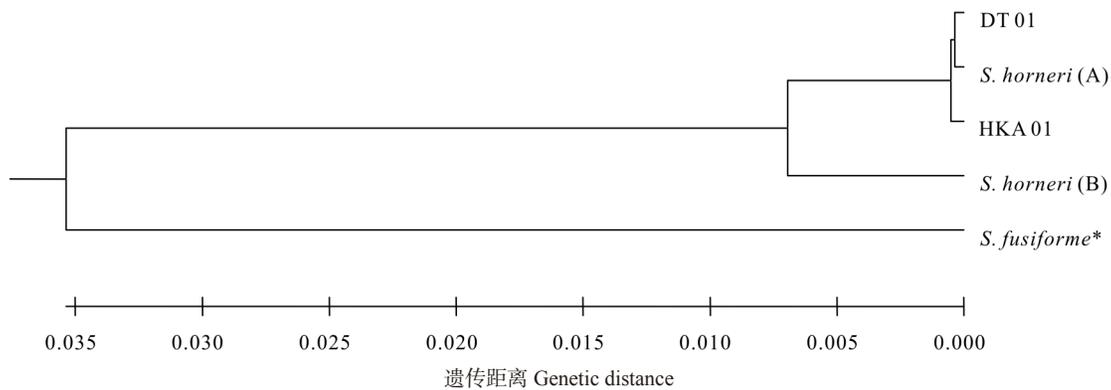
*: *Sargassum fusiforme* as an outgroup.

图 3 根据铜藻 4 种基因型的 5.8S rDNA-ITS 用 UPGMA 法构建的系统树。*:羊栖菜作为外类群。

Fig. 3 UPGMA tree based on 5.8S rDNA-ITS sequences of 4 haplotypes of *Sargassum horneri*. *: *Sargassum fusiforme* as an outgroup.

藻居群极有可能曾经与其他近缘物种间有过基因交流。从表 2 和图 3 可见,若不考虑 *S. horneri* (B), Haplotype 01、Haplotype 02 和 *S. horneri* (A) 三者将会聚为一支,且彼此间无明显遗传分化。这支持洞头海区的大量漂浮型铜藻与南麂岛、枸杞岛以及韩国江陵市海区的野生铜藻为同一起源。这与 Hu 等^[15]的研究结果相似,但与日本铜藻不同居群间的高度异质性不同。中国 3 个不同海域(黄渤海、中国东海、中国南海)铜藻居群间的遗传结构十分狭窄,其遗传联系源于更新世晚期的物种扩张,且这些海域之间不存在影响铜藻分布的物理障碍。事实上,在中国沿海,由于同时存在南向和北向两种主要的洋流模式,且铜藻的气囊结构赋予了其具有漂浮的能力,使铜藻大范围的漂移成为可能。最近一些调查^[29-30]报道,在离中国海岸数百公里的区域(大陆架和黑潮锋之间)里有成片漂浮的铜藻,在黑潮和沿岸流的混合作用下,从中国浙江沿岸漂到日本九州岛。而在日本沿海,其岛屿周围的海洋地质结构抑制了铜藻大范围的漂移潜力。显然,中国沿海铜藻随洋流大范围漂移的特点对该区域铜藻居

群间的遗传交流产生了深远的影响。类似的研究结论同样体现在其它具有漂移能力的海藻上。汪文俊等^[31]对来自东海-黄海海区、青岛沿岸的 14 个站位的 70 个浒苔(*Enteromorpha prolifera*)样本进行了 5.8S rDNA-ITS 序列分析,结果表明,70 个样本具有完全相同的 5.8S rDNA-ITS 序列,推测是由于浒苔成体具有漂移能力,在相对开放的海域范围内,难以形成生殖隔离,导致 ITS 区变异程度较低。

3.3 展望

本研究仅对来自 4 个不同采样点的铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列进行了分析,而根据《中国海藻志》^[1]的描述,铜藻在我国辽宁省、浙江省、福建省以及广东省均有分布,在今后的研究中,可以分析铜藻地理范围分布更广的不同居群间的 5.8S rDNA-ITS 区序列,或者选择其它合适的分子标记,进行系统发育、遗传多样性分析,以进一步验证本文所得出的结论。同时,本研究结果也表明,浙江省铜藻资源遗传多样性较低,建议加大对铜藻自然资源的保护力度,加快人工铜藻场的建设以及野生

铜藻场的恢复, 维护铜藻藻场的生态平衡, 保证其自然资源可持续利用。

参考文献

- [1] Zeng C K, Lu B R. Phaeophyta: Fucales [M]// Flora Algaeum Marinarum Sinicarum, Tomus 3(2). Beijing: Science Press, 2000: 1–43.
曾呈奎, 陆保仁. 褐藻门: 墨角藻目 [M]// 中国海藻志 第3(2)卷. 北京: 科学出版社, 2000: 1–43.
- [2] Sun J Z, Zhuang D G, Chen W D, et al. Studies on sexual reproduction and seedling production of the brown alga *Sargassum horneri* [J]. S China Fish Sci, 2008, 4(2): 6–14.
孙建璋, 庄定根, 陈万东, 等. 铜藻 *Sargassum horneri* 繁殖生物学及种苗培育研究 [J]. 南方水产, 2008, 4(2): 6–14.
- [3] Sun J Z, Zhuang D G, Wang T G, et al. Study on *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh around Nanji Islands [J]. Mod Fish Inform, 2009, 24(5): 19–21.
孙建璋, 庄定根, 王铁杆, 等. 南麂列岛铜藻的研究 [J]. 现代渔业信息, 2009, 24(5): 19–21.
- [4] Sun J Z, Zhuang D G, Wang T G, et al. Primary study on enhancement technique of *Sargassum horneri* around Nanji Islands [J]. Mod Fish Inform, 2010, 25(1): 23–27.
孙建璋, 庄定根, 王铁杆, 等. 南麂列岛铜藻增殖技术的初步研究 [J]. 现代渔业信息, 2010, 25(1): 23–27.
- [5] Umezaki I. Ecological studies of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh in Obama Bay, Japan Sea [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1984, 50(7): 1193–1200.
- [6] Choi H G, Lee K H, Yoo H I, et al. Physiological differences in the growth of *Sargassum horneri* between the germling and adult stages [J]. J Appl Phycol, 2008, 20(5): 279–285.
- [7] Honda M, Okuda T. Egg liberation, germling development and seasonal changes in photosynthetic rates of autumnal *Sargassum horneri* [J]. Jpn J Phycol, 1989, 37(1): 46–52.
- [8] Uchida T. The life cycle of *Sargassum horneri* (Phaeophyta) in laboratory culture [J]. J Phycol, 1993, 29(2): 231–235.
- [9] Yoshida G, Murase N, Arai S, et al. Ecotypic differentiation in maturation seasonality among *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyta) populations in Hiroshima Bay, Seto Inland Sea, Japan [J]. Phycologia, 2004, 43(6): 703–710.
- [10] Pang S J, Liu F, Shan T F, et al. Cultivation of the brown alga *Sargassum horneri*: Sexual reproduction and seedling production in tank culture under reduced solar irradiance in ambient temperature [J]. J Appl Phycol, 2009, 21(4): 413–422.
- [11] Ogawa H. Combined effects of temperature and salinity on the early development of marine algae: II. Rhizoid development of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh [J]. Jpn J Phycol, 1986, 34(2): 137–141.
- [12] Uchida T, Arima S, Hirata S, et al. Free-living cells released from thalli of *Sargassum horneri* (Phaeophyta) in culture [J]. Bot Mar, 1996, 39(1/2/3/4/5/6): 269–272.
- [13] Oak J H, Suh Y, Lee I K. Phylogenetic relationships of *Sargassum* subgenus *Bactrophyucus* (Sargassaceae, Phaeophyceae) inferred from rDNA ITS sequences [J]. Algae, 2002, 17(4): 235–247.
- [14] Uwai S, Kogame K, Yoshida G, et al. Geographical genetic structure and phylogeography of the *Sargassum horneri* / *filicinum* complex in Japan, based on the mitochondrial COX III haplotype [J]. Mar Biol, 2009, 156(5): 901–911.
- [15] Hu Z M, Uwai S, Yu S H, et al. Phylogeographic heterogeneity of the brown macroalga *Sargassum horneri* (Fucaceae) in the northwestern Pacific in relation to late Pleistocene glaciation and tectonic configurations [J]. Mol Ecol, 2011, 20(18): 3894–3909.
- [16] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference [J]. Q Rev Biol, 1991, 66(4): 411–453.
- [17] Niu X L, Ji K P, Wu Q, et al. rDNA ITS sequence molecular marker technology in the study of botany [J]. China J Bioinform 2009, 7(4): 268–271.
牛宪立, 姬可平, 吴群, 等. rDNA ITS区序列分子标记技术在植物学研究中的应用 [J]. 生物信息学, 2009, 7(4): 268–271.
- [18] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1995, 82(2): 247–277.
- [19] Ainouche M L, Bayer R J. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): Insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. Genome, 1997, 40(5): 730–743.
- [20] Godoy-Lutz G, Kuninaga S, Steadman J R, et al. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA [J]. J Gen Plant Pathol, 2008, 74(1): 32–40.
- [21] Martins L, Oberprieler C, Hellwig F H. A phylogenetic analysis of Primulaceae s.l. based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data [J]. Plant Syst Evol, 2003, 237(1/2): 75–85.
- [22] Sun G H, Liu X Q, Yang J M, et al. Genetic diversity of ITS sequences in farmed and natural *Rhopilema esculentum* populations [J]. Mar Sci, 2010, 34(10): 90–95.
孙国华, 刘相全, 杨建敏, 等. 海蜇养殖群体及自然捕获群体 ITS序列遗传分析 [J]. 海洋科学, 2010, 34(10): 90–95.
- [23] Pang Y W, Duan L Z, Song D Y, et al. A modified method of genomic DNA extraction and establishment of AFLP systems in *Rhus chinensis* [J]. Guihaia, 2011, 31(1): 36–38.
庞雅文, 段立柱, 宋德应, 等. 盐肤木基因组DNA提取方法改进及AFLP体系的建立 [J]. 广西植物, 2011, 31(1): 36–38.
- [24] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics

- [M]// Innis M A, Gelfand D H, Sininsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press, 1990: 315–322.
- [25] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [26] Xiao L Q, Zhu H. Intra-genomic polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) regions of *Cycas revoluta*: Evidence of incomplete concerted evolution [J]. *Biodiv Sci*, 2009, 17(5): 476–481.
- 肖龙骞, 朱华. 苏铁nrDNA ITS区的序列多态性: 不完全致同进化的证据 [J]. *生物多样性*, 2009, 17(5): 476–481.
- [27] Ding X Y, Wang Z T, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* of “Fengdou” and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin*, 2002, 37(7): 567–573.
- 丁小余, 王峥涛, 徐红, 等. 枫斗类石斛rDNA ITS区的全序列数据库及其序列分析鉴别 [J]. *药学报*, 2002, 37(7): 567–573.
- [28] Li M, Sui Z H, Yi H, et al. Cloning and sequence analysis of 5.8S rRNA and ITS region between 18S and 28S rRNA of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *J Ocean Univ China (Nat Sci)*, 2009, 39(1): 77–83.
- 李敏, 隋正红, 易恒, 等. 龙须菜5.8S rRNA和ITS区的克隆与系统学分析 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39(1): 77–83.
- [29] Komatsu T, Tatsukawa K, Filippi J B, et al. Distribution of drifting seaweeds in eastern East China Sea [J]. *J Mar Syst*, 2007, 67(3/4): 245–252.
- [30] Komatsu T, Matsunaga D, Mikami A, et al. Abundance of drifting seaweeds in eastern East China Sea [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20(5): 801–809.
- [31] Wang W J, Wang F J, Chen S L, et al. PCR amplification and sequence analysis of ITS regions of *Enteromorpha prolifera* [J]. *Mar Fish Res*, 2008, 29(5): 124–129.
- 汪文俊, 王飞久, 陈松林, 等. 浒苔ITS区的扩增和分析 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 124–129.