

미토콘드리아 *coxIII* 유전자 염기서열에 의한 수 종의 한국산 장고말속 식물(녹조식물문)의 계통분류학적 유의성

문병렬 · 이옥민*

(경기대학교 생물학과)

A Phylogenetic Significance of Several Species from Genus *Cosmarium* (Chlorophyta) of Korea Based on Mitochondrial *coxIII* Gene Sequences

Byungryeol Moon and Ok-Min Lee*

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-470, Korea

It has been considered that genus *Cosmarium* including *Staurastrum* had the problems in grouping by morphological characters. Sequence data for the Cytochrome Oxidase subunit III (*coxIII*) were employed to compare with taxa of two divisions of this genus, with sections in each, for evaluating the taxonomic stability of these morphological characters. The division and section systems were not coincided with the phylogeny inferred from *coxIII* sequences, as the previous reports from us using nuclear rDNA ITS and chloroplast *rbcL* sequence comparisons in this genus. Two taxa of *Staurastrum* were not placed within a same clade each other, and one taxon of these was grouped in *Arthrodesmus* clade. Two genera, *Cosmarium* and *Staurastrum*, cannot be regarded as monophyletic from this result. Mitochondrial *coxIII* gene was considered as a useful phylogenetic tool to evaluate evolutionary relationships of desmids as in the case of land plants.

Key Words: *Cosmarium*, *coxIII*

서 론

장고말속(*Cosmarium*) 식물과 팔장고말속(*Staurastrum*) 식물은 각각 전 세계적으로 1,000분류군 이상이 보고되어 있다(Prescott *et al.* 1981, 1982). 우리나라의 물면지말류 식물은 27속 315종 225변종 53품종으로 총 593분류군이 보고되어 있으며, 이중 장고말속 식물은 60종 41변종 14품종인 총 105분류군이 보고되어 있으며, 팔장고말속 식물은 57종 32변종 6품종으로 총 95분류군이 보고되어 있다. *Arthrodesmus*속은 2종 3변종이 보고되어 있다(Chung 1993).

본 식물군에 대한 국외의 연구는 식물상이 완성된 단계이며(West and West 1905; Prescott *et al.* 1981, 1982), 최근에

는 집합 녹조식물의 계통학적 연구를 위해서 *rbcL* 염기서열을 통한 연구와(McCourt *et al.* 2000) 핵 rDNA 염기서열을 통한 연구 등이 있으며(Gontcharov *et al.* 2003), 또한 엽록체 rRNA 유전자 등 다양한 유전자 염기서열을 통한 계통학 연구가 이루어지고 있다(Besendahl *et al.* 2000; Turmel *et al.* 2002). 국내에서는 아직까지 식물상에 대한 연구가 완성되지 못한 상태이며, 장고말속 식물 9종과 팔장고말속 1종에 대하여 핵 rDNA의 ITS 부분의 염기서열을 통한 계통학 연구가 수행된 바 있다(Lee 2001). 또한 팔장고말속 12분류군과 장고말속 18분류군에 대한 *rbcL* 유전자의 염기서열과 형태 형질을 비교한 연구가 수행되었다(Nam and Lee 2001a, b).

두 속의 식물은 대부분의 물면지말류와 같이 주로 형태 식별형질에 의하여 분류되고 있다. 반세포의 형태, 세포벽 무늬와 돌기 유무 등에 따라 division I, II로 나뉘고, 각 division은 반세포의 형태에 따라 세분되어 있다(Prescott *et al.* 1981, 1982). 이러한 형태 형질에 의한 division과 sec-

*Corresponding author (omlee@kyonggi.ac.kr)

본 연구는 경기대학교 교내연구비(2001-033) 지원에 의해 연구되었음.

Table 1. Taxa sampled in this study

Taxon	Collection site	Section ¹	GenBank Acce. No.
<i>Cosmarium formosulum</i> Hoffman	Boryung-gun, Chungchungnam-do	II-A	AY266339
<i>C. furcatospermum</i> var. <i>koreanum</i> Skvortzow	Singal lake, Kyonggi-do	II-C	AY266341
<i>C. granatum</i> Breb.	Singal lake, Kyonggi-do	I-C	AY266337
<i>C. obtusatum</i> Schm.	Buksamri, Kyonggi-do	I-C, II-A	AY266338
<i>C. rectangulare</i> Grun.	Jumunjin, Kangwon-do	I-F	AY266340
<i>C. subcostatum</i> Nordts.	Paldang lake, Kyonggi-do	II-A, I-F	AY266336
<i>Staurastrum dejectum</i> Breb. ex Ralfs	Jangchuk lake, Kyongsangnam-do	I-E	AY266344
<i>S. punctulatum</i> Breb.	Daesan, Kyongsangnam-do	I-C	AY266342
<i>Arthrodesmus validus</i> Scott & Gronblad	SVCK 457 ²		AY266343

¹Taxonomic treatment followed Prescott *et al.* (1981, 1982)

²SVCK-Sammlug von Conjugaten-Kulturen, University of Hamburg, Germany

tion의 분류는 핵 rDNA의 ITS 부분과 *rbcL* 유전자의 염기서열에 의한 분류와 비교한 결과, 각 division과 section간에 부분적으로 일치하지 않았다(Lee 2001; Nam and Lee 2001a, b). Gontcharov *et al.* (2003)은 핵 rDNA 염기서열을 통하여 접합녹조류의 계통학적 연구를 수행한 결과, 물면지말목 식물은 단계통 임이 확인되었지만, 물면지말류중 많은 속들이 다계통인 것으로 나타났다. 특히 장고말속과 팔장고말속 식물은 두 속간 한계가 불분명하여 중간적 특성을 나타내는 종들이 존재하고 따라서 두 속을 여러 개의 단계통적 속 또는 아속으로 재편하려는 시도가 있어 왔다(Prescott *et al.* 1982).

본 연구에서는 미토콘드리아 *coxIII* (Cytochrome oxidase subunit III) 유전자 염기서열의 비교를 통하여 장고말속식물의 division과 section 분류와 비교함으로써 이러한 중요한 식별형질의 안정성을 검토하고자 하였다. 또한 본 연구에 포함된 팔장고말속 식물과 장고말속 식물을 비교함으로써 두 속간의 분류학적 한계에 대한 검토를 하고자 하였다. *Arthrodesmus*속 1종의 식물은 팔장고말속 식물과 유연관계가 깊은 속으로서(Prescott *et al.* 1982) 장고말속과 팔장고말속간 거리를 비교하기 위하여 사용되었다. 식물 계통학 연구에 있어서 *coxIII* 유전자는 대표적 육상식물의 연구(Hiesel *et al.* 1994a, 1994b) 외에는 아직까지 사용된 바 없으므로 녹조식물에 속하는 분류군들에 있어서 *coxIII* 유전자의 분류학적 유용성을 살펴보고자 하였다.

재료와 방법

본 연구에서 사용된 식물은 경기도, 강원도와 경상남도의 강과 호소에서 채집된 것이며, *Arthrodesmus validus* (SVCK 457)는 독일의 Hamburg 대학의 접합조류 배양실로부터 분양받은 것이다. 이들은 경기대학교 생물학과에 위치한 담수

조류 배양실에서 배양, 보존되고 있다(Table 1). 장고말속과 팔장고말속 식물의 속간 한계를 검토하기 위하여 7종류의 장고말속 식물과 2종류의 팔장고말속 식물을 선택하였으며, *Arthrodesmus validus*는 두 속에 대한 속간 거리를 비교하기 위하여 선택되었다.

장고말속 식물과 팔장고말속 식물은 Bold's Basal 배지(Bold and Wynne 1978)를 사용하였고, *Arthrodesmus*는 WEES 배지(Kies 1967)를 사용하여 대량 배양하였다. 사용된 모든 분류군은 25°C, 16:8의 일장주기, 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광 조건하에서 배양되었다. 순수 분리된 각 분류군은 DNA 추출을 위하여 10-14일간 대량 배양되었다. 약 0.2 g의 시료를 액체질소를 사용하여 막자사발에서 분말상태로 분쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

PCR을 통한 *coxIII* 유전자 부위의 증폭을 위해 COXIII-1 (5'-CACTGGGAGCTTTGGCAAGTAC-3')와 COXIII-2 (5'-CAGCTGCTTCAAAGCCAAAGTGA-3')를 primer로 사용하였다.

PCR시 대략 40 ng의 DNA, 5 μl 의 10X buffer, 1 μl 의 2.5 mM dNTP, 1 unit의 Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea), 각각 100 pmol의 primer pair로 조성된 총 50 μl 시료를 사용하여 증폭하였다. DNA 증폭 시 최초 94 에서 4 분간 pre-denaturation 한 후, 94°C 30초(denaturation), 45°C 30초(annealing), 72°C 1분(extension)의 조건으로 30 회 반복하였으며, 마지막으로 72°C 10분(final-extension)으로 반응을 종결하였다. 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep™ Gel Purification Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 순수 분리 정제하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물은 T4 DNA polymerase(MBI Fermentas, Lithuania)를 사용하여 T-vector인 pBlueXcm vector에 ligation한 후, *E. coli* strain DH5 α F'에 형질전환 하였다(Sambrook *et al.* 1989).

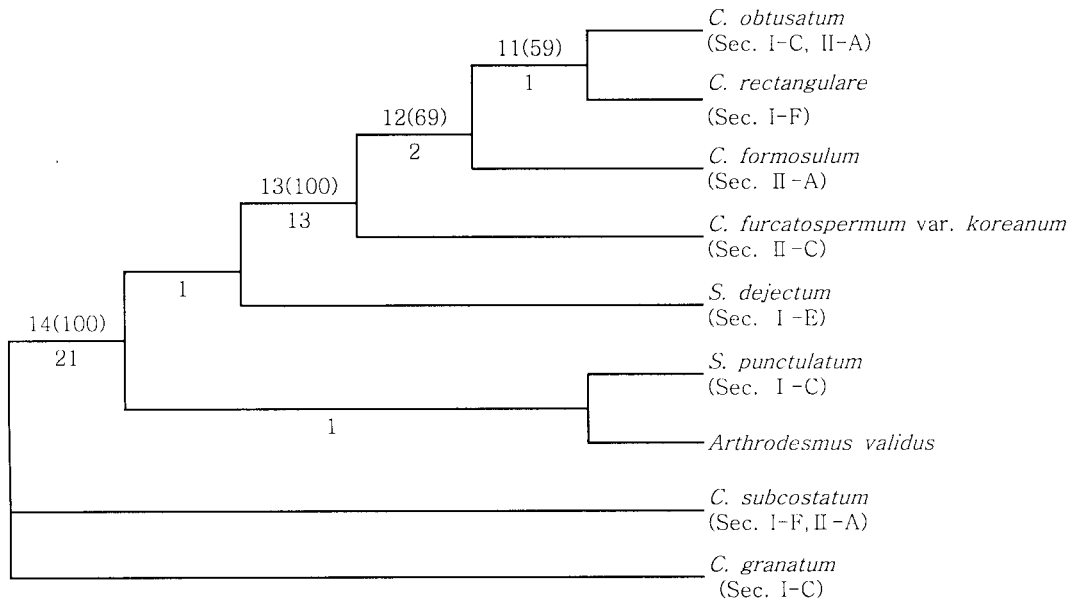


Fig. 1. A phylogenetic tree derived from the *coxIII* gene coding region of 9 taxa of desmid. The tree topology shown here is the most parsimonious tree constructed by the PAUP (v.4.0b8). Branch length estimates of most parsimonious tree indicated above internodal branches; bootstrap percentage values $\geq 50\%$ are shown in parentheses; number below the branches are the decay indices.

형질전환된 *E. coli*를 대량배양한 후 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 플라스미드 DNA를 모은 후, 이를 automated DNA sequencing system(ABI Prism 377; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정을 위한 sequencing 반응에서의 primer는 T3와 T7 등의 universal primer를 사용하였으며, 결정된 염기서열은 Clustal W(Higgins *et al.* 1996)를 사용하여 정렬하였고, 계통분석을 위하여 PAUP* 4.0b8(Swofford 2002)을 사용하였다. 계통분석에서 Maximum Parsimony 방법을 사용하였으며, 이때 모든 형질을 동등한 값으로 사용하여 Branch and Bound와 Heuristic search를 하였다. 계통수의 분지에 대한 지지도를 측정하기 위해서, tree-bisection-reconnection algorithm을 이용하여 Bootstrap 값을 1,000회 반복하여 구하였고, decay index(Bremer 1988)를 구하였다. MEGA2(Kumar *et al.* 2001)를 사용하여 Neighbor-Joining 방법에 의해 distance tree를 구하였다. 또한 Kimura 2-parameter(Kimura 1980)에 의한 distance와 uncorrected distance(Kumar *et al.* 2001)를 구하여 각 분류군 간의 거리를 비교해 보고자 하였다.

결 과

본 연구에서 미토콘드리아의 호흡효소 중 하나인 *coxIII* 유전자의 염기서열 중 87번째 염기에서부터 701번째 염기가

지 총 615개 염기서열이 밝혀졌으며, 이는 총 616개의 형질로 사용되었다.

사용된 모든 염기는 unordered 형태이며, 모두 동등한 비중으로 사용되었다. 총 616개의 형질 중 447개의 염기는 보존되어 있었으며, 80개는 parsimony 분석에 유의하지 않은 변이(uninformative character)를 보였으며, 89개의 염기변이가 informative character로 분석되었다. Maximum Parsimony(MP) 방법으로 branch and bound search한 결과 282 steps에서 1개의 최적 계통수가 구해졌다(Fig. 1). 이 분계도의 Consistency Index는 0.8191이며, Retention Index는 0.6890이고, Rescaled Consistency Index는 0.5644이었다.

Neighbor-Joining(NJ)에 의한 Distance tree는 두 종의 팔장고말속 식물의 위치와 *Cosmarium subcostatum*과 *C. granatum*이 하나의 분지를 형성하는 점이 MP에 의한 계통수와 차이점으로 나타났다(Fig. 2).

먼저 장고말속 식물의 division간 유연관계를 살펴보면, division I과 II가 하나의 분지로 묶여서 나타났고, 각 section A, C, F 사이에서도 같은 section끼리 서로 같은 분지를 형성하지 않았다.

또한 두 종의 팔장고말속 식물도 서로 같은 분지를 형성하지 않았고, MP에 의한 계통수에서 *Staurastrum punctulatum*은 *Arthrodesmus*속과 같은 분지를 형성하였고, NJ에 의한 계통수에서는 *S. dejectum*이 *Arthrodesmus*속과 가까운 분지를 형성하였다. 이와 같이 본 연구에 사용된 장고말속과

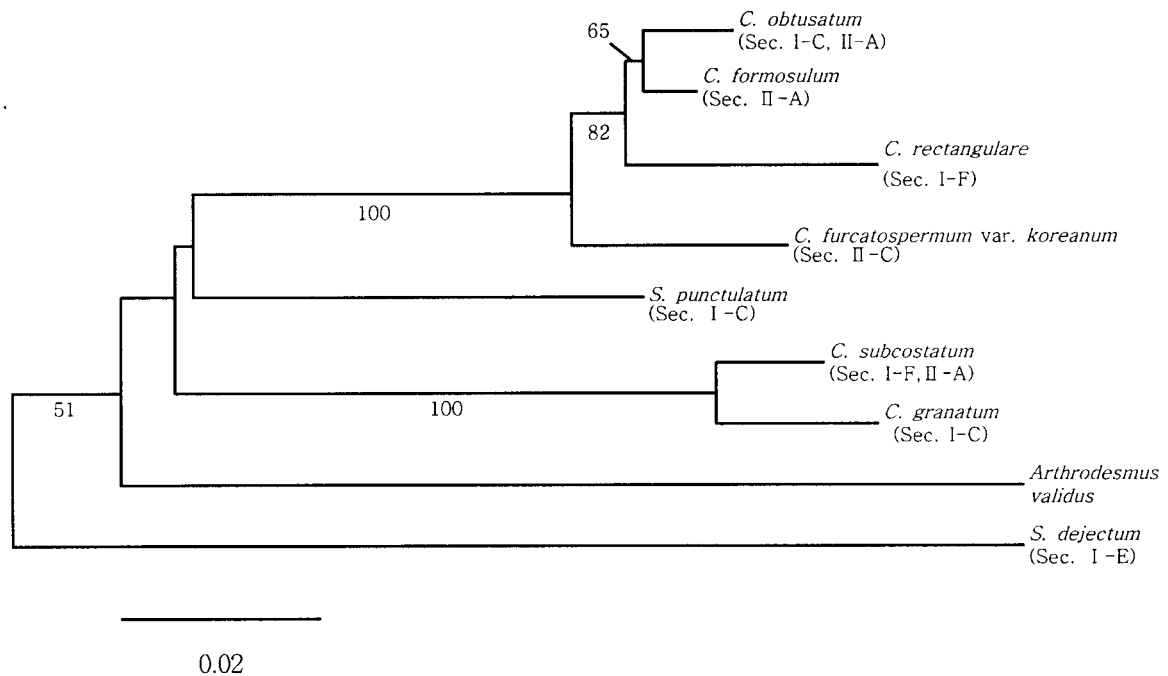


Fig. 2. Distance tree of 9 taxa of desmid based on NJ analysis of *coxIII* gene sequence. Numbers below branches represent bootstrap values $\geq 50\%$.

Table 2. Pairwise divergence using Kimura 2-parameter method (Kimura 1980) of 9 desmids

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Cosmarium subcostatum</i>	-								
2. <i>C. granatum</i>	0.02480	-							
3. <i>C. obtusatum</i>	0.12395	0.13356	-						
4. <i>C. formosulum</i>	0.11471	0.12420	0.01811	-					
5. <i>C. rectangulare</i>	0.13556	0.14330	0.03838	0.03665	-				
6. <i>C. furcatospermum</i> var. <i>koreanum</i>	0.12600	0.13164	0.04182	0.03327	0.05397	-			
7. <i>Staurastrum punctulatum</i>	0.10888	0.11245	0.10464	0.09552	0.11027	0.10298	-		
8. <i>S. dejectum</i>	0.18019	0.18258	0.17602	0.16787	0.18246	0.17168	0.17424	-	
9. <i>Arthrodesmus validus</i>	0.16140	0.16347	0.15959	0.14976	0.16566	0.15761	0.13542	0.19973	-

Table 3. Pairwise distance using uncorrected P-value (Kumar *et al.* 2001) of 9 desmids

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Cosmarium subcostatum</i>	-								
2. <i>C. granatum</i>	0.02439	-							
3. <i>C. obtusatum</i>	0.11382	0.12195	-						
4. <i>C. formosulum</i>	0.10569	0.11382	0.01789	-					
5. <i>C. rectangulare</i>	0.12358	0.13008	0.03740	0.03577	-				
6. <i>C. furcatospermum</i> var. <i>koreanum</i>	0.11545	0.12033	0.04065	0.03252	0.05203	-			
7. <i>Staurastrum punctulatum</i>	0.10081	0.10407	0.09756	0.08943	0.10244	0.09593	-		
8. <i>S. dejectum</i>	0.15935	0.16098	0.15610	0.14959	0.16098	0.15285	0.15447	-	
9. <i>Arthrodesmus validus</i>	0.14472	0.14634	0.14309	0.13496	0.14797	0.14146	0.12358	0.17398	-

팔장고말속에 속하는 식물들은 속간 경계를 나타내지 않고 서로 섞여서 나타났음을 알 수 있다.

1,000회 반복하여 얻은 bootstrap value는 *Cosmarium obtusatum*, *C. rectangulare*, *C. formosulum*, 그리고 *C. furcatospermum* var. *koreanum*이 이루는 분지가 100%의 값을 나타냈으며, 또한 *C. obtusatum*과 *C. rectangulare*의 분지는 59%, 이들 분지와 *C. formosulum*의 분지는 69%의 값을 나타냈다(Fig. 1).

Decay index는 *C. obtusatum*과 *C. rectangulare*의 분지와 *Staurastrum punctulatum*과 *Arthrodesmus validus*의 분지가 283 step에서 무너짐으로써 1을 나타냈고, *Staurastrum punctulatum*과 *Arthrodesmus validus*의 분지와 *S. dejectum* 이하의 종들과 형성된 분지가 21로 303 step에서 붕괴됨을 나타냈다(Fig. 1).

Kimura 2-parameter에 의한 pairwise distance를 비교해보면, 장고말속간의 식물들은 1.8-14.3%로 나타났으며, 두 종의 팔장고말속 식물은 17.4%를 나타냈다(Table 2). 팔장고말속 *Staurastrum punctulatum*과 *Arthrodesmus* 사이에는 13.5%와 *Staurastrum dejectum*과 *Arthrodesmus* 사이에는 20.0%로 나타났다. 장고말속과 *Staurastrum punctulatum*은 pairwise distance가 9.6-11.3%이었으며, 장고말속과 *S. dejectum*은 16.8-18.3%로 나타났다.

P-distance는 장고말속 식물간에는 1.8-13.0%로 나타났으며, 팔장고말속 사이에는 15.5%를 나타냈다(Table 3). *Staurastrum punctulatum*과 *Arthrodesmus* 사이에는 12.4%와 *S. dejectum*과 *Arthrodesmus* 사이에는 17.4%로 나타났다.

고 찰

형태 형질에 근거한 장고말속 식물 분류체계의 문제점

Prescott et al.(1981)은 장고말속 식물 중 세포벽이 평활하며, 세포의 가장자리에 돌기나 과상무늬가 없는 종들은 division I, 세포벽에 과립이 있거나 세포 가장자리에 과상무늬 등이 있으면 division II로 구분하였다. 각 division은 반세포의 형태에 따라 여러 개의 section으로 나뉘었다. 본 연구에서는 장고말속 식물의 중요한 식별형질이 세포벽 무늬와 반세포의 형태이기 때문에 *coxIII* 유전자 염기서열 분석을 통하여 각 division과 section에 따라 서로 유연관계를 나타내는지 검토하고자 하였다.

장고말속 식물은 *coxIII* 유전자 염기서열 분석을 통한 계통수에서 각 division과 section 사이에 유연관계를 나타내지 않고 서로 섞이는 결과를 나타냈다. 본 속 식물의 핵 rDNA의 ITS 부분의 염기서열 분석을 통한 연구에서도 section 체계의 분류와 일치하지 않는 결과를 나타냈다(Lee

2001). 또한 *rbcL* 유전자 염기서열 분석을 통한 장고말속과 팔장고말속의 연구에서 일부 분류군을 제외하고 대부분의 종들은 division과 section 체계와 일치하지 않는 결과를 나타냈다(Nam and Lee 2001a, b). 볼복스계열의 연구에서 핵 rDNA의 ITS 부분을 통한 연구에서는 *Gonium pectorale*와 *Chlamydomonas reinhardtii*가 *C. reinhardtii*의 local population 사이보다도 더 가까운 유연관계를 나타냈다(Coleman and Mai 1997). 이와 같이 접합 녹조류에 속하는 장고말속 식물과 같이 미세 녹조류에 속하는 볼복스 계열의 연구에서도 형태적 분류체계와 유전적 분석 결과가 서로 일치하지 않는 일부 분류군의 예를 볼 수 있다.

장고말속에 속하는 1,000여 분류군은 세포벽 무늬와 반세포의 모양, 크기에 따라 분류되고 있기 때문에, 이러한 식별형질에 의거한 division과 section 체계가 위의 세 종류의 유전적 분석 연구에서 서로 유연관계를 나타내지 못한 결과는 결국 장고말속식물의 형태 식별형질들의 불안정성을 입증하는 것으로서 앞으로 형태 형질에 대한 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

장고말속과 팔장고말속간의 유연관계

MP에 의한 계통도에서 두 종의 팔장고말속 식물은 서로 같은 분지를 형성하지 못하였고, *Staurastrum dejectum*은 장고말속 식물과 같은 분지를 형성하였고, *S. punctulatum*은 *Arthrodesmus validus*와 묶이는 결과를 나타냈다. NJ에 의한 계통수에서는 *Staurastrum punctulatum*이 장고말속 그룹과 가까운 유연관계를 나타냈고, *S. dejectum*은 *Arthrodesmus validus*와 가까운 유연관계를 나타냈다. 두 종의 팔장고말속 식물사이의 pairwise distance도 17.4%로써 일부 장고말속 식물과의 거리(9.6-11.3%)보다 더 큰 값으로 나타났다.

이미 보고된 장고말속과 팔장고말속 30분류군의 *rbcL* 유전자 염기서열을 분석한 결과, 이중 4종의 장고말속과 2종의 팔장고말속 식물이 하나의 분지를 형성하는 결과를 나타냄으로써 두 속이 명확한 속간 한계를 가지고 분리되지 않음을 나타냈다(Nam and Lee 2001a, b). Yeum and Chang (1989)은 장고말속 식물의 실내배양을 통한 연구에서 반세포의 형태적 변이와 함께 극면이 삼각형인 개체가 출현함을 보고한 바 있다. 장고말속 식물과 팔장고말속 식물의 가장 큰 형태적 차이점은 장고말속은 극면이 타원형이고, 팔장고말속은 삼각형이라는 점이다(Prescott et al. 1981, 1982).

*Staurastrum punctulatum*은 극면이 삼각형인 점을 제외하면 오히려 장고말속 식물에 유사한 형태를 가지며, *S. dejectum*은 반세포 양끝에 돌출된 가시를 가진 점이 *Arthrodesmus*와 일치한다(Prescott et al. 1981, 1982).

이미 많은 연구자들에 의해서 장고말속과 팔장고말속은

각각 단계통이 아니며, 서로 형태적 유사성으로 인하여 두 속의 중간에 속하는 분류군들이 있으며, 또한 *Xanthidium*, *Staurodesmus*, *Euastrum* 속들과도 형태적으로 연결되어 있음이 보고 된 바 있다(Brook 1981; Prescott *et al.* 1982; Gontcharov *et al.* 2003).

따라서 장고말속 식물에 대한 핵 rDNA의 ITS(Lee 2001) 연구와 *rbcl*을 통한 연구(Nam and Lee 2001a, b)에서와 같이, *coxIII*에 의한 연구의 결과는 장고말속 식물이 단계통이 아니며, 또한 앞으로 장고말속과 팔장고말속의 속간 관계에 대한 재검토도 필요한 것으로 사료되었다.

coxIII 유전자의 계통학적 유용성

*coxIII*는 선대식물과 일부 녹조식물을 제외하고 대부분의 육상식물에서 미토콘드리아 RNA editing이 일어나는 것으로 보고되었다(Hiesel *et al.* 1994a). 이 유전자를 사용한 계통학적 연구는 육상식물을 대상으로 수행된 바 있는데(Hiesel *et al.* 1994b), 이 연구에서는 육상식물이 단계통으로 입증되었으며, *coxIII*가 계통학 연구에 유용한 것으로 분석되었다.

장고말속의 핵 rDNA의 ITS 부분은 ITS 1과 2, 그리고 사이에 위치한 5.8S를 포함한 총 1,103개의 염기서열 중 382개 염기가 34.6%의 보존을 나타냈으며(Lee 2001), *rbcl* 유전자 총 1,354개의 염기서열 중 1,105개가 보존되어 81.6%의 일치율을 나타냈다(Nam and Lee 2001a). 본 연구의 *coxIII* 유전자는 primer를 포함한 615개의 염기서열 중 447개가 보존되어 72.7%가 일치되었다.

장고말속 식물에서 미토콘드리아의 *coxIII* 유전자를 통한 연구 결과는 핵 rDNA의 ITS 부분에 의한 연구와 *rbcl* 유전자를 통한 연구 결과와 일치하며, 육상식물의 연구에서와 같이(Hiesel 1994b) 담수조류인 물면지말류의 계통학 연구에서도 유용한 자료인 것으로 사료된다.

사 사

본 연구를 위하여 *Arthrodesmus validus*(SVCK 457)를 분양해 주신 독일 Hamburg 대학의 Monica Engels 박사께 감사를 드린다.

참고문헌

Besendahl A., Qiu Y.L., Lee J. Palmer J.D. and Bhattacharya D. 2000. The cyanobacterial origin and vertical transmission of the plastid tRNA(Leu) group-I intron. *Curr. Genet.* **37**: 12-23.

Bold H.C. and Wynne N.J. 1978. *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction.* Prentice Hall. New Jersey. 572

pp.

Bremer K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic recombination. *Evolution* **42**: 795-803.

Brook A.J. 1981. *The Biology of Desmids. Botanical Monographs, Vol. 16.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 276 pp.

Chung J. 1993. *Illustration of the freshwater algae of Korea.* Academy Publ. Co. 496 pp.

Coleman A.W. and Mai J.C. 1997. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. *J. Mol. Evol.* **45**: 168-177.

Gontcharov A.A., Marin B. and Melkonian M. 2003. Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *J. Mol. Evol.* **56**: 89-104.

Hiesel R., Combettes B. and Brennicke A. 1994a. Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 629-633.

Hiesel R., von Haeseler A. and Brennicke A. 1994b. Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 634-638.

Higgins D.G., Thompson J.D. and Gibson T.J. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments methods. *Enzymology* **266**: 383-402.

Kies L. 1967. Über die experimentelle Auslosung von Fortpflanzungsvotgargen bei Desmidiaceen. *Vortr. Dtsch. Bot. Ges., N.F. Nr.* **1**: 65-70.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. and Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.

Lee O.M. 2001. The nucleotide sequences variability in ITS and 5.8S regions of the nuclear rDNA among *Cosmarium* species. *Algae* **16**: 129-136.

McCourt R.M., Karol K.G., Bell J., Helm-Bychowski K.M., Grajewska A., Wojciechowski M.F. and Hoshaw R.W. 2000. Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on *rbcl* sequences. *J. Phycol.* **36**: 747-758.

Nam M.R. and Lee O.M. 2001a. A comparative study of morphological characters and sequence data of *rbcl* gene in *Cosmarium* species. *Algae* **16**: 349-361.

Nam M.R. and Lee O.M. 2001b. A comparative study of morphological characters and sequences of *rbcl* gene in *Staurostrum* of desmid. *Algae* **16**: 363-367.

Prescott G.W., Bicudo C.E.M. and Vinyard W.C. 1982. *A synopsis of North American Desmids. Part II. Section 4.* The University of Nebraska Press, Lincoln. pp. 88-345.

Prescott G.W., Croasdale H.T. and Vinyard W.C. 1981. *A synopsis of North American Desmids. Part II. Section 3.* The University of Nebraska Press, Lincoln. 720pp.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning 1.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA pp. 1.53-1.105.

Swofford D.L. 2002. *PAUP*: Phylogentic analysis using parsimony (*and other methods)*. V.4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA 130 pp.

Turmel M., Otis C. and Lemieux C. 2002. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11275-80.

West W. and West G.S. 1905. *A monograph of the British*

Desmidiaceae. Vol. II. Roy Soc., London. X+206 pp. 64 Pls.

Yeum C.M. and Chang Y.K. 1989. Morphological variation of *Cosmarium laeve* (Rabenhorst) and *C. subprotumidum* var. *gregorii* (Roy et Biss) West et West in culture. *J. Natl. Sci., Sookmyung Women's Univ.* **1**: 53-66.

Received 17 April 2003

Revised 14 July 2003

Accepted 5 August 2003