

16S rRNA 유전자의 일부 염기서열에 기초한 한국산 *Microcystis*의 계통 유연관계

김종인* · 임종헌¹ · 이재완 · 이해복

(청주대학교 생명과학과, ¹충청북도 보건환경연구원)

Phylogenetic Relationship of *Microcystis* (Cyanophyceae) Based on Partial 16S rRNA Gene Sequences in Korea

Kim Jong-In*, Jong Hun Lim¹, Jae Wan Lee and Hae-Bok Lee

Department of Life Science, Chongju University, Chongju 360-764 and

¹ChungCheongBuk-Do Institute of Health & Environmental Research, Chongju 361-290, Korea

Partial 16S rRNA gene sequences of seven cyanophycean strains from the National Institute of Environmental Research of Korea - *Microcystis aeruginosa*, *M. aeruginosa* f. *aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. viridis*, *Anabaena flos-aquae*, and *Oscillatoria sancta* - were analyzed and the phylogenetic relationship of *Microcystis* among Cyanophyceae were evaluated. Based on the sequence analysis results, *Microcystis* is monophyletic, the clade of which supported 100% bootstrap trees, and distinguished clearly from the other taxa. Therefore, the partial 16S rRNA gene sequences can be a useful and efficient tool for distinguishing *Microcystis* from other cyanophycean genera without axenic culture or cloning.

Key Words: Cyanophyceae, 16S rRNA, *Microcystis*, phylogeny

서 론

남조류 *Microcystis*속 식물은 폭발적으로 증식하여 유해 조류 대발생을 일으키고, microcystin 등의 독소를 함유하고 있으며, 악취와 독성 등으로 인간에게도 해를 주는 것으로 알려져 있다(Reynolds *et al.* 1981; Watanabe and Harada 1993; Park 1998).

한국산 *Microcystis*속 식물의 분류는 세포의 크기와 배열, 군체 및 군체점질초의 특징 등의 형태적 형질이 기준으로 적용되고 있으나(Lee *et al.* 1997), 이러한 식별형질은 인공배양에서 쉽게 변이를 나타내어 종을 동정하기가 어려울 뿐만 아니라, 기준 종의 설정과 유지도 쉽지 않아 많은 분류학적 문제를 안고 있다(Park 1998; Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001). *Microcystis*속 식물의 분류에 있어서

형태와 생태적 특성 이외의 보다 안정적인 식별형질을 찾는 분자유전학 연구가 시도되어 왔고, 그 결과 16S ribosomal RNA 유전자 부위(Nelissen *et al.* 1996; Ishida *et al.* 1997; Otsuka *et al.* 1998)와 16S-23S의 ITS 유전자 부위(Otsuka *et al.* 1999)가 이용되어 왔다. 최근에는 Bittencourt-Oliveira 등(2001)에 의한 phycocyanin intergenic spacer와 *cpcB* 및 *cpcA* 부위가 적용되고 있다. 이중 16S rRNA의 유전자 부위는 일반 미생물의 동정과 생태학적 특성을 추정하는데 매우 유용하게 적용되어 왔으나(Yeo *et al.* 1998), 남조류에 적용하기에는 무균배양과 클로닝 따위의 까다로운 조건이 필요하여 이를 이용한 남조류의 동정이나 생태학적 특징의 추적은 매우 어려웠다. Nübel 등(1997)이 남조류의 16S rRNA의 유전자에서 세균(eubacteria)에는 존재하지 않는 고유한 유전자 부위를 발견한 결과 무균배양이나 클로닝없이 남조류 식물체로부터 16S rRNA의 유전자 부위를 PCR 과정을 통해 직접 증폭할 수 있게 되었으며, 이러한 방법을 이용한 한국산 남조

*Corresponding author (joinkim@chongju.ac.kr)

Table 1. List of test strains from NIER

Strain No.	Species	Collection site	Collection date	Identifier
NIER-10001	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Daecheongho Reservoir	1990. 7. 1	Cheon Se-Uk
NIER-10002	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Wisconsin USA, ATCC22664		Specht D.T.
NIER-10008	<i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>aeruginosa</i>	Lake Kasumigaura, Ibaraki Japan, NIES87 1982. 9.	1996. 11. 22	Watanabe M.H.
NIER-10020	<i>Microcystis viridis</i>	South-Nakdong River	1996. 9. 10	Park Hae-Kyung
NIER-10023	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	South-Nakdong River	1996. 9. 10	Cheon Se-Uk, Park Hae-Kyung
NIER-10027	<i>Oscillatoria sancta</i>	Daecheongho Reservoir	1996. 10. 1	Cheon Se-Uk
NIER-10029	<i>Microcystis novacekii</i>	Youngsanho Lake	1995. 9. 1	Cheon Se-Uk, Park Hae-Kyung

Table 2. Morphological comparison of taxa used in this study

Species	Cell shape	Cell diam. (μm)	Colony shape*	Colony sheath*	External characteristics
<i>Microcystis aeruginosa</i>	spherical	3-4	irregular, elongated lobate, clathrate, reticulated, perforate	thin, diffluent	blue-green to yellow-green color, with gas vesicle
<i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>aeruginosa</i>	spherical	3-4	irregular, elongated lobate, clathrate, reticulated, perforate	thin, diffluent	blue-green to yellow-green color, with gas vesicle
<i>Microcystis viridis</i>	spherical	4-7	rectangular, cubic subcolonial unit	undulating	subcolonial unit form colony
<i>Microcystis</i> <i>ichthyoblabe</i>	spherical	2-3.2	spherical, irregular compound	thin	form soft aggregation of cell
<i>Microcystis novacekii</i>	spherical	3-5.5	spherical, moniliform	very thick mucilaginous	firm, dense aggregation of cell
<i>Anabaena flos-aquae</i>	spherical to elliptical	5-8 x 7-15			twisted spiral, floating, akinete near to heterocyst
<i>Oscillatoria sancta</i>	shortly cylindrical	10-20 x 4-5			straight, curved filamentous, trichome constricted at septum, thalli form membrane

*modified from Lee *et al.* (1997)

류의 염기서열 분석이 최근 Lee와 Bae(2001)에 의하여 *Oscillatoria*속 식물에 대하여 시도된 바 있다.

한국산 *Microcystis*속에 대한 분류학적 접근은 최근까지 형태학적 식별형질을 기초로 진행되어 왔고(Lee *et al.* 1997) 분자계통학 연구는 아직 미진하여 특히 16S rRNA의 유전자 부위를 적용한 연구는 아직 수행된 바 없다.

따라서 본 연구는 한국산 *Microcystis*속 식물의 계통 유연관계를 규명하기 위하여 일본산 식물 1종을 포함하여 5종의 *Microcystis*속 식물 - *M. aeruginosa*, *M. aeruginosa* f. *aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii* - 과 *Oscillatoria sancta* 및 미국산 *Anabaena flos-aquae*를 대상으

로 16S rRNA 유전자의 일부 염기서열을 조사하고 이를 분류학적으로 근연관계에 있는 남조류의 염기서열과 비교 분석하여 분류군들 사이의 유연관계를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료와 배양조건

본 연구에서는 한국산 *Microcystis*속 식물의 계통 유연관계 분석을 위하여 남조류 7종을 국립환경연구원(National Institute of Environmental Research: NIER)으로부터 분양 받아 실험재료로 이용하였다(Tables 1-2).

분양받은 시료는 무균작업대에서 멸균된 도립현미경으로 검경하면서 시료를 취하여 100 ml의 액체배지가 들어 있는 250 ml 삼각플라스크에 넣고 2-4주 동안 정체 및 진탕하여 계대배양하였다. 배양에는 CB배지(Watanabe and Nozaki 1994)를 사용하였고 온도 25°C에서 조도 2,000 lux, 16 L : 8 D의 광주기 조건으로 단조배양하였다.

세포의 수집

단조배양하여 일정량의 남조류가 생성되면 이를 원심분리하여 남조류 세포들을 수집하였다. *Microcystis aeruginosa* (NIER-10001)는 1,000 rpm으로 10분간, *M. aeruginosa* f. *aeruginosa* (NIER-10008)와 *M. ichthyoblabe* (NIER-10023)는 2,500 rpm으로 10분간, *M. viridis* (NIER-10020)는 3,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액과 침전물 이외의 나머지 용액을 제거한 후 다시 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하였으며, *Anabaena flos-aquae* (NIER-10002), *Oscillatoria sancta* (NIER-10027) 및 *M. novacekii* (NIER-10029)는 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 수집하였다. 수집된 세포들은 3회에 걸쳐 3차 증류수로 세척하였고 침전액 만큼의 증류수를 첨가한 후 초음파파쇄기 (50%, 0.5 sec)로 얼음 속에서 10초간 파쇄하였다. 파쇄된 세포들은 10,000 rpm으로 2-3분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후 사용하였다.

DNA 추출

남조류 세포에서 total genomic DNA의 추출은 Doyle and Doyle(1987)의 방법을 사용하여 수행하였고, 추출된 DNA는 0.8% agarose gel로 전개하고 EtBr로 염색하여 확인하였다.

PCR과 정제

16S rRNA 유전자 부위의 PCR 증폭을 위한 프라이머는 CYA 106F과 CYA 782R를 사용하였으며(Nübel et al. 1997), PCR product를 직접 염기서열분석에 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 pre-denaturation시킨 후 94°C에서 30초 동안 denaturation, 60°C에서 30초 동안 annealing, 그리고 72°C에서 2분간 extension으로 이루어지는 thermal cycle을 38회 반복하였고 72°C에서 10분간 최종 extension하여 반응을 완료하였다. 반응산물의 정제는 DNA-Pure™ PCR Clean Up Kit(CPG INC®, NJ, USA)를 사용하였다. 그리고 염기서열은 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer(Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

Table 3. Information of material used for 16S rRNA gene sequence analysis

Species	Strain number	Accession number
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIER-10001	AY065975*
<i>Anabaena flos-aquae</i>	NIER-10002	AY074799*
	<- ATCC22664	
<i>Microcystis aeruginosa</i> f. <i>aeruginosa</i>	NIER-10008	AY065974*
	<- NIES87	
<i>Microcystis viridis</i>	NIER-10020	AY065974*
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	NIER-10023	AY074800*
<i>Oscillatoria sancta</i>	NIER-10027	AY074801*
<i>Microcystis novacekii</i>	NIER-10029	AY074802*
<i>Anabaena flos-aquae</i> 1	NRC525-17	AF247597
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	NIES81	AF317632
<i>Lyngbya aestuarii</i>	PCC 7419	AB039013
<i>Lyngbya majuscula</i>	CCAP 1446/4	AF368300
<i>Lyngbya hieronymusii</i>	KCTC AG10199	AF337650
<i>Phormidium murrayii</i>	UTCC475	AF218374
<i>Phormidium ambiguum</i>	M-71	AB003167
<i>Spirulina subsalsa</i>	FACHB351	AF329394
<i>Spirulina laxissima</i>	SAG B256.80	Y18798
<i>Oscillatoria limnetica</i>	CR109510-1	AF410934
<i>Oscillatoria princeps</i>	KCTC AG10153	AF337649
<i>Oscillatoria priestleyii</i>	UTCC476	AF218375
<i>Oscillatoria neglecta</i>	M-82	AB003168
<i>Microcystis novacekii</i> 1	TAC65	AB012337
<i>Microcystis novacekii</i> 2	TAC20	AB012336
<i>Microcystis ichthyoblabe</i> 1	TAC48	AB012338
<i>Microcystis wesenbergii</i> 1	TC7	AB035553
<i>Microcystis wesenbergii</i> 2	NIES111	D89034
<i>Microcystis wesenbergii</i> 3	NIES112	U40334
<i>Microcystis wesenbergii</i> 4	TAC52	AB012335
<i>Microcystis viridis</i> 1	CC9	AB035552
<i>Microcystis viridis</i> 2	NIES102	D89033
<i>Microcystis viridis</i> 3	NIES102	U40332
<i>Microcystis viridis</i> 4	TAC78	AB012331
<i>Microcystis viridis</i> 5	TAC17	AB012328
<i>Microcystis aeruginosa</i> 1	UWOCC P3	AF139314
<i>Microcystis aeruginosa</i> 2	UWOCC AK-1	AF139303
<i>Microcystis aeruginosa</i> 3	UWOCC 019	AF139295
<i>Microcystis aeruginosa</i> 4	NIES87	D89031
<i>Arthroacter roseus</i>	CMS90	AJ278870

*present study

염기서열과 유연관계 분석

염기서열의 편집은 EditView 프로그램(v. 1.01; ABI PRISM)과 BioEdit 프로그램(v. 5.0.9; Hall 1999)을 이용하였으며, 정렬은 CLUSTAL W 프로그램(Thomson et al. 1994)을 사용하였다.

염기서열 자료를 통한 계통 유연관계 분석에서 최대우사분석(Maximum-likelihood analysis)은 PHYLIP(the

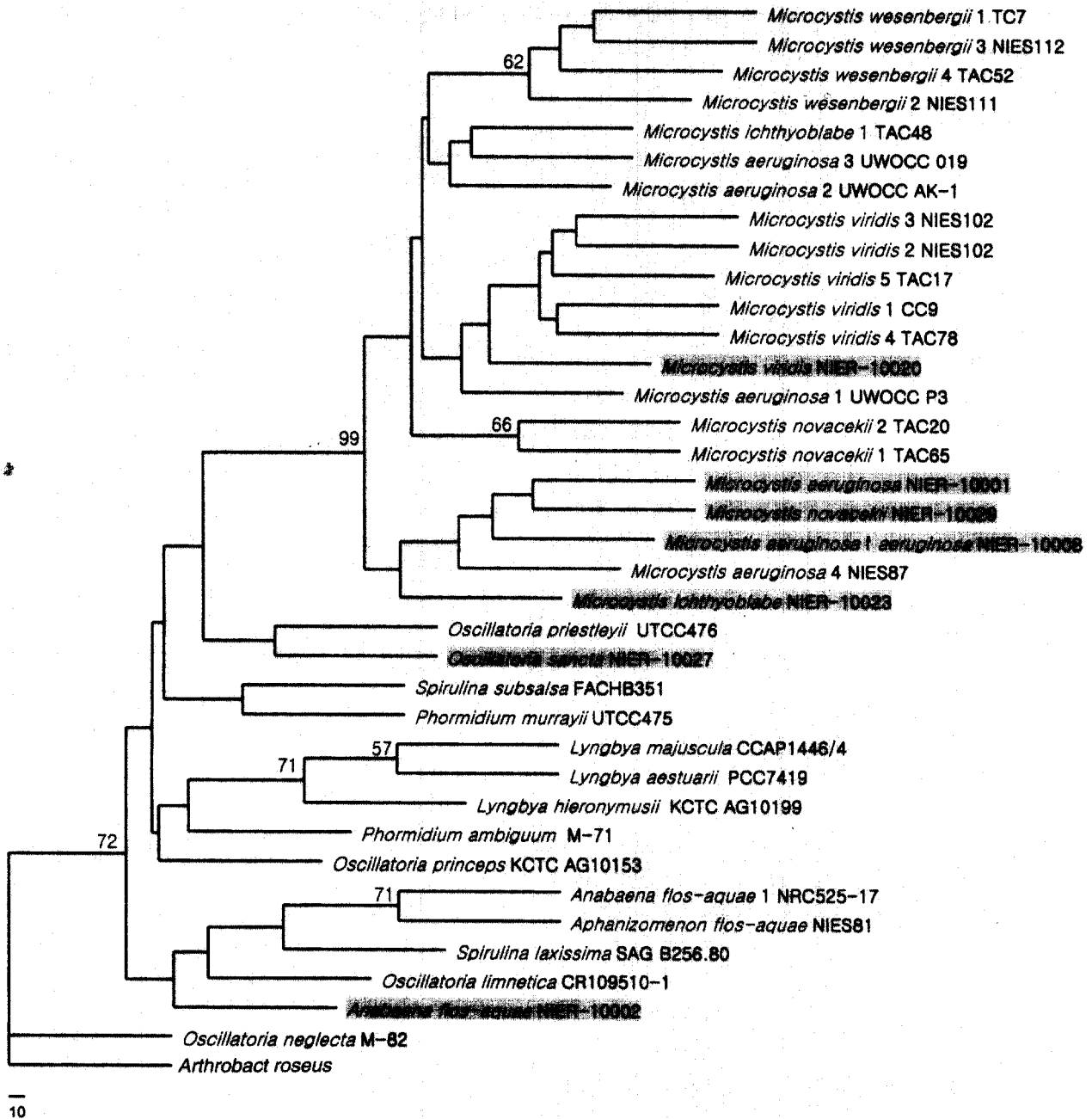


Fig. 1. Distance tree based on an alignment of 37 partial 16S rRNA gene sequences from Cyanophyceae, constructed by means of the maximum-likelihood method. Value above branches represent percentages of 100 bootstrap replicates. Branches lacking values received less 50% bootstrap support. The scale bar indicateds 10 substitutions per nucleotide.

PHYLogeny Inference Package, v. 3.573c, Felsenstein 1999) 프로그램을 이용하였고, 근린결합분석(Neighbor-joining analysis)은 MEGA 프로그램(v. 2.1: Kumar et al. 2001)을 사용하였다.

최대유사분석은 DNAML 프로그램(Felsenstein 1999)을 이용하였고, bootstrap 분석은 100회 실시하였으며 근린결합분석은 Kimura-2 parameter 그리고 transition : transversion의 비율은 2.0으로 가정하여 계산하였고 일치계통

수를 작성하기 위하여 1,000회의 bootstrap을 실시하였다.

결과 및 고찰

한국산 *Microcystis*속 식물의 계통 유연관계를 규명하기 위하여 일본산 및 미국산 식물들 각 1종씩 포함하여 *Microcystis*속 식물 5종, *Anabaena*속 식물 1종 및 *Oscillatoria*속 식물 1종, 도합 7종의 분류군에 대하여

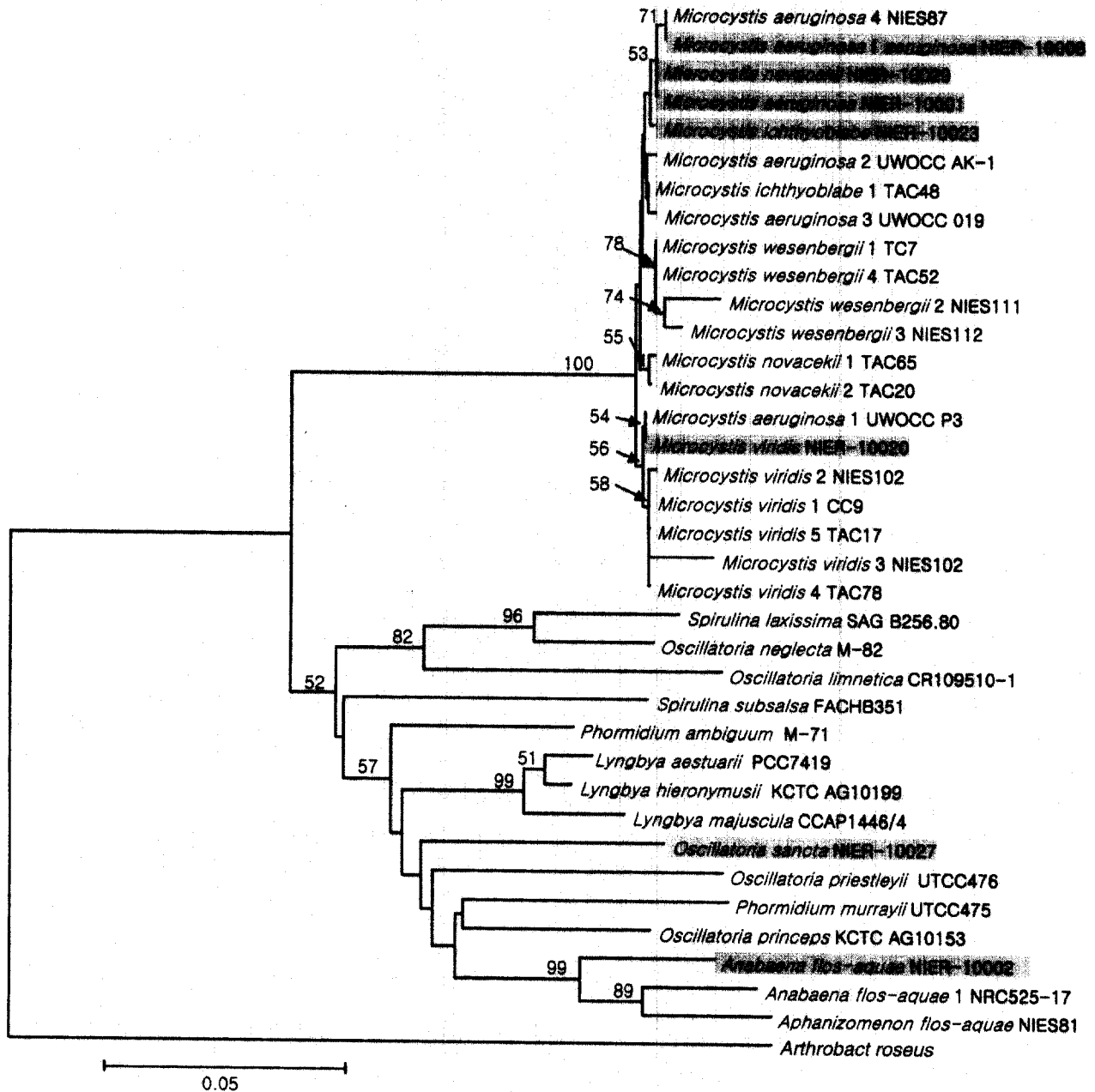


Fig. 2. Distance tree based on an alignment of 37 partial 16S rRNA gene sequences from Cyanophyceae, constructed by means of the neighbour-joining method. Value above branches represent percentages of 1000 bootstrap replicates. Branches lacking values received less 50% bootstrap support. The scale bar indicated 0.05 substitutions per nucleotide.

ribosomal RNA gene의 16S 유전자의 부분 염기서열이 분석되었다. 분석결과, 확인된 16S rRNA 부분 염기서열은 *Microcystis*속의 경우 *M. viridis*가 611개로 가장 길었으며 *M. aeruginosa* f. *aeruginosa*는 601개, *M. aeruginosa*는 594개, *M. ichthyoblabe*는 578개였고 *M. novacekii*는 566개로 가장 짧았다. 또한 *Anabaena flos-aquae*와 *Oscillatoria sancta*는 각각 571 및 555개의 염기서열이 결정되었다(Table 3).

본 연구에서 분자계통 유연관계를 밝히기 위하여 비교 분석된 염기서열은 이미 발표된 남조류를 포함하여 총 8속 37개 분류군의 염기서열이었으며 외부군으로는 *Arthrobacter roseus*가 이용되었다. 자료분석에 사용된 분류군들의 염기서열은 559개로 이들의 G+C 비율은 52.9-55.8%의 범위였으며 외부군으로 설정한 *Arthrobacter roseus*의 경우 57%였다(Table 3).

분석된 각 분류군내의 pairwise distance는 *Microcystis*

속이 0.009로 가장 작았고(variable site 27개 parsimony-informative site 9개), *Lyngbya*속 0.027(variable site 25개), *Anabaena*속 0.059(variable site 31개), *Phormidium*속 0.111(variable site 57개), *Spirulina*속 0.127(variable site 62개) 그리고 *Oscillatoria*속이 0.138(variable site 128개 parsimony-informative site 58개)로 가장 크게 나타났다.

최대유사분석 결과 *Oscillatoria neglecta*를 제외한 모든 분류군은 72% bootstrap 값으로 지지되는 단계통군을 형성하였다. 이 단계통군의 수형은 *Anabaena flos-aquae* 1과 *Aphanizomenon flos-aquae* 및 *Lyngbya*속의 분류군들이 각각 71% bootstrap 값으로 지지되었고, *Microcystis*속의 분류군들은 99% bootstrap 값으로 지지되는 계통군을 형성한 반면, 나머지의 분류군들은 대부분 50% 이하의 bootstrap 값으로 서로 다른 속의 분류군과 혼합 분포하여 계통적으로 명확히 분석되지 않았다(Fig. 1). 근린결합분석 결과 *Microcystis*속은 100% bootstrap 값으로 지지되는 단계통군을 형성하였고, *Anabaena*속, *Aphanizomenon*속, *Lyngbya*속, *Oscillatoria*속, *Phormidium*속 및 *Spirulina*속의 분류군들은 52% bootstrap 값으로 지지되는 별도의 계통군을 형성하였고, 이들은 서로 다른 속의 분류군과 혼합 분포하여 계통적으로 명확히 분석되지 않았다(Fig. 2). 즉 *Microcystis*속 이외의 속은 분자계통 유연관계가 기존의 형태 분류체계와 무관하였고 이는 Ishida 등(1997)과 Lee와 Bae(2001) 및 Otsuka 등(1998)의 결과와 동일하였다. 특히 Lee와 Bae(2001)는 *Oscillatoria*속의 16S rRNA 유전자는 중하위분류군 상호간 매우 달라서 형태 분류체계가 분자계통 유연관계를 반영하지 못한다고 지적한 바 있다.

한편 *Microcystis*속의 분류군들은 99-100% bootstrap 값으로 지지되는 단계통군을 형성하여 남조류의 다른 속과는 분명하게 구분되나, 단계통군 내에서는 형태 유사성과는 무관하게 분포하였다. 이러한 결과는 한국산 식물 역시 마찬가지여서 Otsuka 등(1998)의 결과와 같았다. *Microcystis*속의 분류군들의 분자계통이 기존의 형태 특징을 기초로 한 분류체계와 무관한 것에 대하여 Otsuka 등(1998)은 *Microcystis*속 분류군들의 16S rRNA 유전자는 매우 유사하여 형태 분류체계가 분자계통 유연관계를 반영하지는 않는다고 언급한 바 있다.

따라서 남조류 전체의 분자계통 연구에서 16S rRNA 유전자 부위의 적용은 계통 유연관계 파악에 충분하지는 않으나, 무균배양이나 클로닝 등의 까다로운 과정 없이 *Microcystis*속의 한계를 결정하는 효율적인 형질로 생각되며 형태적 특성이외의 유용한 식별형질로 판단된다. 앞으로 남조류에 대한 올바른 분류체계를 정립하기 위하여서는 계통적으로 유효한 분자생물학 정보가 광범위하게 적

용되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구를 위해 많은 도움을 주신 이옥재 박사님에게 감사드립니다. 본 실험에 사용된 재료는 국립환경연구원 환경미생물종균관리실에서 분양되었습니다.

참고문헌

- Bittencourt-Oliveira M.C., Oliveira M.C. and Bolch C.J.S. 2001. Genetic variability of brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). *J. Phycol.* 37: 810-818
- Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- Felsenstein J. 1999. PHYLIP Phylogeny inference package, ver. 3.573c. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Ishida T., Yokota A. and Sugiyama J. 1997. Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 237-241.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lee W.J. and Bae K.S. 2001. The phylogenetic relationship of several oscillatorioid cyanobacteria, forming blooms Daechong Reservoirs, based on partial 16S rRNA gene sequences. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 504-507.
- Lee J.A., Choi A.R. and Watanabe M. 1997. Taxonomic implications of the genus *Microcystis* (Cyanophyceae) from the Naktong river. *Algae* 12: 167-176.
- Nelissen B., De Baer R., Willmonte A. and De Wachter R. 1996. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J. Mol. Evol.* 42: 194-200.
- Nübel U., Garcia-Piche F. and Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Park H.K. 1998. Physio-ecological study on Korean freshwater cyanobacteria, *Microcystis* spp. Diss. Pap. Ph. D. KNU. 146 pp.
- Reynolds C.S., Jaworski G.H.M., Cmiech H.A. and Leedale G.F. 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Kutz. Emend. Elenkin. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 293: 419.
- Otsuka S., Suda S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Masumoto S. and Watanabe M.M. 1998. 16S rDNA sequences and

- phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 119-124.
- Otsuka S., Suda S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Masumoto S. and Watanabe M.M. 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**: 15-21.
- Thompson J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Watanabe M.F. and Harada K.I. 1993. Toxic water bloom of blue-green algae: biological and chemical characteristics. *Jpn. J. Limnol.* **54**: 225-243.
- Watanabe M.M. and Nozaki H. 1994. *NIES-collection list of strains*. 4th ed. pp. 32.
- Yeo I.H., Han S.K., Yu J.H. and Bai D.H. 1998. Isolation of novel alkalophilic *Bacillus alcalophilus* subsp. YB380 and the characteristics of its yeast cell wall hydrolase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 501-508.

Accepted 24 August 2002

J.-I. Kim. Morphology and *rbcL* sequences of *Caulacanthus okamurae* Yamada (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea [Erratum]

Some corrections are given in the article entitled "Morphology and *rbcL* sequences of *Caulacanthus okamurae* Yamada (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea" by Hae-Bok Lee, Jae Wan Lee, Han-Gu Choi, Wook Jae Lee and Jong-In Kim, *ALGAE* 16(1): 25-34. In the captions of Figs 1-3 on page 28, "Fig. 1. Vegetative plant. Fig. 2. Tetrasporophyte. Fig. 3. Carposporophyte." is corrected as "Fig. 1. Carposporophyte. Fig. 2. Vegetative plant. Fig. 3. Tetrasporophyte." And for the three scale legends "150 μm " also read "1500 μm ".