

紫菜属 DNA 条形码的研究进展

黄冰心, 李军 (汕头大学, 广东汕头 515063)

摘要 文中综述了 DNA 条形码作为一种新兴分类学技术的发展状况, 介绍了其与传统分类学相比的优缺点, 以及其在大型海藻中的应用现状, 并总结了大型海藻中常用到的一些 DNA 条形码作为紫菜属物种分类鉴定工具的适用性和有效性。

关键词 DNA 条形码; 大型海藻; 紫菜属

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00026-04

Research Progress on the DNA Barcoding of Porphyra

HUANG Bing-xin et al (Shantou University, Shantou, Guangdong 515063)

Abstract The progress of DNA barcoding as a new taxonomic technology was reviewed, the advantages and disadvantages were introduced by comparing with the traditional taxonomy, as well as the application status in the macroalgae. The suitability and effectiveness of DNA barcoding as a new method for the quick classification and identification of genus *Porphyra* were summarized.

Key words DNA barcoding; Marine benthic algae; *Porphyra*

紫菜是属红藻门(Rhodophyta)原红藻纲(Protofloridae-phyceae)红毛菜目(Bangiales)红毛菜科(Bangiaceae)紫菜属(*Porphyra*)的一大类群植物, 主要生长在沿海潮间带和潮下带上部。它们分布广泛, 从两极到热带地区都可见到。全世界目前发现的紫菜有 130 余种^[1]。其有性生活史包括孢子体世代和配子体世代, 配子体为人们所食用的紫菜叶状体, 外形简单, 由盘状固着器、柄和叶片 3 部分组成, 而孢子体即丝状体主要生长在贝壳、珊瑚藻和石灰岩等钙质上^[2]。紫菜具有很高的营养价值, 含丰富的蛋白质、脂肪、糖、无机盐、维生素等营养成分, 已被东亚国家作为商业化的主要经济海藻^[3-5]。因此, 紫菜物种或种质的精确鉴定在商业栽培中是非常重要的。据此, 笔者在文中对 DNA 条形码应用于紫菜的研究进展进行综述。

1 紫菜分类的现状

有关紫菜的分类研究已有 200 多年的历史, 传统分类鉴定主要是根据形态结构, 包括外部形态、藻体长度、宽度、厚度、颜色、繁殖结构和生殖细胞在叶片上的分布位置等特征^[6-12]。由于紫菜藻体形态结构比较简单, 其叶状体一般是由单层或双层细胞组成的膜状体, 很多物种仅凭借形态结构观察并不能被准确区分。

紫菜还可通过细胞学标记方法进行分类, 主要是以染色体的核型(染色体的数目、结构、随体的有无、着丝粒的位置)和带型对其进行分类^[13]。由于紫菜的染色体非常小, 因此其染色体的分析与观察难度很大^[14]。

随着分子生物学的发展, DNA 分子标记技术也得到了迅速发展, 它们被广泛应用于亲缘关系鉴别、系统分类鉴定、基因组作图、基因定位及遗传育种等方面。具有代表性的几种分子标记技术包括早期的限制性片段长度多态性

(RFLP)、建立在 PCR 基础上的随机扩增片段长度多态性(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单序列重复(SSR)和最近产生的单核苷酸多态性(SNP)等标记技术。其中, 前 3 种技术在紫菜遗传多样性和分子系统学研究中已得到广泛应用^[15]。近几年, 在对紫菜属未知物种和已知物种的分类鉴定和修订中, 应用较为流行的分子工具为“DNA 条形码”技术。最近, 利用“DNA 条形码”技术, 国际上将包括紫菜属的红毛菜科重新定义为不同的几个属, 即 *Pyropia*、*Wildemania*、*Porphyra*、*Bangia*、*Fuscifolium* 和 *Clymene* 等^[16]。

2 DNA 条形码概述

DNA 条形码是利用有足够变异且易扩增的相对较短的标准 DNA 片段, 在种内特异性与种间多样性中建立的一种新的生物身份识别系统, 从而实现对物种进行快速、准确地识别和鉴定。2003 年, 加拿大 Guelph 大学 Hebert 教授等首次正式提出了 DNA 条形码概念, 并于 2004 年成立了生物条形码联盟, 目前有来自 50 个国家的 200 多个组织成为其成员, 2007 年 5 月加拿大 Guelph 大学组建了世界上第 1 个 DNA barcoding 鉴定中心, 2009 年 1 月正式启动“国际生命条形码计划”。DNA 条形码的概念被提出后, 这种新兴分类学技术引起了越来越多生物学家的关注^[17]。DNA 条形码技术是分类学中辅助物种鉴定的新技术, 它代表了生物分类学研究的一个新方向^[18]。该技术分类鉴定标准化的实际意义在于可将来自世界各个不同实验室的结果进行比较, 从而实现物种的准确鉴定。

作为条形码的 DNA 序列必须满足: ①序列变异水平适宜, 可将不同物种彼此区分开来, 同时种内变异较小, 最大的种内碱基差异小于最小的种间碱基差异^[3]; ②变异区域两端的序列高度保守, 可设计在众多物种中稳定扩增的通用引物; ③扩增序列尽量短, 以便于 PCR 扩增和测序。

DNA 条形码技术克服了传统分类学所面临的难题, 可鉴定处于各生活阶段不同形态的生物, 能够将形态学相似或亲缘关系较近的 2 个物种区分开。目前, 通过 DNA 条形码数据库平台, 很快能找到对应的物种形态特征等方面的信息, 而且可发现很多隐性物种^[16,19]。通过 DNA 条形码技术,

基金项目 国家自然科学基金项目(31270257、31070185); 广东省科技计划项目(2011B031100010、2012A020200007); 汕头市科技计划项目(2011-162); 汕头大学科研启动项目(09400133、09400134); 汕头大学青年基金项目(YR11004)。

作者简介 黄冰心(1974-), 女, 福建莆田人, 副教授, 博士, 从事大型海藻学及海洋生物技术研究, E-mail: lpd2118@hotmail.com。

收稿日期 2012-11-13

分类学家可认识更多的生物物种,并进行快速鉴定。

关于 DNA Barcoding 的大量研究报道已见诸于相关学术刊物上,如 Nature、PNAS、Molecular Ecology Notes 等。同时,国际上也成立了诸多网站,如:加拿大 DNA 条形码研究中心(CCDB, <http://www.dna.barcoding.ca/>)、国际生命条形码计划(iBOL, International Barcoding of Life, <http://www.dna.barcoding.org/index.html>)、生命条形码数据系统(Barcode of Life Data Systems, <http://www.bold.systems.org/views/login.php>)、真菌编码网站(<http://www.all.fungi.org>)、鳞翅目编码网站(<http://www.lep.barcoding.org>)和鱼类编码网站(<http://www.fish.bol.org>)等^[20]。其中,研究大型藻类常用到的 DNA 条形码数据库有<http://www.barcoding.si.edu>、<http://www.barcodinglife.org>、<http://www.ibolproject.org>、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等,这些数据库为从事大型藻类物种鉴定和多样性研究的科研工作者提供了很好的交流平台。

3 大型藻类常用的 DNA 条形码

DNA 条形码在红藻与褐藻的种类鉴定和发现隐性的新物种方面已取得很大进步^[2,21-22]。目前大型藻类分类所用的 DNA 条形码主要有:UPA 片段(universal plastid amplicon)、*rbcl* 基因片段(1,5-二磷酸核酮羧化酶/氧化酶大亚基基因)、*matK* 基因片段(酪氨酸蛋白激酶基因)、*COI* 基因片段(细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因)、ITS 序列(核糖体非编码转录间隔区)、*LSU* 片段(核 28S rRNA 基因)、*SSU* 片段(核 18S rRNA 基因)、*rbcs* 片段(1,5-二磷酸核酮羧化酶/氧化酶小亚基基因)、*rbc* spacer 片段(*rbcl* 基因与 *rbcs* 基因之间的片段)、*cox2-3* spacer 片段(*COXII* 基因和 *COXIII* 基因之间的片段)等。

上述 10 种基因序列涉及到 3 个门类(红藻门、绿藻门、褐藻门)197 个属 403 种藻类,其中研究的样品多集中在红藻门,占 57.9%,而绿藻门仅占 5.8%;研究的基因片段主要是 *COI* 基因片段(26.3%)、ITS 序列(17.1%)、UPA 片段(12.9%)等。但由于各研究的基因序列、研究对象均不相同,因此并不能判断其使用的引物在所有大型海藻门类中的通用性及适用性情况。虽然在高等植物条形码中已取得了较为一致的意见,将叶绿体基因组 *rbcl* 基因和 *matK* 基因的部分序列作为标准的植物条形码核心序列,但在大型海藻的研究中,仍未得到通用性较好的片段作为 DNA 条形码。

4 DNA 条形码在紫菜属的研究现状

4.1 *COI* 基因片段(细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因) *COI* 基因片段是近几年来紫菜分类鉴定应用最多的条形码之一。与细胞核 DNA 相比,线粒体 DNA 进化的速率更快,在 2 个种群停止杂交繁殖、不再有基因交流后,一些特殊的变化将会在 2 个种群生物的线粒体 DNA 中积累起来,2 个种群的该类 DNA 将会出现差别,依据这种差别,就能够分辨出 2 个很相近的生物种群是否是不同种。*COI* 序列长度约 650 bp^[23-24],具有引物通用性高和进化速率快等优点。在麒麟菜属、卡帕藻属、江蓠属、紫菜属等的 *COI* 基因片段分析均显

示,该片段引物通用性强,在红藻中不同属之间差异明显,且种间变异明显大于种内变异,可分辨出近缘种,是较为理想的条形码片段^[2,25-27]。Saunders 等分析了红毛菜科的 *COI* 片段,其种内变异为 0~1.63%,平均变异为 0.136%;种间变异为 2.18%~21.6%,平均变异为 15.2%,种间差异明显大于种内差异,说明 *COI* 能很好的将红毛菜科不同物种区分开^[28]。

结合传统分类学,*COI* 序列作为紫菜 DNA 条形码具有鉴定物种多样性和发现隐性物种的潜力。目前数据库中含有大量的有关紫菜 *COI* 序列信息及多种相关引物,已公布的 *COI* 序列引物有 *GazF1* 和 *GazR1*^[29]、*CoxIR1*^[19]、*GWSFn*^[19]、*GWSRn*^[30-31] 和 *PORF1*^[32] 等。

4.2 *SSU* 片段(核 18S rRNA 基因) *SSU* 片段的研究多用于红藻门物种的分类鉴定。在紫菜属中的 *SSU* 片段研究显示,该片段可分辨出紫菜属藻类种间的差异^[33-34],但 *SSU* 序列比较保守,并不能将所有物种都区分开,不适合单独作为 DNA 条形码进行紫菜的物种鉴定。

4.3 PCR-RFLP(限制性片段长度多态性聚合酶链反应)分析 PCR-RFLP 是用 PCR 扩增目的 DNA,扩增产物再用特异性内切酶消化切割成不同大小片段,通过凝胶电泳所呈现条带的特异性区分物种。不同等位基因的限制性酶切位点分布不同,产生不同长度的 DNA 片段条带。该技术可通过 *SSU* rDNA、ITS、*rbcl* 等目的基因鉴定人工培养的 *P. yezoensis* 和 *P. tenera* 不同品系之间的差异以及同野生紫菜之间的系统发生关系^[35-38]。

4.4 *rbcl* 基因片段(1,5-二磷酸核酮羧化酶/氧化酶大亚基基因) *rbcl* 序列是叶绿体进行光合作用的关键基因片段,长度约 1 400 bp。该基因片段不仅是高等植物条形码的候选片段之一,在藻类中也被广泛应用。Yang 等扩增并分析了江蓠属 11 个种共 27 个样品的 *rbcl* 基因,发现该基因在江蓠属内各种间变异为 1.2%~12.6%,种内平均变异为 0.289%^[39]。Lin 等分析了红叶藻科的 *rbcl* 基因片段,在其建立的系统进化树中,红叶藻亚科、亮叶藻亚科和红肋藻亚科分别聚为 3 枝,但并不能进行更细层次上的鉴定^[40]。Saunders 等分析了红毛菜科的 *rbcl* 片段,发现其种内变异为 0~0.37%,平均变异为 0.059%;种间变异为 0.22%~10.7%,平均变异为 5.77%,基本上能将红毛菜的不同物种区分开^[28]。

rbcl 序列目前被作为 DNA 条形码广泛用于紫菜属物种的分类鉴定^[41]。由于在紫菜属的物种鉴定中 *rbcl* 序列几乎是研究者必选的 DNA 条形码之一,因此在 GenBank 中该序列的信息也是比较齐全的,便于参考和应用。然而,必须考虑的是,紫菜一些物种 *rbcl* 序列的种内差异和属内种间差异间存在着重叠,从而存在着将 2 个不同的物种鉴定为同一物种的可能性,所以需结合其他的 DNA 条形码共同使用。

4.5 UPA 片段(universal plastid amplicon) UPA 该片段是叶绿体 23 S rRNA 基因的 V 结构域,长度约 370 bp,虽然在其他光合植物中并未显著变异,但在藻类中鉴别能力较

强^[42]。Sherwood 等研究了 108 种藻类(包括 63 种红藻、19 种绿藻、14 种褐藻以及数种杂色藻)的 UPA 片段,结果显示其变异范围非常大,可将大多数藻类区分开^[43-44]。Conklin 等分析了麒麟菜属和卡帕藻属的 UPA 片段,发现虽然这 2 个属之间有明显的差异,但属内变异范围极小^[45]。Saunders 等分析了红毛菜科的 UPA 片段,发现该片段引物的通用性极高,能够将 85% 样品的 DNA 序列扩增成功,但并不能像 COI 片段和 *rbcL* 片段那样能将物种区分开,因此认为该基因片段不适合作为红毛藻科 DNA 条形码^[28]。

4.6 *cox2-3 spacer* 片段(*COXII* 基因和 *COXIII* 基因之间的片段) Zuccarello 等建议用 *cox2-3* 作为红藻门物种鉴定的分子标记^[46-48]。Conklin 等用该片段作为 DNA 条形码解决了 *P. spiralis* 和 *P. amplifolia* 的种群结构问题^[45]。Milestone 等也用该片段将 *P. acanthophora* 和 *P. spiralis* 及 *P. spiralis* 和 *P. drewiana* 区分开,证明了该片段比 COI 和 UPA 种间变异更大,种间变异在 13.7% ~ 25.0% 之间^[31]。但该基因片段在红毛菜科中应用的并不多,数据库中相关的信息也较少,还有待于进一步研究和考察。

4.7 ITS 序列(核糖体非编码转录间隔区) 真核生物中,ITS 序列由 ITS1、5.8S 和 ITS2 构成,其中 5.8S 基因相对保守,片段较短,而 ITS1 和 ITS2 所包含的序列高度可变。5.8S 基因通常与 ITS1 和 ITS2 共同使用。ITS 片段作为 DNA 条形码已被广泛应用于大型海藻的研究,主要集中在褐藻类群^[49-51],被证明适用于种下不同地理类群、种和属的亲缘关系研究。

4.8 *rbc spacer* 片段(*rbcL* 基因与 *rbcS* 基因之间的片段) 在红藻门紫菜属等样品中的分析表明,*rbc spacer* 片段对于系统分析来说太短且区分度不好^[2,52]。

4.9 *matK* 基因片段(酪氨酸蛋白激酶基因) *matK* 作为陆生植物条形码的候选片段得到了广泛的应用,然而在藻类中该片段的研究并不多,只有 Sanders 等研究了轮藻属、丽枝藻属、鸟巢藻属、丽藻属、拟丽藻属、灯枝藻属等 10 种绿藻的 *matK* 基因^[53]。

4.10 *LSU* 片段(核 28S rRNA 基因) 该片段在红藻中的研究均显示属内变异范围极小,只适合在科及以上水平的进行界定^[44,54]。

5 存在的问题及展望

与传统的分类学相比,DNA 条形码具有准确性高、快捷高效、样品要求低等优点,作为一种新兴技术对生物分类学研究的发展已起到了一定程度的推动作用,但也有不少专家对其持怀疑态度^[55]。他们首先认为条形码自身具有局限性,目前大型海藻使用的 DNA 条形码主要为线粒体和叶绿体基因,而两者均为单亲遗传,鉴定存在杂交现象的生物类群时具有缺陷性^[56-57]。有些生物类群存在不完全支系演化和杂交等基因渗入现象,DNA 条形码也很难将这样的类群区分开^[58-60]。再者是担心传统分类学可能被弱化或取代,而传统分类学成果是 DNA 条形码研究不可或缺的基石^[61],全面深入地弄清鉴定样品的形态学特征是 DNA 条形码研究正

确取样的前提^[62-63],脱离传统分类学而开展 DNA 条形码研究是很难想象的,不可能取得科学准确的成果^[64-65]。因此在生物分类和系统学研究时应将 DNA 条形码和传统的分类学结合起来,确保研究结果的准确性。

DNA 条形码在红藻的分类鉴定方面已有较多的应用,并已被证明非常有效,特别是在研究紫菜的多样性及发现隐性物种等方面比传统方法更有效。然而到目前为止,紫菜属 DNA 条形码的选择及其评价仍没有统一的标准,其形态分类学修订和 DNA 条形码研究的结合更是十分缺乏。DNA 条形码的应用主要集中在属内物种水平的鉴别,因此只有真正对紫菜属的物种进行探索和研究,发掘进化速率较快、分辨率高且通用性好的条形码,并将其与传统的分类学结合起来,才可能为建立完整的条形码数据库起到积极有效的作用。

参考文献

- [1] BRODIE J, BARTSCH I, NEEFUS C. New insights into the cryptic diversity of the North? Atlantic - Mediterranean 'Porphyra leucosticta' complex: *P. olivii* sp nov and *P. rosengurtii* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Eur J Phycol, 2007, 42: 3 - 28.
- [2] ROBBA L, RSELL S J, BARKER G L. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta) [J]. Am J Bot, 2006, 93(8): 1101 - 1108.
- [3] MEIER R, ZHANG G Y, ALI F H. The Use of Mean Instead of Smallest Interspecific Distances Exaggerates the Size of the "Barcoding Gap" and Leads to Misidentification [J]. Syst Biol, 2008, 57(5): 809 - 813.
- [4] NELSON W A, FARR T J, JUDY E S. Phylogenetic relationships and generic concepts in the red order Bangiales: challenges ahead [J]. Phycologia, 2006, 45(3): 249 - 259.
- [5] RUANGCHUAY R, NOTOYA M. Reproductive Strategy and Occurrence of Gametophytes of Thai Laver *Porphyra vietnamensis* Tanaka et Pham-Hoang Ho (Bangiales, Rhodophyta) from Songkhla Province [J]. Kasetsart J (Nat. Sci.), 2007, 41: 143 - 152.
- [6] 潘国瑛, 王永川. 我国紫菜属一新种——多枝紫菜 [J]. 海洋与湖沼, 1982, 13(6): 544 - 548.
- [7] 王素娟, 章景荣. 紫菜一新种——单孢紫菜的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1980, 11(2): 141 - 152.
- [8] 曾呈奎, 张德瑞. 中国两种新紫菜 [J]. 海洋与湖沼, 1978, 9(1): 76 - 83.
- [9] 张德瑞, 郑宝福. 福建紫菜一新种: 坛紫菜 [J]. 植物学报, 1960, 9(1): 32 - 36.
- [10] 张景荣, 王素娟. 紫菜一新种——福建紫菜的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(4): 356 - 361.
- [11] 郑宝福. 紫菜一新种——少精紫菜 [J]. 海洋与湖沼, 1981, 12(5): 447 - 453.
- [12] 郑宝福. 新种紫菜——青岛紫菜的描述 [J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(5): 419 - 424.
- [13] 王娟, 戴继勋, 张一昕. 紫菜减数分裂的研究现状及展望 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(3): 377 - 380.
- [14] 戴继勋, 沈颂东. 紫菜的细胞遗传学研究现状及展望 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(4): 538 - 640.
- [15] 汤晓荣, 潘光华, 徐东海. 紫菜分子遗传学研究进展 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(5): 687 - 692.
- [16] SUTHERLAND J E, LINDSTROM S C, NELSON W A, et al. A new look at an ancient order: generic revision of the Bangiales (Rhodophyta) [J]. Phycol, 2011, 47: 1131 - 1151.
- [17] 彭居刚, 王绪帆, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及应用 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 917 - 919.
- [18] XIAO J H, XIAO H, HUANG D W. DNA barcoding new approach of biological taxonomy [J]. Acta Zoologica Sinica, 2004, 50(5): 852 - 855.
- [19] LE GALL L, SAUNDERS G W. DNA Barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: A case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian Flora [J]. Journal of Phycology, 2010, 46: 374 - 389.
- [20] 程佳月, 王丽华, 彭科美, 等. 国际生命条形码计划 - DNA Barcoding [J]. 中国畜牧兽医, 2009(8): 49 - 53.
- [21] KUCERA H, SAUNDERS G W. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding [J]. Botany, 2008, 86(9): 1065 - 1079.

- [22] CLARKSTON B E, SAUNDERS G W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. [J]. Botany, 2010, 88(2): 119–131.
- [23] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond, 2003, 270: 96–99.
- [24] HEBERT P D N, GREGORY T R. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy [J]. Syst Biol, 2005, 54(5): 852–859.
- [25] CONKLIN K Y, KURIHARA A, SHERWOOD A R. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(6): 691–699.
- [26] YANG E C, KIM M S, GERALDINO P J, et al. Mitochondrial *coxI* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 161–168.
- [27] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society, 2005, 360: 1879–1888.
- [28] KUCERA H, SAUNDER G W. A Survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity [J]. J Phycol, 2012, 48: 869–882.
- [29] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Phil Trans R Soc, 2005, 360: 1879–1888.
- [30] SAUNDERS G W. Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia [J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 9: 140–150.
- [31] MILSTEIN D, MEDEIROS A S, OLIVEIRA E C. Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)? [J]. J Appl Phycol, 2012, 24: 837–845.
- [32] MCDEVIT D C, SAUNDERS G W. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights [J]. Phycologia, 2010, 49(3): 235–248.
- [33] BRODIE J, MORTENSEN A M, RAMIREZ M E. Making the links: towards a global taxonomy for the red algal genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 939–949.
- [34] BROOM J E, JONES W A, HILL D F, et al. Species recognition in New Zealand *Porphyra* using 18S rDNA sequencing [J]. Journal of Applied Phycology, 1999, 11(5): 421–428.
- [35] KYOSUKE NIWA, AKIRA MIZUTA, YUSHO ARUGA. Genetic characterization of a spontaneous green-type pigmentation mutant of *Porphyra yezoensis* and the significance of using heterozygous conchocelis in nori farming [J]. Fisheries Science, 2002, 68: 729–735.
- [36] KYOSUKE NIWA, ATSUSHI KOBIYAMA, YUSHO ARUGA. Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA [J]. Phycological Research, 2005, 53: 296–302.
- [37] NEEFUS C D, MATHIESON A C, BRAY T L. The distribution, morphology, and ecology of three introduced Asiatic species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) in the northwestern Atlantic [J]. J Phycol, 2008, 44: 1399–1414.
- [38] KYOSUKE NIWA, ATSUSHI KOBIYAMA. Simple molecular discrimination of cultivated *Porphyra* species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and related wild species (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Phycological Research, 2009, 57: 299–303.
- [39] YANG E C, KIM M S, GERALDINO P J, et al. Mitochondrial *coxI* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20: 161–168.
- [40] LIN S M, FREDERICQ S, HOMMERSAND M H. Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on large subunit rDNA and *rbcL* sequences, including the phycodryodeae, subfam [J]. Journal of Phycology, 2001, 37(5): 881–899.
- [41] KUCERA H, SAUNDERS G W. A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity [J]. Journal of Phycology, 2012, 48: 869–882.
- [42] PRESTING G G. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function [J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84(9): 1434–1443.
- [43] SHERWOOD A R, PRESTING G G. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria [J]. Journal of Phycology, 2007, 43(3): 605–608.
- [44] CONKLIN K Y, KURIHARA A, SHERWOOD A R. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(6): 691–699.
- [45] CONKLIN K Y, AKIRA KURIHARA, ALISON R, et al. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii [J]. Appl Phycol, 2009, 21: 691–699.
- [46] ZUCCARELLO G C, WEST J A. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia Radicans/B. Moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on north American Isolates [J]. Journal of Phycology, 2003, 39: 948–959.
- [47] D'ARCHINO R, NELSON W A, ZUCCARELLO G C. Invasive marine red alga introduced to New Zealand waters: First record of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2007, 41(1): 35–42.
- [48] GIUSEPPE ZUCCARELLO, BERNADETTE SANDERCOCK, JOHN WEST. Diversity within red algal species: variation in world-wide samples of *Spyridia filamentosa* (Ceramiales) and *Murrayella pericladodes* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies [J]. European Journal of Phycology, 2002, 37(3): 403–417.
- [49] LANE C E, LINDSTROM S C, SAUNDERS G W. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44: 634–648.
- [50] YOON H S, LEE J Y, BOO S M, et al. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) Based on Plastid – Encoded *rbcL* and *rbcL* Spacer and Nuclear – Encoded ITS Sequence comparisons [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 21(2): 231–243.
- [51] LI F, FENG J, XIE S L. Sequencing and analysis of ITS sequences of *Bangia atropurpurea* [J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(9/10): 45–46, 192.
- [52] BRODIE J, MORTENSEN A M, RAMIREZ M E, et al. Making the links: towards a global taxonomy for the red algal genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(5): 939–949.
- [53] SANDERS E R, KAROL K G, MCCOURT R M. Occurrence of *matK* in a *trnK* group II intron in charophyte green algae and phylogeny of the Characeae [J]. American Journal of Botany, 2003, 90: 628–633.
- [54] 乔利仙, 戴继勋, 郭宝太, 等. 分子标记技术在紫菜属中的应用现状及展望 [J]. 海洋科学, 2008, 32(9): 82–86.
- [55] EBACH M C, HOLDREGE C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy [J]. Nature, 2005, 434(7034): 697.
- [56] RUBINOFF D, CAMERON S, WILL K. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? [J]. Trend Ecol Evol, 2006, 21(1): 1–2.
- [57] WILL K W, MISHLER B D, WHEELER Q D. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy [J]. Syst Biol, 2005, 54(5): 844–851.
- [58] MORITZ C, CICERO C. DNA barcoding: Promise and pitfalls [J]. Plos Biology, 2004, 2(10): 354.
- [59] WHITWORTH T L, DAWSON R D, MAGALON H, et al. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protophormia* (Diptera: Calliphoridae) [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 274(1619): 1731–1739.
- [60] TOFFOLI D, HRBEK T, DE ARAÚJO M L G, et al. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) [J]. Genet Mol Biol, 2008, 31(1): 324–336.
- [61] FU M L, PENG J J, WANG Y, et al. Application and analysis of DNA barcoding [J]. Henan Shifan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of Henan Normal University (Natural Science)), 2010, 38(4): 118–122.
- [62] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biol, 2005, 3(12): 422.
- [63] DESALLE R. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff, Conserv [J]. Biol, 2006, 20(5): 1545–1547.
- [64] LIPSCOMB D, PLATNICK N, WHEELER Q, et al. The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(2): 65–66.
- [65] TAUTZ D, ARCTANDER P, MINELLI A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. Trends Ecol Evol, 2003, 18(2): 70–74.