

徐佳杰,姜 波,朱建一,等. 红毛菜 28S rDNA 和 IGS 序列分析及系统发育[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):66-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.017

红毛菜 28S rDNA 和 IGS 序列分析及系统发育

徐佳杰¹,姜 波²,朱建一²,何 渊¹,沈宗根²

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123;2. 常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏常熟 215500)

摘要:为了探讨中国境内红毛菜的物种关系及亲缘关系,对红毛菜核糖体基因的 28S rDNA、IGS 序列进行了研究。28S rDNA 序列分析结果显示:江苏(LYG、NT)、福建(NRD1、NRD2)、广东(NA1、NA2、NA3)的 7 个海水红毛菜遗传距离为 0~0.004;而威海(WH)的海水红毛菜与其他海水红毛菜的遗传距离为 0.144~0.147;山西娘子关(NZG)、甘肃兴隆山(XLS)的 2 个淡水红毛菜之间的关系极近,遗传距离为 0.001;淡水红毛菜与威海的海水红毛菜的遗传距离(0.125)小于淡水红毛菜与其他 7 个海水红毛菜的遗传距离(0.210~0.213)。对江苏、福建、广东的 7 个海水红毛菜的 IGS 序列进行分析显示,7 个海水红毛菜亲缘关系极近。基于 28S rDNA 序列的系统进化树显示,中国境内采集到的红毛菜分为 3 个进化分支:2 个淡水红毛菜形成独立 1 支,而海水红毛菜则分为 2 个进化分支,其中威海的海水红毛菜单独为 1 个分支,其他 7 个海水红毛菜归为另 1 个分支。由此推测,目前为止中国境内至少存在 3 种红毛菜。

关键词:红毛菜;28S rDNA;IGS;分类学

中图分类号: Q968.43⁺9;S188⁺.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0066-04

红毛菜(*Bangia*)属红藻门(Rhodophyta)红藻纲(Rhodophyceae)红毛菜亚纲(Bangiaophycidae)红毛菜目(Bangiales)红毛菜科(Bangiaceae)^[1]。红毛菜的形态极其简单,为直立不分枝的丝状红藻^[2]。红毛菜在全球的分布极为广泛,从北半球的北欧到南半球的新西兰都有分布^[3],包括海水环境、淡水环境^[4]。红毛菜的传统分类方法是根据其形态(藻体长度、直径和颜色)、染色体数目、繁殖方式、生活环境和地理分布等特征进行研究^[5-6]。由于红毛菜形态结构极其相似,且易受栖息环境的影响而发生变化^[5],因此仅依据传统分类学方法已经不能满足红毛菜的分类需求,不少研究者开始从分子水平对红毛菜进行分类研究^[7-8]。

红毛菜核糖体 RNA 基因序列由 18S rDNA、5.8S rDNA、28S rDNA 构成 1 个转录单元,彼此之间被转录内间隔区(ITS1、ITS2)隔开;转录单元之间则被基因内间隔区(IGS)隔开^[9-10]。核糖体 RNA 基因序列不同区域由于功能需要不同,承受不同的选择压力而表现出不同的进化速率,如编码区序列(18S rDNA、5.8S rDNA、28S rDNA)具有功能需要,承受较高的选择压力而表现出较慢的进化速率,适用于种属间及以上水平的分类研究^[11-12];非编码区序列(ITS1、ITS2、IGS)则没有功能需要,承受较低的选择压力而表现出较快的进化速率,适用于种属间甚至种下水水平的分类研究^[13-15]。Freshwater 等根据 28S rDNA 对红藻的 13 个物种进行序列分析,结果发现 13 个物种可以分为 11 目^[11],由此推测 28S rDNA 可能更适合用于红藻较高阶元间的系统发育研究。Pecchia 等对向日葵茎溃疡病菌(*Diaporthe helianthi*)的 18S rDNA 5'端的部分 IGS 序列进行分析,结果显示:来自阿根廷、法国、意大

利、南斯拉夫、罗马尼亚的病菌可以分为 3 个独立的菌群^[16]。

本研究首次对采自中国沿海地区、内陆地区 10 个不同采集地的红毛菜进行 28S rDNA 的分子系统学研究,分析中国境内红毛菜的物种关系。同时对江苏省、福建省、广东省的 7 个海水红毛菜的 IGS 序列进行分析,以探讨不同地区海水红毛菜间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

10 个红毛菜采集地分别是山东威海(WH)、江苏连云港(LYG)、江苏南通(NT)、福建莆田南日岛(2 个采集地:NRD1、NRD2)、广东汕头南澳(3 个采集地:NA1、NA2、NA3)的 8 个海水红毛菜,以及山西阳泉娘子关(NZG)、甘肃兰州兴隆山(XLS)的 2 个淡水红毛菜,具体信息见表 1。将采集到的材料分别用海水、淡水初步清洗后阴干,置于-20℃保存备用。

表 1 红毛菜的采集地信息

样品编号	采集地	纬度、经度	采集时间
WH	山东威海	37°53' N、122°09' E	2013 年 3 月
LYG	江苏连云港	34°60' N、119°17' E	2013 年 3 月
NT	江苏南通	32°01' N、120°87' E	2013 年 3 月
NRD1	福建莆田南日岛	25°23' N、119°48' E	2013 年 3 月
NRD2	福建莆田南日岛	25°23' N、119°48' E	2013 年 3 月
NA1	广东汕头南澳	23°44' N、117°07' E	2013 年 2 月
NA2	广东汕头南澳	23°44' N、117°07' E	2013 年 2 月
NA3	广东汕头南澳	23°44' N、117°07' E	2013 年 2 月
NZG	山西阳泉娘子关	37°87' N、113°57' E	2013 年 4 月
XLS	甘肃兰州兴隆山	35°72' N、104°46' E	2014 年 7 月

1.2 DNA 的提取

采用 CTAB 法对采自不同地理群的红毛菜进行 DNA 提取^[17],通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整

收稿日期:2015-04-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31270256、41276134)。

作者简介:徐佳杰(1989—),女,江苏苏州人,硕士,主要从事藻类细胞发育与分子机理研究。E-mail:646429795@qq.com。

性,置于 -20 ℃ 保存备用。

1.3 PCR 扩增

引物序列如表 2 所示,PCR 引物由苏州金维智生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μL,包括:5 μL 10 × LA Taq PCR Buffer II (Mg²⁺ Plus), 5 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 2 μL DNA 模板,各 1 μL 上、下游引物 (20 μmol/L),0.5 μL LA Taq (5 U/μL),35.5 μL ddH₂O。PCR 反应条件为:95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 7 min。

表 2 引物序列信息

引物	序列(5'→3')	引物来源
ITS-LF	TGTGAGCATGCCTGTTGAGTGTCG	海水红毛菜 28S rDNA
LR1	GACCGACTAACCCACGTCCAAGCAC	上游序列特异引物
I2LF	CGGTCCCGCTCCTTTGTCTCTCTCT	淡水红毛菜 28S rDNA
I2LR	ACGGCTGCTTTCCCTCGGGTTTTC	上游序列特异引物
IGSF1	CGCTTGTTATGCTGAGGAGGGATTT	海水红毛菜 IGS
IGSR1	AGACGACGGTGATGGGGGCTTGAT	下游序列特异引物

1.4 克隆与测序

PCR 扩增产物经凝胶电泳检测后,采用试剂盒切胶回收,将回收的目的片段与 pEASY-T3 载体连接,于 25 ℃ 连接 15 min。然后将连接产物导入 Trans1-T1 感受态细胞,冰浴 30 min,热激 30 s,再冰浴 2 min。完成连接转化后,加 LB 液体培养基于 37 ℃ 摇菌复苏,然后均匀涂抹在 LB 固体培养基上,37 ℃ 恒温培养过夜。最后挑选阳性克隆样品送苏州金维智生物科技有限公司进行测序。

1.5 序列分析

通过 NCBI 中的 BLAST 软件对测序获得的序列与 GenBank 中的序列进行同源性比对,以确定其为正确序列。用 DNAMAN 软件对样品进行多序列比对,手工调整个别碱基。通过 MEGA6.06 软件计算序列两两之间的遗传距离并构建 ML 系统进化树^[18],自举重复数为 1 000,其他参数均为

默认值。系统进化树所用到的序列名称和登录号见表 3。

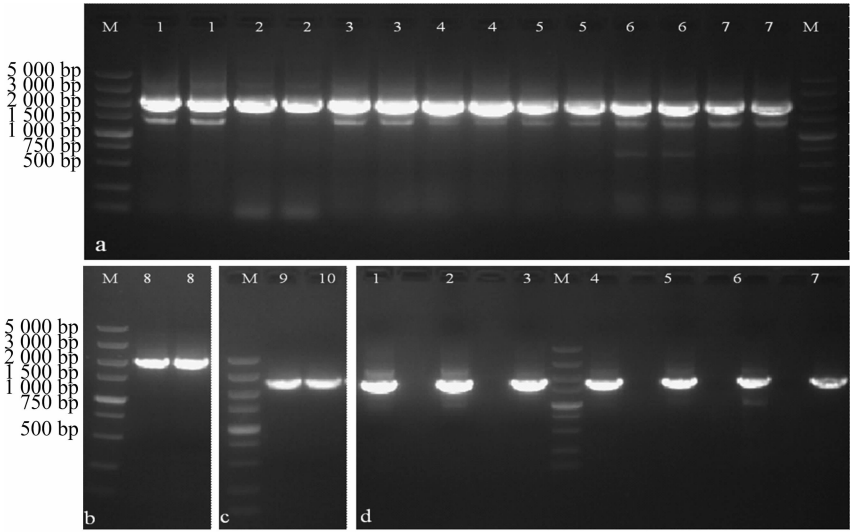
表 3 红毛菜、紫菜 28S rDNA 序列信息

样品	登录号	来源
<i>Bangia</i> sp. LYG	KR010929	本研究
<i>Bangia</i> sp. NA1	KR010934	本研究
<i>Bangia</i> sp. NA2	KR010935	本研究
<i>Bangia</i> sp. NA3	KR010936	本研究
<i>Bangia</i> sp. NRD1	KR010932	本研究
<i>Bangia</i> sp. NRD2	KR010933	本研究
<i>Bangia</i> sp. NT	KR010930	本研究
<i>Bangia</i> sp. NZG	KR010937	本研究
<i>Bangia</i> sp. WH	KR010928	本研究
<i>Bangia</i> sp. XLS	KR010938	本研究
<i>Porphyra miniata</i>	EF033595	Le 等 ^[12]
<i>Porphyra purpurea</i>	EF033596	Le 等 ^[12]
<i>Porphyra</i> sp. LLG037	EF033597	Le 等 ^[12]
<i>Pyropia haitanensis</i>	JQ236860	林中炬 ^[19]
<i>Pyropia yezoensis</i>	KJ578748	李星辰 ^[20]

2 结果与分析

2.1 28S rDNA、IGS 序列的 PCR 扩增

以 ITS-LF/LR1 为引物,连云港 (LYG)、南通 (NT)、南日岛 1、南日岛 2 (NRD1、NRD2)、南澳 1、南澳 2、南澳 3 (NA1、NA2、NA3) 的海水红毛菜基因组 DNA 为模板,均成功扩增出 1 条大小约 2 100 bp 的目的条带 (图 1-a)。以威海 (WH) 的海水红毛菜基因组 DNA 为模板,扩增获得的 PCR 产物为单一明亮条带,大小约为 2 000 bp (图 1-b)。以 I2LF/I2LR 为引物,娘子关 (NZG)、兴隆山 (XLS) 的淡水红毛菜基因组 DNA 为模板,扩增获得大小约 2 400 bp 的单一明亮条带 (图 1-c)。以 IGSF1/IGSR1 为引物,海水红毛菜 (除 WH 以外) 基因组 DNA 为模板,扩增获得的 PCR 产物为单一明亮条带,大小约为 1 600 bp (图 1-d)。



a—海水红毛菜 (除WH以外) 28S rDNA; b—海水红毛菜 (WH) 28S rDNA;
c—淡水红毛菜28S rDNA; d—海水红毛菜 (除WH以外) IGS
M—TaKaRa DL-5000 DNA marker; 1—NRD1; 2—NRD2; 3—NA1; 4—NA2; 5—NA3;
6—LYG; 7—NT; 8—WH; 9—NZG; 10—XLS

图1 PCR 扩增产物 DNA 片段电泳结果

在 NCBI 中进行比对,确定其为红毛菜的 28S rDNA 序列,剪去上游 5.8S rDNA、ITS 区序列后,获得不同地理群红毛菜的 28S rDNA 序列长度分别为:威海(WH)的海水红毛菜为 1 514 bp,其他 7 个海水红毛菜均为 1 541 bp,淡水红毛菜均为 1 855 bp。江苏省、福建省、广东省的 7 个海水红毛菜扩增获得的 IGS 序列与福建莆田的海水红毛菜 IGS 序列(KR010939)比对后,相似性极高,约为 99%,因此确定它们为海水红毛菜的 IGS 序列,且不同地理群海水红毛菜的 IGS 序列长度为 1 645 ~1 646 bp。

2.2 不同地理群 28S rDNA、IGS 序列的比对分析

将不同地理群测序获得的 28S rDNA 序列比对后,对齐剪切,用 MEGA 6.06 生物信息学软件计算序列的遗传距离。由表 4 可见,在海水种群中,连云港(LYG)、南通(NT)、南日岛 2 个品种(NRD1、NRD2)、南澳 3 个品种(NA1、NA2、NA3)

的 7 个海水红毛菜之间遗传距离为 0 ~ 0.004,其中连云港(LYG)、南澳 1(NA1)、南澳 3(NA3)的 28S rDNA 序列相同。威海(WH)的海水红毛菜与其他采集点的 7 个海水红毛菜之间的遗传距离为 0.144 ~ 0.147。娘子关(NZG)、兴隆山(XLS)的 2 个淡水红毛菜之间的遗传距离为 0.001。淡水红毛菜与海水红毛菜之间的遗传距离较远,其中与威海(WH)的海水红毛菜的遗传距离为 0.125,与其他 7 个海水红毛菜的遗传距离为 0.210 ~ 0.213。根据上述结果分析,初步推测连云港(LYG)、南通(NT)、南日岛 2 个品种(NRD1、NRD2)、南澳 3 个品种(NA1、NA2、NA3)的海水红毛菜为 1 个类群,进而采用进化速率较快的 IGS 序列对这些地理群的海水红毛菜进行分析,结果见表 4。可以看出,采自江苏省、福建省、广东省的 7 个海水红毛菜的 IGS 片段序列遗传距离极近,为 0 ~ 0.003,其中连云港(LYG)、南通(NT)的 IGS 序列相同。

表 4 红毛菜 28S rDNA(左下)和 IGS(右上)序列的遗传距离

种群	WH	LYG	NT	NRD1	NRD2	NA1	NA2	NA3	NZG	XLS
WH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LYG	0.144	—	0.000	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	—	—
NT	0.144	0.001	—	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	—	—
NRD1	0.144	0.001	0.002	—	0.002	0.001	0.002	0.001	—	—
NRD2	0.145	0.002	0.003	0.003	—	0.001	0.001	0.001	—	—
NA1	0.144	0.000	0.001	0.001	0.002	—	0.000	0.001	—	—
NA2	0.147	0.002	0.003	0.003	0.004	0.002	—	0.001	—	—
NA3	0.144	0.000	0.001	0.001	0.002	0.000	0.002	—	—	—
NZG	0.125	0.210	0.210	0.213	0.212	0.210	0.213	0.210	—	—
XLS	0.125	0.210	0.210	0.212	0.212	0.210	0.213	0.210	0.001	—

2.3 基于 28S rDNA 序列构建的系统进化树

由于 GenBank 中已有的红毛菜科 28S rDNA 序列较少,且仅有的几个紫菜序列也只是 28S rDNA 上游序列,因此选取长度适宜的紫菜 28S rDNA 序列与本研究中的红毛菜 28S rDNA 上游序列进行系统进化树的构建。石花菜目 *Capreolia implexa* (AF039545) 为外类群,系统进化树见图 2。可以看出:连云港(LYG)、南通(NT)、南日岛 2 个品种(NRD1、NRD2)、南澳 3 个品种(NA1、NA2、NA3)的 7 个海水红毛菜归于 1 个进化分支,置信度为 100%;威海(WH)的海水红毛菜单独归于 1 个大分支上;8 个海水红毛菜与紫菜聚类为 1 支,为 2 个淡水红毛菜的姐妹分支;娘子关(NZG)、兴隆山(XLS)的淡水红毛菜则归为另 1 个分支,置信度为 100%。

3 讨论与结论

3.1 28S rDNA 序列遗传距离和系统进化树分析

国内外关于 28S rDNA 序列应用于物种分类与进化的研究相对较少,仅有几位研究者对红藻不同物种的 28S rDNA 进行研究。Freshwater 等报道了石花菜目中 16 个石花菜物种的 28S rDNA 序列差异度小于 *rbcl* 且大于 18S rDNA 的差异度,介于两者之间,发现其研究价值不亚于 18S rDNA、*rbcl* 序列^[11,21]。Harper 等研究珊瑚藻 28S rDNA 序列时曾推测,28S rDNA 序列具有区分亲缘关系较近的物种的潜能^[22]。从本研究数据中可以看出,不同物种间 28S rDNA 上游序列的遗传距离为 0.125 ~ 0.213,显然 28S rDNA 序列在种间及种以上水平的分类鉴定能力较好,验证了 Harper 等的推测:28S

rDNA 具有区分鉴定亲缘关系较近的相关物种的潜能,在未

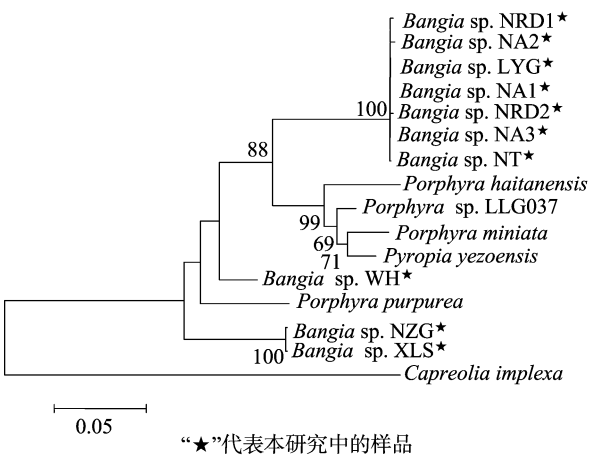


图2 基于28S rDNA上游序列构建的ML系统进化树

来具有较大的发展前景^[9]。根据红毛菜 28S rDNA 上游序列比对分析后,10 个地理群的红毛菜大致分为 3 个类群。结合 GenBank 中已有的紫菜 28S rDNA 序列构建系统进化树,结果显示,10 个地理群红毛菜分为 3 个进化分支:其中连云港(LYG)、南通(NT)、南日岛 2 个品种(NRD1、NRD2)、南澳 3 个品种(NA1、NA2、NA3)的 7 个海水红毛菜归于 1 个分支;而威海的海水红毛菜则与其他 7 个海水红毛菜差异较大,独立归为 1 个大分支,显示了海水红毛菜的多样性;娘子关(NZG)、兴隆山(XLS)的 2 个淡水红毛菜则单独归为 1 个分支,且与海水红毛菜存在明显差异。

3.2 IGS 序列遗传距离分析

有研究报道,在种内及种间系统进化分析中,IGS 序列的变异率高于 ITS1、ITS2^[9,23],一般用于亲缘关系较近的物种或者种内分析。先后有多位研究者对不同物种的遗传多样性等方面进行研究^[24~26]。Li 等对采自莆田、汕头、宁波 3 个产地的栽培坛紫菜的部分 IGS 进行分析,在 1 085 ~ 1 100 bp 的序列中存在 55 个变异位点,即约 5% 的变异率,因此推测 IGS 可以作为红藻种内研究的分子标记^[27]。根据红毛菜核糖体基因 28S rDNA 序列分析结果及系统进化树,可以确定采自江苏省、福建省、广东省的 7 个海水红毛菜是同一类群,利用部分 IGS 序列对这 7 个海水红毛菜的种内亲缘关系进行分析。IGS 序列遗传距离的分析结果显示,7 个地理群的海水红毛菜遗传距离极近(0 ~ 0.003),几乎没有差别,因此可以认为这 7 个地理群的海水红毛菜关系紧密,可能为同一物种。

结合不同地理群红毛菜核糖体 28S rDNA、IGS 序列分析结果及基于 28S rDNA 构建的系统进化树可知,本研究中采集到的红毛菜具有物种多样性,淡水红毛菜与海水红毛菜之间存在明显区别,海水红毛菜存在遗传多样性,且采自江苏省、福建省、广东省的 7 个海水红毛菜之间关系紧密,可能由 1 个物种起源而来。从目前数据可知,28S rDNA 可以用于红毛菜种及种以上水平分类研究。此外,由于目前红毛菜和紫菜等红藻的 28S rDNA 序列的数据有限,将来仍需更多研究来补充和完善此系统进化树,为研究红毛菜科物种多样性、遗传多样性以及保护红毛菜的种质资源提供参考。

参考文献:

- [1] 郑宝福,李 钧. 中国海藻志[M]. 北京:科学出版社,2009: 83 - 104.
- [2] 许 璞,张学成,王素娟,等. 中国主要经济海藻的繁殖与发育[M]. 北京:中国农业出版社,2013:165 - 189.
- [3] 汪文俊,王广策,许 璞,等. 红毛菜生物学研究进展 I. 生活史和有性生殖研究[J]. 海洋科学,2008,32(4):92 - 96.
- [4] 钱树本,刘东艳,孙 军. 海藻学[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2005:91 - 95.
- [5] Sheath R G, Cole K M. Systematics of *Bangia* (Rhodophyta) in North America. I. Biogeographic trends in morphology[J]. Phycologia, 1984, 23(3):383 - 396.
- [6] 张学成,秦 松,马家海,等. 海藻遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,2005:308 - 318.
- [7] Müller K M, Cole K M, Sheath R G. Systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) in North America. II. Biogeographic trends in karyology: chromosome numbers and linkage with gene sequence phylogenetic trees[J]. Phycologia, 2003, 42(2):209 - 219.
- [8] Müller K M, Sheath R G, Vis M L, et al. Biogeography of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the RuBisCo spacer, *rbcl* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analysis. 1. North America[J]. Phycologia, 1998, 37(3):195 - 207.
- [9] Harper J T, Saunders G W. The application of sequences of the ribosomal cistron to the systematic and classification of the florideophyte red algae (Florideophyceae, Rhodophyta) [J]. Cahiers de Biologie Marine, 2001, 42(1):25 - 38.
- [10] 翟中和,王喜中,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1995:367 - 369.
- [11] Freshwater D W, Fredericq S, Bailey J C. Characteristic and utility of nuclear - encoded large - subunit ribosomal gene sequences in phylogenetic studies of red algae[J]. Phycological Research, 1999, 47(1):33 - 38.
- [12] le Gall L, Saunders G W. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 43(3):1118 - 1130.
- [13] 戴小军,欧立军,李文嘉,等. 栽培稻种内 rDNA 基因 IGS 序列分析及系统学意义[J]. 作物学报,2008,34(9):1569 - 1573.
- [14] 张宝玉,王广策,吕颂辉,等. 三株赤潮硅藻 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS)的克隆及序列分析[J]. 海洋学报:中文版,2006, 28(1):111 - 117.
- [15] 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]. 药学学报,2002, 37(7): 567 - 573.
- [16] Pecchia S, Mercatelli E, Vannacci G. Intraspecific diversity within *Diaporthe helianthi*: evidence from rDNA intergenic spacer (IGS) sequence analysis[J]. Mycopathologia, 2004, 157(3):317 - 326.
- [17] 杨君,王茜,刘美华,等. 一种简便的海藻 DNA 提取方法[J]. 生物技术,1999,9(4):40 - 43.
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12):2725 - 2729.
- [19] 林中姮. 三种经济红藻核糖体基因簇的克隆与分析[D]. 苏州:苏州大学,2012:39.
- [20] 李星辰. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)核糖体 RNA 基因(nrDNA)全长序列的克隆与分析[D]. 苏州:苏州大学,2014:33.
- [21] Freshwater D W, Bailey J C. A multigene phylogeny of the Gelidiales including nuclear large - subunit rRNA sequence data [J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(3):229 - 236.
- [22] Harper J T, Saunders G W. Molecular systematic of the Florideophyceae (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data [J]. Journal of Phycology, 2001, 37(6):1073 - 1082.
- [23] Appels R, Dvořák J. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1982, 63(4):337 - 348.
- [24] De Lucchini S, Andronico F, Nardi I. Molecular structure of the rDNA intergenic spacer (IGS) in *Triturus*: implications for the hypervariability of rDNA loci [J]. Chromosoma, 1997, 106(5): 315 - 326.
- [25] Murakami A. Structural differences in the intergenic spacer of 18S - 26S rDNA and molecular phylogeny using partial external transcribed spacer sequence in hop, *Humulus lupulus* [J]. Breeding Science, 2001, 51(3):163 - 170.
- [26] Elisabetta M, Susanna P, Sandro C, et al. Sequence analysis of rDNA intergenic spacer region (IGS) as a tool for phylogenetic studies in *Trichoderma* spp. [J]. Journal of Zhejiang University, 2004, 30(4): 460 - 461.
- [27] Li Y Y, Shen S D, He L H, et al. Sequence analysis of rDNA intergenic spacer (IGS) of *Porphyra haitanensis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(2):187 - 193.