

해조류로부터 Arbitrary 및 ITS Primer들을 사용한 직접 PCR 유전자 증폭반응의 한계

김용국 · 진형주 · 박선미 · 진덕희* · 홍용기[†]

부경대학교 생물공학과
*강릉대학교 해양생명공학부

Limits of Direct PCR Amplification from Seaweeds Using Arbitrary and ITS Primers

Long-Guo Kim, Hyung-Joo Jin, Sun-Mee Park, Deuk-Hee Jin*, and Yong-Ki Hong[†]

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Namku, Pusan 608-737, Korea

*Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Abstract

The random amplified polymorphic DNAs (RAPD) assay is a simple and useful tool in identification of appropriate genetic markers, that requires no knowledge of target DNA sequence. RAPD products were generated directly from seaweed tissues, without prior nucleic acid extraction, of *Porphyra yezoensis*, *Ulva pertusa* and *Undaria pinnatifida*. The nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) fragment however was not amplified directly from the seaweed tissues. Using DNA extracted by the LiCl method, both the ITS and RAPD's have been amplified by the polymerase chain reaction. RAPD of *P. yezoensis*, thallus (n) and conchocelis (2n) produced lots of different polymorphic bands (36-50%) depending on the arbitrary primers used. Difference was also observed between direct tissues amplification and DNA extracts amplification (53-57%). Thus it is important to use the same ploidy of tissue for DNA extraction and as a RAPD template.

Key words : DNA extraction, PCR, ploidy, RAPD, Seaweed

서 론

해조류의 분류 방법에 있어서 PCR (polymerase chain reaction)[11,15]과 같은 분자생물학적 기법의 개발로 인해 서 많은 변화를 가져왔다. 기존의 형태학적 분류의 한정성에서 벗어나 유전자 수준에서의 염기서열 차이를 밝힘으

로써 더욱 명확하게 되었다. 유전자 수준에서의 종의 구별은 주로 nuclear rDNA (ribosomal DNA)의 18S-rDNA인 SSU (small subunit)나 혹은 5.8S-rDNA에 대한 유전자 분석을 통한 분류학적 연구들[1,14,24]이 많이 수행되었으며, 또한 arbitrary primer를 이용한 RAPD (random amplified polymorphic DNAs)[2,20,23]를 이용하여 해조류 유전자집단

[†] Corresponding author

의 분석이나 지역간 종 간의 차이점 등을 분석한 연구들도 많이 있다[3,4,6,12,13,17,18]. 그러나 PCR 기법을 이용하여 유전자를 증폭하는데 있어서 template로 사용되는 DNA를 얻는데 많은 시간이 소요된다. 따라서 PCR 반응에 사용하는 template DNA를 추출하는 대신 해조류의 생 엽체나 생 사상체를 직접 PCR 반응tube에 넣어 PCR반응을 수행하였다. Unicellular algae 및 algal gametophyte에 대하여는 DNA를 추출하지 않고도 직접 PCR반응을 수행하여 유전자를 증폭할수 있다는 연구 결과도 있으며[5], 균체 및 포자같은 세포에 대해서도 직접적인 PCR반응을 행한 연구도 있다[8]. 그러나 해조류 엽체로부터 DNA 추출방법들은 Mays 등[9], Hong 등[7]에 의하여 알려져 있지만 해조체를 직접 DNA추출없이 PCR반응에 이용하여 본 경우는 없었다. 따라서 본 실험에서는 우선 방사무늬 김 (*Porphyra yezoensis*), 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*) 및 미역 (*Undaria pinnatifida*) 등의 엽체와 사상체에 대하여 DNA를 추출하지 않고 specific primer 혹은 arbitrary primer를 사용하여 PCR 하였을때 이들 haploid와 diploid의 PCR product를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

시료채집 및 전처리

실험에 사용한 홍조류 방사무늬 김 (*P. yezoensis*), 녹조류인 구멍갈파래 (*U. pertusa*) 및 갈조류인 미역 (*U. pinnatifida*)을 대상으로하여 이들의 각 엽체와 사상체 등은 초음파처리, Betadine처리 등으로 무균처리를 행하였다[12]. 다음 cap에 바늘구멍이 뚫린 15 ml cap tube에 넣고 cap을 닫은후 50 ml tube에 꺼꾸러 뽑아서 1000 rpm에서 1분간 원심분리시켜 탈수한후 얻은 조직들을 습중량으로 무게를 달았다. 해조류 조직으로부터 total DNA를 LiCl 방법[7]에 따라 추출하였다. 이때 시료는 0.1 g을 약 0.2 cm 씩 자른후 4ml lysis용액 (0.8M LiCl, 0.6% sarcosyl, 10mM EDTA, 0.2% PVPP, pH 9.0) 과 200 μ l β -mercaptoethanol을 넣고 잘섞은 다음 55 $^{\circ}$ C에서 10분간 열처리한후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕하여 DNA를 추출하였다.

PCR 반응에 직접 사용한 생 엽체거나 생 사상체의 경우는 무균화처리 과정을 거친 다음 습중량으로 시료 0.1 g을 0.3ml TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 속에서 homogenizer로 균질화시킨 후 1 μ l를 PCR 반

응tube에 넣어서 PCR반응을 행하였다.

PCR 반응조건

PCR 반응에 사용된 primer는 specific primer와 arbitrary primer 두가지 부류로 나누어 사용하였다. Specific primer 경우에는 핵의 5.8S-rDNA 전후의 ITS (internal transcribed spacer) 부위 증폭을 위하여 대표적으로 ITS1 (TCCGTGGTGAACCTGCGG)[22] 및 AB28 (ATATGCTTA-AGTTCAGCGGGT)[19]을 사용하였다. 그리고 arbitrary primer 경우에는 방사무늬 김의 엽체 및 사상체에 대한 RAPD 생성물을 만들 수 있는 OPA 20 (GTTGCGATCC)을, 미역의 엽체 및 배우체에 대한 RAPD 생성물을 만들 수 있는 OPA 19 (CAAACGTCGG), 구멍갈파래의 엽체에 대한 RAPD 생성물을 만들 수 있는 OPA 15 (TTCCG-AACCC)를 미리 선정하여 각각 비교 실험을 행하였다.

PCR 반응액 (25 μ l)은 1 μ l의 2.5mM dNTP, 2.5 μ l의 PCR buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3), 2 μ l의 25mM MgCl₂, 1 μ l의 12.5% Tween 20, 0.3 μ l의 Taq DNA polymerase (5u/ μ l), 1 μ l의 template DNA (1.5ng/ μ l) 혹은 1 μ l의 생 조직 (0.1g/0.3ml), 1 μ l의 specific primer (100 pmol/ μ l) 혹은 arbitrary primer (5 pmol/ μ l)를 사용하였다.

PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기반응후, specific primer를 사용하였을 경우에는 94 $^{\circ}$ C에서 1분간, 50 $^{\circ}$ C에서 1분간, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간의 cycle로 35회 반응시켰으며, arbitrary primer를 사용하였을 경우에는 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 36 $^{\circ}$ C에서 1분간, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간의 cycle로 45회 반응시켰으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 PCR 생성물을 충분히 extension 시켰다.

DNA 정량

각 해조류의 조직으로부터 추출된 DNA는 fluorometer (Hoefer TKO 100)로 정량하였으며 PCR 반응의 template DNA로 사용하기 위하여는 TE buffer로 최종농도가 1.5 ng/ μ l로 되게맞추었다.

Agarose gel 전기영동

증폭된 PCR product중 10 μ l를 0.5 μ g/ml의 EtBr가 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5배의 TAE buffer (20mM

Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 50V에서 90분 동안 전기영동을 진행하였다[16].

결과 및 고찰

해조류 조체로부터 total DNA를 추출할수 있는 LiCl방법에서 1시간 진탕과정을 생략한 방법으로 DNA를 추출하여 정량한 결과 PCR 반응에 충분한 량의 DNA를 얻을 수 있었으며 PCR 반응에서도 똑같은 product를 생성하였다. DNA추출의 경우 추출시간의 단축을 위하여, 우선 (1) LiCl방법을 기준으로하여 추출한 것, (2) 1시간의 진탕과정없이 추출한 것, (3) 1시간의 진탕과정없이 추출하고 남은 tissue를 4ml TE buffer에서 재추출한 것, (4) 1시간의 진탕과정없이 추출하고 남은 tissue를 다시 4ml lysis용액으로 재추출한 것으로 나누어 각각 추출된 DNA의 량을 정량하였다. 그 결과 Table 1과 같이 1시간의 진탕과정없이 추출한 경우 원래의 방법에 비하여 50-82% 정도의 비율로 DNA가 추출되어 나왔다. 이것은 엽체를 lysis용액에 넣은 다음 진탕을 하지 않아도 55℃에서 10분간의 열처리만으로도 lysis용액이 sample에 충분하게 작용한다는 것을 알수있었다. 방사무늬 김 엽체와 미역 엽체에 대하여 DNA를 추출하여 전기영동한 결과를 비교하여도 Table 1과 동일한 결과를 보였으며 방사무늬 김 엽체로 부터는 많은 RNA도 동시에 추출되어 나왔다 (data not shown). 또한 이것으로 적당한 template DNA농도하에서 PCR반응을 시켜도 RNA가 포함된 방사무늬 김의 경우에도 모두 똑같은 증폭된 band가 생겨났다 (data not shown). 따라서 DNA

추출의 경우는 추출된 DNA함량 및 PCR반응 정도를 고려하여 1시간 진탕과정을 생략한 LiCl방법을 채택하여 추출하였으며 이를 PCR의 DNA추형으로 비교 사용하였다.

생 엽체거나 생 사상체를 직접 PCR 반응 tube에 넣었을 때 초기 PCR반응은 94℃에서 5분간 가열하므로써 세포구조 및 단백질등의 변성을 일으켜 적은 량이나마 DNA의 추출이 일어날것으로 생각되어 직접 PCR반응을 시켜 보았다. 그 결과 방사무늬 김의 경우에는 arbitrary primer OPA-20을 사용하였을 때에는 사상체 추출 DNA, 엽체 추출 DNA, 생 사상체, 생 엽체 모두에서 PCR product를 얻을수 있었으며 크기는 약 1330bp였으나, specific primer를 사용하였을 경우에는 다만 사상체 추출 DNA, 엽체 추출 DNA에서만 product를 얻을수 있었으며 그 크기는 1170bp였다 (Fig. 1). 미역의 경우에는 arbitrary primer OPA-19를 사용하였을 때 배우체 추출 DNA, 엽체 추출 DNA, 생 배우체, 생 엽체 모두에서 PCR product를 얻을수 있었으며 크기는 약 1040bp였으나, specific primer를 사용하였을 경우에는 다만 배우체 추출 DNA, 엽체 추출 DNA에서만 product를 얻을수 있었으며 그 크기는 730bp였다 (Fig. 2). 구멍갈파래의 경우에는 arbitrary primer OPA-15를 사용하였을 때에 엽체 추출 DNA, 생 엽체 모두에서 PCR product를 얻을수 있었으며 그 크기는 약 1330bp였으나, specific primer를 사용하였을 경우에는 다만 엽체 추출 DNA에서만 product를 얻을수 있었으며 그 크기는 670bp였다 (Fig. 3). Arbitraty primer를 사용한 경우에는 방사무늬 김은 OPA-20, 미역은 OPA-19, 구멍갈파래는 생 OPA-15을 사용할 경우에 단일의 많은 PCR product를 생

Table 1. Comparison of the extracted DNA concentrations from the modified LiCl method. Each procedure has been omitted 1hr-shaking step and extracted DNA in lysis solution or TE buffer. The DNA amount was expressed as microgram per one gram wet weight of tissue.

	<i>P. yezoensis</i>		<i>U. pinnatifida</i>		<i>U. pertusa</i>
	Thallus	Conchocellis	Thallus	Gametophyte	Thallus
Procedure 1	43	26	54	29	98
Procedure 2	31	17	27	17	81
Procedure 3	11	14	13	14	21
Procedure 4	4	5	6	5	5

Procedure 1; original LiCl procedure. Procedure 2; extraction without 1hr-shaking step. Procedure 3; tissues, after processing like the 2nd procedure, were re-extracted in 4ml TE buffer. Procedure 4; tissues, after processing like the 2nd procedure, were re-extracted in 4ml lysis solution.

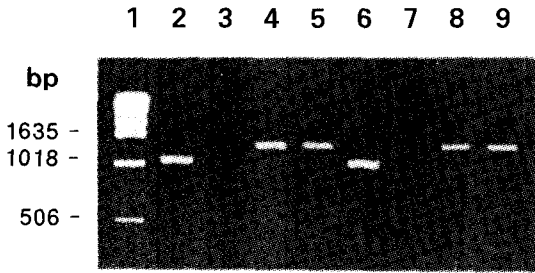


Fig. 1. PCR amplification of *P. yezoensis* with specific primer ITS1-AB28 and arbitrary primer OPA-20. Lane 1, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, using DNA extracted from conchocelis with specific primer. Lane 3, using live conchocelis with specific primer. Lane 4, using DNA extracted from conchocelis with arbitrary primer. Lane 5, using live conchocelis with arbitrary primer. Lane 6, using DNA extracted from thallus with specific primer. Lane 7, using live thallus with specific primer. Lane 8, using DNA extracted from thallus with arbitrary primer. Lane 9, using live thallus with arbitrary primer.

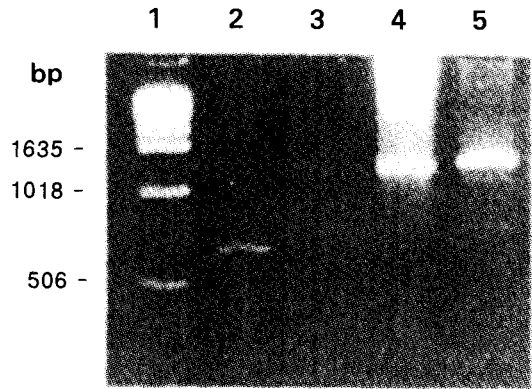


Fig. 3. PCR amplification of *U. pertusa* with specific primer ITS1-AB28 and arbitrary primer OPA-15. Lane 1, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, using DNA extracted from thallus with specific primer. Lane 3, using live thallus with specific primer. Lane 4, using DNA extracted from thallus with arbitrary primer. Lane 5, using live thallus with arbitrary primer.

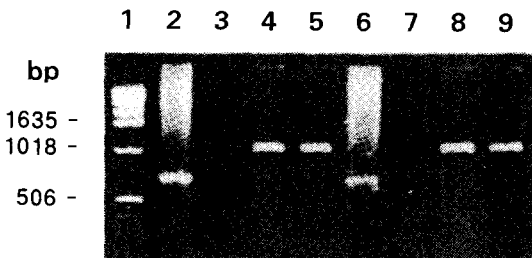


Fig. 2. PCR amplification of *U. pinnatifida* with specific primer ITS1-AB28 and arbitrary primer OPA-19. Lane 1, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, using DNA extracted from gametophyte with specific primer. Lane 3, using live gametophyte with specific primer. Lane 4, using DNA extracted from gametophyte with arbitrary primer. Lane 5, using live gametophyte with arbitrary primer. Lane 6, using DNA extracted from thallus with specific primer. Lane 7, using live thallus with specific primer. Lane 8, using DNA extracted from thallus with arbitrary primer. Lane 9, using live thallus with arbitrary primer.

산하였으므로 이들을 대표적으로 비교 실험에 사용하였다. 그러나 본 연구에서 사용한 모든 20종의 arbitrary pr-

imer에 대하여 haploid (엽체)와 diploid (사상체)의 경우 PCR product가 항상 똑같은 product를 생성하는 것인지의 여부를 조사한바 specific primer 경우에는 항상 같은 PCR product를 생성하였으나, arbitrary primer 경우에는 사용한 arbitrary primer에 따라 여러개의 서로 다른 band도 함께 생성하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 방사무늬 김을 대상으로 하여 대표적으로 arbitrary primer OPA-4, OPA-11, OPA-19를 사용하여 PCR한 결과 동일 엽체에서도 엽체 추출 DNA와 생 엽체 사이에서 다른 band가 생성되었으며, 엽체와 사상체 사이에도 추출 DNA 혹은 생 조직 공히 arbitrary primer에 따라 같은 band 혹은 다른 band가 생성됨을 볼수 있었다. 방사무늬 김의 엽체 및 사상체를 대상으로 하여 20종의 arbitrary primer를 사용하여 PCR시킨 RAPD 생성물들을 비교 정리한바 Table 2와 같다. 엽체에서 추출한 DNA에서 PCR한 결과 모두 62개의 band를 얻었는데 그중 생 엽체에서 생성된 band와는 57%가 서로 상이하였으며, 사상체 추출 DNA에서 생성된 band와는 36%만 상이하고, 생 사상체에서 생성된 band와는 55%가 서로 상이하였다. 즉 haploid와 diploid 사이를 비교하면 36-50%의 상이한 band를 나타내었으며, 생 조직

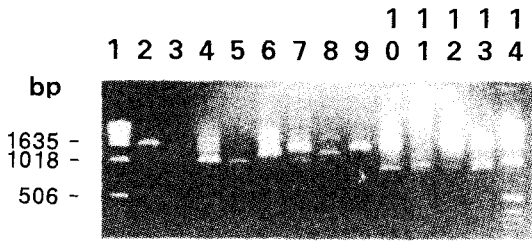


Fig. 4. Comparison of RAPD-PCR products of *P. yezoensis* with different arbitrary primers. Lane 1 and 14, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2-5, arbitrary primer OPA-4 (AATCGGGCTG). Lane 6-9, arbitrary primer OPA-11 (CAATCGCCGT). Lane 10-13, arbitrary primer OPA-19 (CAAACGTCCG). Lane 2, using DNA extracted from thallus with OPA-4. Lane 3, using live thallus with OPA-4. Lane 4, using DNA extracted from conchocelis with OPA-4. Lane 5, using live conchocelis with OPA-4. Lane 6, using DNA extracted from thallus with OPA-11. Lane 7, using live thallus with OPA-11. Lane 8, using DNA extracted from thallus with OPA-11. Lane 9, using live conchocelis with OPA-11. Lane 10, using DNA extracted from thallus with OPA-19. Lane 11, using live thallus with OPA-19. Lane 12, using DNA extracted from thallus with OPA-19. Lane 13, using live conchocelis with OPA-19.

Table 2. Percentage rate of different polymorphic bands of RAPD from *P. yezoensis* tissue and its DNA extract as PCR templates. Tissues are used as thallus (haploid) and conchocelis (diploid) cultured in laboratory. DNAs are extracted by modified LiCl method without 1hr-shaking step. Total number of amplified products revealed in each tissue is shown in the diagonal

	Haploid DNA	Haploid tissue	Diploid DNA	Diploid tissue
Haploid DNA	62	-	-	-
Haploid tissue	57	64	-	-
Diploid DNA	36	65	69	-
Diploid tissue	55	50	53	70

과 추출 DNA 경우를 비교하면 53-57%의 상이한 band를 나타내었다. 또한 haploid DNA와 diploid 생 조직, 그리고 diploid DNA와 haploid 생 조직 간의 경우를 비교하

면 55-65%의 더 많은 상이한 band를 확인할수 있었다.

이같은 사실은 홍조류 *Geldium vagum*에서 RAPD-PCR을 하였을 때 tetrasporophyte에서 똑같은 PCR product를 만드는것은 아니더라는 사실[13]과 RAPD방법으로 유전자 분석을 할때 동일한 ploidy를 사용하여야 정확한 결과를 얻을수 있다는 보고와 같은 결론을 얻을수 있다[20]. 따라서 집단적 수준에서 유전자의 차이점을 분석할때는 큰 문제가 되지 않지만, 작은 개체수의 분석에서는 haploid와 diploid 상태를 확정지어야 하며, 웅성과 자성의 상태도 확정지어야 RAPD-PCR을 하였을 때 보다 정확한 결과를 가져올수 있다고 여겨진다[10]. 또한 본 실험에서 arbitrary primer를 사용하였을 경우에는 엽체 혹은 사상체로부터 추출 DNA와 생 조직을 직접 사용한 경우에도 모두 PCR product를 생성할수 있었으므로 앞으로 실험 조건등을 개선하면 specific primer를 사용하여도 생 엽체 혹은 생 사상체등으로부터 DNA 추출없이도 직접 PCR반응에 사용할수 있게 되리라 기대된다.

요 약

PCR 기법을 응용한 RAPD 방법은 대상 생물의 유전 정보를 전혀 모르는 상태에도 arbitrary primer를 이용하여 증폭함으로써 생물 종간의 유전적 표식자를 확인할수 있는 간편하고 유익한 유전분석 방법이다. 이같은 RAPD 방법을 이용하여 해조류 방사무늬 김, 미역, 구멍갈파래에 대하여 DNA를 추출하지 않고 직접 생 엽체 및 생 사상체, 생 배우체를 PCR template로 사용하여 PCR product를 생산하였다. 그러나 specific primer를 이용한 nuclear r DNA의 internal transcribed spacer (ITS) 부위는 생성물을 만들지 못하였다. 간편한 LiCl 방법에 의하여 추출된 DNA를 사용하였을 때는 ITS 및 RAPD 모두 PCR product를 생산하였다. 방사무늬 김의 엽체 (haploid)와 사상체 (diploid)로부터 ITS 생성물은 동일하였으나 RAPD 생성물은 사용한 arbitrary primer에 따라 36-50%의 다른 band가 만들어졌다. 또한 직접 생 조직을 사용하였을때와 추출 DNA를 사용하였을 때도 53-57%의 다른 band가 만들어졌다. 그러므로 RAPD 방법으로 유전분석 실험에는 동일한 ploidy의 조직을 template로서 사용하는 것이 중요하다.

사 사

본 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업으로 수행된 결과입니다. 박선미는 부경대학교 해양식량자원개발 특성화 사업단 박사후전임연구원임.

참 고 문 헌

1. Bhattacharya, D., Elwood, H. J., Goff, L. J., and Sogin, M. L. 1990. Phylogeny of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) based on sequence analysis of its small subunit riosomal RNA coding region. *J. Phycol.*, **26**, 181-186.
2. Caetano-Anoll ̈s, G., Bassam, B. J., and Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonecleotide primers. *Bio/Technol.*, **9**, 553-557.
3. Cho, Y. C., Park, J. W., Jin, H. J., Nam, B. H., Sohn, C. H., Hong, Y. K. 1997. RAPD identification of Genetic variation in Ulvales. Seaweed. *J. Korean. Fish. soc.* **30**, 388-392.
4. Dutcher, J. A. and Kapraun, D. F. 1994. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, **6**, 267-273.
5. Galgani, F., Vincent, F., and Minier, C. 1994. Direct polymerase chain reaction from live algae. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 1-5.
6. Ho, C. L., Phang, S. M., and Pang, T. 1995. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *J. Appl. Phycol.*, **7**, 33-42.
7. Hong, Y. K., Kim, S. D., Polne-Fuller, M., and Gibor, A. 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.*, **7**, 101-107.
8. Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 282-287, Academic Press, San Diego.
9. Mayes, C., Saunders, G. W., Tan, I. H., and Druehl, L. D. 1992. DNA extraction methods for kelp (*Laminariales*) tissue. *J. Phycol.* **28**, 714-716.
10. Meneses, I. 1996. Assessment of populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) utilizing RAPDs. *J. Appl. Phycol.*, **8**, 185-192.
11. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalized chain reaction. *Method in Enzymology*. Vol. 155, pp. 335-350, Academic Press, New York.
12. Park, J. W., Cho, Y. C., Nam, B. H., Jin, H. J., Sohn, C. H., and Hong, Y. K. 1998. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta). *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 62-64.
13. Patwary, M. U., MacKay, R. M., and van der Meer, J. P. 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. Phycol.* **29**, 216- 222.
14. Rausch, H., Larsen, N., and Schmitt, R. 1989. Phylogenetic relationships of the green alga *Volvox carteri* deduced from small-subunit ribosomal RNA comparisons. *J. Mol. Evol.*, **29**, 255-265.
15. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Hom, G. T., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. pp. 18.88, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
17. Shin, J. A., Morikawa, N., Akita, H., and Miura, A. 1996. Polymerase chain reaction-based identification of varieties in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Aomori Univ. Aomori Jr. Coll.* **18**, 101-106.
18. Shin, J. A., Takeuchi, D., Akita, H., and Miura, A. 1995. Electrophoretic patterns of polymerase chain reaction products of sporothallus DNAs of varieties in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *J. Aomoru Univ. Aomori Jr. Coll.* **18**, 89-98.
19. Stean, D. A., McClure, B. A., Clark, A. E., and Kraft, G. T. 1991. Amplification of the polymorphic 5.8s rRNA gene from selected Australian gigartinean species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *J. Phycol.*, **27**, 758-762.
20. van Oppen, M. J. H., Klerk, H., de Graaf, M., Stam, W. T., and Olsen, J. L. 1996. Assessing the limits of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. *J. Phycol.*, **32**, 433-444.
21. Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
22. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal

- ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322, Academic Press, San Diego.
23. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531-6535.
24. Zechman, F. W., Theriot, E. C., Zimmer, E. A., and Chapman, R. L. 1990. Phylogeny of the *Ulvophyceae* (Chlorophyta): Cladistic analysis of nuclear-encoded rRNA sequence data. *J. Phycol.*, **26**, 700-710.