

## 효소의 전기영동에 의한 *Trichoderma*속 균의 종내, 종간 잡종의 동정

민경림<sup>1</sup>·박희문<sup>2</sup>·하영철

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>1</sup>태평양화학기술연구소 생물공학실

<sup>2</sup>Lab. of Biochemical & Metabolism, NIDDK., NIH., Bethesda, MD., 20852, USA

## Identification of hybride from intra- and interspecific protoplast fusion in *Trichoderma* by electrophoretic Patterns of enzymes

Min, Kyung-Ryum<sup>1</sup>, Hee-Moon Park<sup>2</sup>, and Yung-Chil Hah

Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>1</sup>Biotechnology Lab., The Pacific R&D Center, The Pacific Chemical Company

<sup>2</sup>Lab. of Biochemical & Metabolism, NIDDK., NIH., Bethesda, MD., 20852, USA

**ABSTRACT:** In order to evaluate the applicability of enzyme electrophoresis for the identification of intra/interspecific hybride obtained by the protoplast fusion in *Trichoderma*, soluble proteins, intracellular soluble enzymes and extracellular  $\beta$ -glucosidase were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. As the results, patterns of soluble protein, and isozyme patterns of peroxidase, malate dehydrogenase, and  $\beta$ -glucosidase in hydrids were different from those in parental and wild type strains. Therefore, it was established that the analysis of protein pattern by electrophoresis could be applied to isolate and identify the hybrids from the protoplast fusion.

**KEY WORD** Electrophoresis, isozyme, intra/ interspecific hybrids, activity stain.

산업화의 가속화에 따른 대체에너지와 폐자원 활용에 대한 요구가 증가됨에 따라 생태계에 막대한 양으로 존재하는 섬유소를 대체에너지 및 식량 자원으로 활용하기 위하여, 섬유소 분해효소 및 그 생산균주에 대하여 많이 연구 검토되어 왔다 (Coughlan 1985).

섬유소 분해효소 생산균으로는 *Trichoderma*속 균에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔으나 (Montenecourt, 1983; Merivuori 등, 1985; Van Arsdell 등, 1987), 불완전 균류에 속하는 이 속의 특징으로 말미암아 균주개량은 주로 돌연변이 유발에 의한 우수 균주의 선별에 의존하여 왔다 (Schoemaker 등, 1981; Durand 등, 1988). 최근 유전학적 분석과 균주육종의 방법으

로 원형질체 융합기법이 적용되고 있다 (Hong 등, 1984a, b; Toyama 등, 1984a, b; Hong과 Park 등, 1986; Ogawa 등, 1987; Murkovic 등, 1987).

그런데 지금까지 균류에 원형질체 융합결과 얻어진 종내, 종간 잡종의 분석법으로 자연적인 유전자의 분리양상, 반수체 유도물질 처리에 의한 인위적인 유전자의 분리양상, 포자의 크기, DNA 양 조사 등이 이용되어 왔다 (Ferenczy 1980, 1984). 이상의 방법들은 경우에 따라 번거롭기도 하거나 명확한 결과를 보여주지 아니하여 잡종의 판별이나 분석법으로는 미진한 감이 있었다. 본인 등은 일반적으로 균류의 분류를 위하여 전기영동에 의한 동위효소 분석법이 이용되는 점에 착

안(Sato 등, 1980; Zamir와 Chet, 1985; Hansen 등, 1986; Tooley 등, 1985), 이를 *Trichoderma*의 종내, 종간 잡종의 검출 및 검출법으로 적용하여 그 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

균주로는 *Trichoderma koningii* ATCC 26113, *Trichoderma reesei* QM 9414와, 이들로 부터 본 실험실에서 얻은 영양요구성 돌연변이주 및 돌연변이주 상호간의 중간, 종내 원형질체 융합결과 얻어진 상보성 융합체를 사용하였는데 그 특성 및 종류는 Table 1과 같다(Park 등, 1986; Hong 등, 1984a, b).

배지는 Hong 등(1984a, b)과 Park 등(1986)이 기술한 바와 동일한 조성으로 제조하여 사용하였다.

### 원형질체 융합 및 잡종의 분리

영양요구성 돌연변이주 상호간의 중간, 종내 원형질체 융합은 Hong 등(1984a, b)의 방법에 의거하였으며, 상보적인 잡종의 분리는 Park 등(1986, 1988)의 방법에 의거하여 시행하였다.

### 잡종의 인위적인 유전자 분리

최소배지 상에서 생성된 영양요구성 돌연변이주들의 원형질체를 융합하여 얻은 형질전환체를 완전배지에 옮겨 배양하여 포자를 채취하고 이것을 최소평판배지에 도말하여 상보적인 원형양형 균주를 분리하였다. 이들의 유전자를 인위적으로 분리시키기 위하여, 균사체의 일부를 benlate가 1 ml 에 1.24 ppm의 수준으로 첨가된 완전평판배지에 옮겨 유전자의 인위적인 분리를 유도하고, 여기에서 생성된 포자를 완전평판배지에 도말하여 얻은 균체를 최소완전평판배지 및 최소배지에 영양요구성 물질이 첨가된 평판배지 등에 옮겨 성장 유무를 살펴 유전자형을 조사하고 상보적인 독립영양형 균주의 핵상분석을 피하였다.

### DNA 양 측정

원형질체를 순수분리한 후 50 ml Trie-50 ml EDTA (ethylenediamine-tetracetic acid) 용액을 5 ml 가하고 sodium laurylsulfate 0.5g을 첨가하

Table 1. List of strains used in this experiments

Strains	Phenotype	Reference
<i>Trichoderma koningii</i>		
ATCC26113	prototroph	wild type
AF-1	ade	Hong <i>et al.</i> , 1984; Park <i>et al.</i> , 1986
A-7	arg	
AT-7	arg, leu	
CFT-1	ade, lys	
<i>Trichoderma reesei</i>		
QM9414	prototroph	wild type
UQ-31	lys, pro	Park <i>et al.</i> , 1986
Hybrids		
AF-1 × AT-7		
FAAtM 108	prototroph	Park <i>et al.</i> , 1984; 1988
FAAtM 206	"	
AF-1 × CFT-1		
FACM 143	"	
FACM 325	"	
AF-1 × UQ-31		
FAQM 130	"	Park <i>et al.</i> , 1986
FAQM 142	"	
FAQM 133	"	
FAQM 241	"	
FAQM 108	"	
A-7 × UQ-31		
FA7QM 1	"	
FA7QM 11	"	

여 65°C에서 20분간 방치하여 원형질체를 터트린 후 동량의 차가운 에탄올과 NaCl을 최종농도가 0.3M 되도록 첨가하여 -20°C에서 하룻밤 방치했다. 이를 -20°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 pellet을 상온에 방치하여 잔여 에탄올을 증발시킨 후 10% perchloric acid에 재현탁시켜 이를 diphenylamine test로 측정하였다.

Diphenylamine test는 Burton(1956)의 방법을 변형한 Giles와 Myers(1956)의 방법에 의거하여 시행하였다. 즉 위에서 얻은 DNA 현탁액에 10% perchloric acid 5 ml을 첨가하여 65°C에서 20분간 추출하는 과정을 두 번 행한 후 그 상등액을 혼합하여 DNA 추출액으로 사용하였다. 이 DNA 추출액 2 ml 에 diphenylamine 용액(1.5g di-

phenylamine in 100 ml glacial acetic acid, 1.5 ml conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 ml, 0.1% acetaldehyde 0.2 ml를 가한 후 37°C에서 17시간 이상 반응시켜 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA 양을 결정하기 위한 표준시료로는 언어의 정소에서 추출한 sodium deoxynucleic acid type III(Sigma)를 5 ml NaOH에 녹인 후 10% perchloric acid로 위와 동일하게 처리하여 사용하였다.

**효소의 polyacrylamide gel 전기영동 및 염색**

세포내 동위효소와 수용성 단백질의 전기영동 양상을 살펴보기 위하여 조사대상의 균주를 완전 액체배지에서 24-48시간 배양하여 균사체를 수확한 후 효소추출 완충용액, 즉, 0.1M Tris-HCl (pH 7.0)-6mM dithiothreitol을 적당량 넣고 초음파로 분쇄(120 watt, 10초간 5회)한 후, 원심분리(10,000×g, 30분)하여 상등액을 시료로 사용하였다.

세포외 β-glucosidase 시료는 0.1% peptone이 첨가된 효소용액 제조용 배지(Park 등, 1986)에서 조사 균주를 5-6일 배양한 후, 그 배양여액을 냉동 건조시켜 시용하였다.

전기영동은 Davis(1964)의 방법을 변형하여 slab gel에서 행하였다. 효소시료는 Bradford (1976)법으로 단백질을 정량하여 일정하게 사용하였으며, 여기에 bromophenol blue와 Ficoll을 최

종농도가 각각 0.02%, 6.7% 되도록 첨가한 후 사용하였으며, gel의 조성은 T=7-10%, C=2.7%로 하였다. 시료가 separating gel에 들어갈 때까지는 60 V, 그 이후에는 200 V의 일정한 전압으로 4°C에서 전개하였다.

Gel상에서의 효소활성의 검출은 위와 같이 준비한 시료를 사용하여 전기영동한 후 Table 2와 같은 반응용액으로, peroxidase와 malate dehydrogenase는 37°C에서, β-glucosidase는 55°C에서 30분가량 반응시켜 염색하였다. Peroxidase 활성검출시에는 반응 후 gel을 증류수로 세척한 후, 1% hydrogen peroxide에 담구어 발색시켰다. 세포내 수용성 단백질의 염색은 Table 2의 반응용액으로 2-3시간 염색하고 초산 : 메탄올 : 증류수의 구성비가 1 : 1 : 20인 탈색용액으로 탈색시켰다.

**결과 및 고찰**

균류의 분류시 사용된 바 있는 각종 수용성 효소의 동위효소 양상분석법을 적용하여, 원형질체 융합결과 얻어진 종내, 종간 잡종의 분석 및 확인이 가능하리라 예견하고, 이들의 peroxidase, malate dehydrogenase, 세포내 수용성 단백질 및 세포외 β-glucosidase의 동위효소 양상을 전기영동법으로 분석하여 보았다.

그 결과 Fig. 1에서 보듯이 수용성 단백질의 양

**Table 2. Composition of reaction mixture for testing several enzymes.**

Isozymes	Reaction mixture		References
Peroxidase	1. 0.1M Tris-HCl (pH7.0) catechol	100 ml	Sato <i>et al.</i> , 1980
	2. 1% hydrogen peroxide	220 mg	
Malate dehydrogenase	0.1M Tris-HCl (pH7.5)	100 ml	Brown <i>et al.</i> , 1978
	D,L-malate	850 mg	
	NAD <sup>+</sup>	30 mg	
	NBT	20 mg	
	PMS	4 mg	
β-glucosidase	0.5M acetate (pH5.0)	100 ml	Kwon, 1987
	esculin	100 mg	
	FeCl <sub>3</sub>	30 mg	
Total soluble protein	0.2% Coomassie Brilliant Blue R in solution of methanol:water:acetic acid (5:5:1)		

Abbreviation: NBT: nitro blue tetrazolium, PMS: phenazine methosulfate

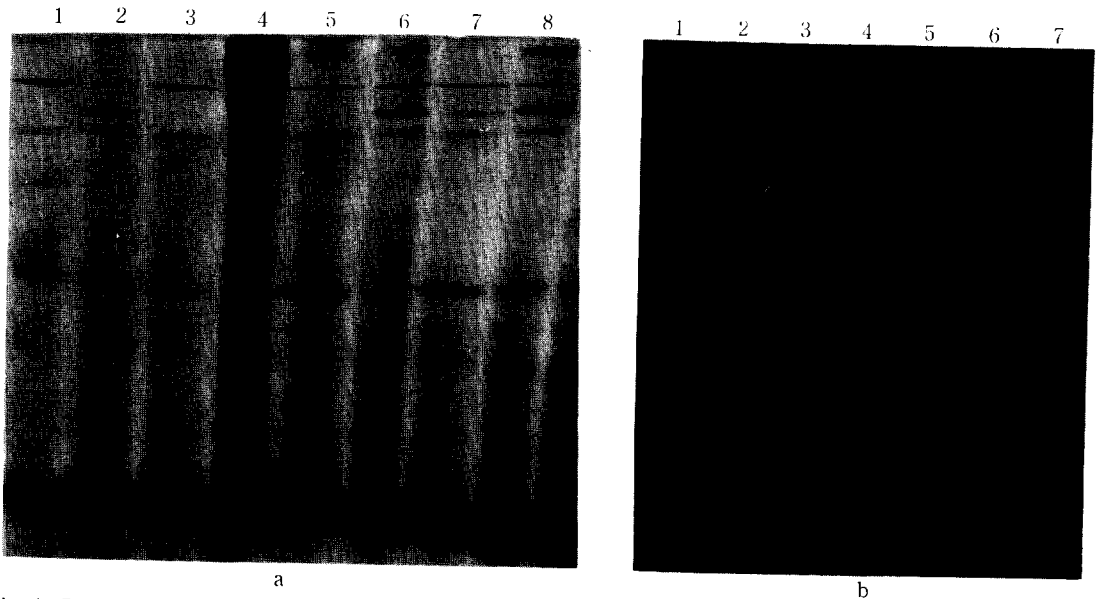


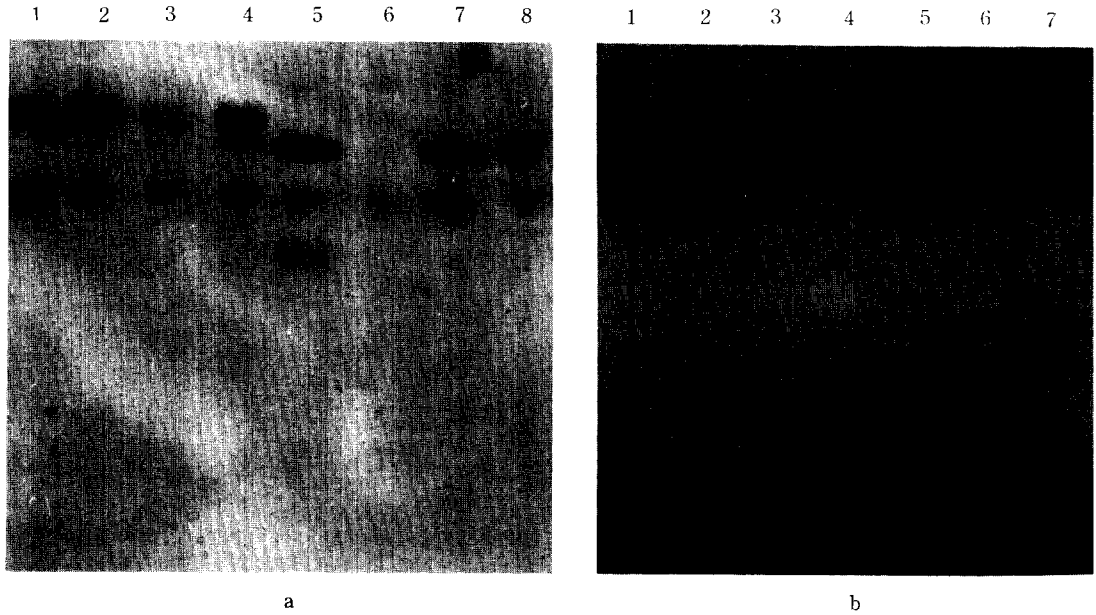
Fig. 1. Electrophoretic Pattern of total soluble protein in extracts of intraspecific hybrids (a), and interspecific hybrids (b).

- (a): *T. koningii* ATCC26113 (1), AF-1 (2), AT-7 (3), CFT-1 (4), FACM 143 (5), FACM 325 (6), FAAtM 108 (7), FAAtM 206 (8).  
 (b): *T. koningii* ATCC26113 (7), *T. reesei* QM 9414 (6), AF-1 (5), UQ-31 (4), FAQM 108 (3), FAQM 133 (2), FAQM 241 (1).

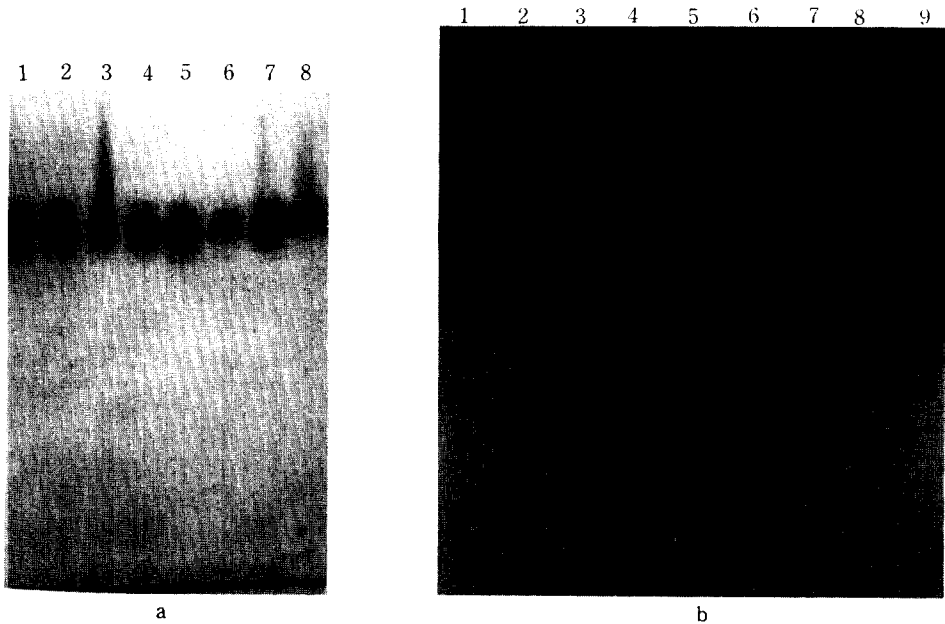
상을 살펴보면, 종내 잡종의 경우(Fig. 1a), AF-1(lane 2)과 CFT-1(lane 4)에서 유래된 잡종인 FACM143(lane 5)은 모균의 중간형, FACM 325(lane 6)는 AF-1에 가까우며 FAAtM 206은 그 중간형의 양상을 보여주고 있다. 종간 잡종의 경우(Fig. 1b), 세가지 잡종 상호간은 서로 유사하나, 융합모균인 UQ 31(lane 4)와 AF-1(lane 1)과는 양상이 다른 중간형태를 보여주고 있다. Hansen 등(1986)이 식물병원성 곰팡이인 *Phytophthora megasperma*의 분류사, 수용성 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석한 바 있는데, 본 실험 결과로는 non-SDS-polyacrylamide 전기영동법으로 수용성 단백질을 분석하여도 원형질체 융합결과 얻어진 잡종을 쉽게 판별할 수 있음을 알 수 있다. Sato 등(1980)이 *Fusarium*속 균의 동정법으로 peroxidase의 동위효소 양상을 전기영동법으로 분석한 바 있는데, 이를 적용하여 본 결과, Fig. 2에서 보듯이 종내 잡종의 경우(Fig. 2a), 조사대상인 4가지 잡종이 융합에 사용된 모균과는 확실히 구분되는 양상을 보여주고 있다. 특히 FACM 143(lane

4)을 제외한 나머지 세가지 잡종은 유사한 양상을 나타내며, 잡종 모두 융합모균보다는 전기영동성이 적은 동위효소와 ATCC 26113, 융합모균 모두에 공통적인 동위효소를 갖고 있음을 알 수 있다. 종간 잡종의 경우(Fig. 2b)의 경우에도, 세가지 잡종의 효소양상이 융합모균 및 ATCC 26113과 QM 9414와는 전혀 다른 양상을 나타내어, 잡종을 쉽게 판독할 수 있음을 알 수 있다.

보리의 일종인 *Hordeum spontaneum*의 유전적 변이조사(Brow 등, 1978)와 *Trichoderma harzianum*의 분리동정에 이용된 바 있는(Zamir와 Chet, 1985) malate dehydrogenase 동위효소의 양상을 조사한 결과(Fig. 3), 종내 잡종의 경우 Fig. 3a에서 보듯이, 융합모균이 AF-1(lane 7)과 AT-7(lane 6) 및 CFT-1(lane 5)이 각기 다른 양상을 보여주며, AF-1과 CFT-1의 융합체에서 유래된 FACM143(lane 4)은 CFT-1과 유사하며, FACM325는 AF-1과 유사한 양상을 보여주고 있다. 한편 AF-1과 AT-7의 융합결과 얻어진 FAQM 130(lane 6)은 모균과 전혀 다른 양상을 보여주는데 *T. reesei* QM9414에서 볼 수 있는



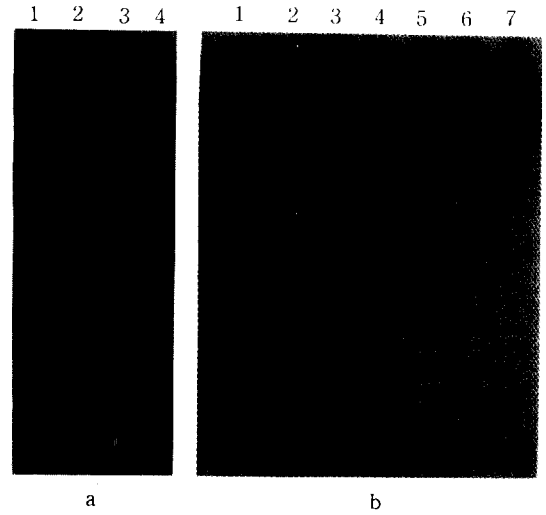
**Fig. 2.** Electrophoretic pattern of peroxidase in extracts of intraspecific hybrids (a) and interspecific hybrids (b).  
 (a): FAAtM 206 (1), FAAtM 108 (2), FACM 325 (3), FACM 143 (4), CFT-1 (5), AT-7 (6), AF-1 (7), *T. koningii* ATCC26113 (8).  
 (b): FAQM 241 (1), FAQM 133 (2), FAQM 108 (3), UQ-31 (4), AF-1 (5), *T. reesei* QM 9414 (6), *T. koningii* ATCC26113 (7).



**Fig. 3.** Electrophoretic pattern of malate dehydrogenase in extracts of intraspecific hybrids (a), and interspecific hybrids (b).  
 (a): AFFtM 206 (1), FAAtM 108 (2), FACM 325 (3), FACM 143 (4), CFT-1 (5), AT-7 (6), AF-1 (7), *T. koningii* ATCC26113 (8).  
 (b): *T. koningii* ATCC26113 (1), *T. reesei* QM 9414 (2), AF-1 (3), UQ-31 (4), A-7 (5), FAQM 130 (6), FAQM 142 (7), FA7QM1 (8), FA7QM 11 (9).

동위효소와 유사한 위치에 있는 효소를 볼 수 있으며, FAQM142(lane 7)는 AF-1과 유사한 양상을 보여주고 있다. A-7(lane 5)과 UQ-31의 융합 결과 얻어진 FA7QM1과 FAQM11은 UQ31에 가까운 양상을 나타낸다. 특이하게 A-7은 malate dehydrogenase가 검출되지 아니하였는데, 이 균주는 성장속도가 다른 균주에 비하여 느리며, 배양시 연두색의 색소를 배지로 많이 분비하는 특성을 갖는 돌연변이주이다.

Kwon(1987)이 *Aspergillus nidulans*의  $\beta$ -glucosidase 양상을 전기영동 gel에서 검출하기 위하여 개발한 효소활성 검출법을 적용하여 본 결과(Fig. 4), 종내 잡종인 FACM325(Fig. 4a, lane 1)는 융합모균 중 하나인 CFT-1과 유사한 양상을 나타낸다. 한편 중간 잡종(Fig. 4b)을 조사한 결과 조사대상인 세가지 잡종 모두가 AF-1(lane 3)과 유사한 양상을 보여주고 있다. 융합모균의 하나인 UQ31의 경우  $\beta$ -glucosidase 활성이 검출되지 아니하였는데, Park 등(1986)의 연구결과에 의하면 이 균주의  $\beta$ -glucosidase의 specific activity(units/ $\mu$ g of protein)는 1,6으로 *T. koningii* ATCC 26113(6.8), *T. reesei* QM 9414(4.5), AF-1(6.6) FAQM 133(6.5), FAQM 241(6.5), FAQM 108(7.4)에 비하여 상당히 낮은 것으로 밝혀진 바 있다. 동량의 단백질(효소) 시료를 전기영동시 사용하였으므로, 이러한 결과가 나타난 것으로 추정할 수 있으며, 이미 조사 발표한 바 있는 효소역가 측정결과(Park 등, 1986의 Table 6)와도 일치하는 것이라 볼 수 있다. 이상의 결과에서 균류 등의 동정에 이용된 동위효소의 전기영동적 분석법은 융합결과 생성된 융합체(이형접합체)를 자연분리시켜 얻은 중간, 종내 잡종의 확인 및 분석에 효과적으로 적용될 수



**Fig. 4.** Electrophoretic pattern of  $\beta$ -glucosidase in extracellular enzyme preparation from intraspecific hybrids (a) and interspecific hybrids (b). (a): FACM 325 (1), CFT-1 (2), AF-1 (3), *T. koningii* ATCC26113 (4). (b): *T. koningii* ATCC26113 (1), *T. reesei* QM 9414 (2), AF-1 (3), UQ-31 (4), FAQM 108 (5), FAQM 133 (6), FAQM 241 (7).

있음을 알 수 있다.

전기영동에 의한 각종 동위효소의 분석결과와는 중간, 종내 원형질체 융합에서 얻은 융합체를 원전배지상에서 자연분리시켜 얻은 독립영양형 잡종이, 융합모균 상호간의 유전물질 교환에 의하여 생성된 것임을 재확인하여 주는 결과이기도 하다.

종내 잡종의 경우 이미 인위적인 유전자 분리양상과 DNA 함량조사 및 세포외 다당류 분해효소능의 조사에 의하여, 유전자 교환 및 재조합의 신물임을 조사한 바 있다(Park 등, 1988). 여기서 중간 잡종의 인위적인 분리양상과 DNA 함량을 조사한 결과를 살펴보면 Table 3에서 보듯이 중간 잡

**Table 3.** Induced segregation of interspecific hybrids using haploidizing agent, benlate.

Strain	No. of colonies tested	ade	arg	pro, lys	Recombinant	
					prototype	non-parental
FAQM 130	210	210	—	—	—	—
FAQM 142	98	87	—	—	11(11.2)*	—
FA7QM 1	192	—	—	—	—	192(100)
FA7QM 11	190	—	—	—	—	190(100)

\*: percent value

종이 융합모균의 유전자형과 재조합형으로 분리되는 양상은, FAQM130의  $ade : pro, lys : rec = 1 : 0 : 0$ 으로 모두 AF-1(*ade*)의 형태이며, FAQM142는  $ade : pro, lys : rec = 8 : 0 : 1$ 로 11.2%의 포자가 원영양형의 재조합체인 반면, FA7QM1과 FA7QM11에서는 융합모균의 영양요구성과 원영양형의 재조합체는 나타나지 않았고 모두 융합모균과 다른 영양요구성 재조합체가 얻어졌다. 이로 미루어 볼 때, 잡종의 종류마다 융합모균과 동일한 유전자형 및 재조합체가 얻어지는 비율이 상당히 불균일하며, 재조합체의 생성비율도 다르다. 이들 잡종의 DNA 양을 조사한 결과 Table 4에서 볼 수 있듯이 상당히 불균일한 양상을 나타내고 있다. 즉, FAQM130은 융합모균인 UQ 31과 유사한 수준이며, FA7QM1과 FA7QM11은 두 야생형의 DNA 양과 같은 수준을 나타냈다. 또 FAQM142는 야생형의 균주보다 1.2배 높은 것을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 추론 가능한 사실은 다른 종내 잡종의 경우와 마찬가지로 융합에 의하여 생성된 이형핵체(융합체)로부

**Table 4.** DNA content of parental strains and interspecific hybrids obtained from spontaneous segregation of interspecific fusants between *T. koningii* ATCC26113 and *T. reesei* QM9414.

Strain	No. of protoplasts ( $\times 10^8$ )	Amount of DNA ( $\mu\text{g}$ )	DNA contents per $10^6$ of protoplast(ng)
ATCC26113	0.70	8.25	117.98
QM9414	1.06	119.81	113.03
AF-1	1.16	14.81	122.29
A-7	1.38	8.71	99.85
UQ-31	1.18	13.73	74.16
FAQM-130	1.88	15.55	82.94
FAQM-142	1.13	15.40	136.90
FA7QM-1	1.28	15.55	121.98
FA7QM-11	1.05	10.54	100.36

터 분리된 잡종의 핵형이 이배체가 아닌 이수체임을 알 수 있고, DNA 양이 많은 FAQM142의 잡종이 다른 잡종보다 더 높은 비율의 독립영양형 재조합체가 생성되는 양상과 일치한다.

적 요

*Trichoderma*균의 원형질체 융합에 의한 종간/종내 잡종의 분석을 위하여 세포내 수용성 효소와 세포외  $\beta$ -glucosidase의 양상을 전기영동법을 이용한 효소검출 방법을 적용하여 조사하였다. 잡종의 peroxidase, malate dehydrogenase, 세포내 수용성 단백질 및 세포외  $\beta$ -glucosidase의 동위효소 양상을 전기영동법으로 분석한 결과 사용한 모균 및 야생형의 균주와는 다른 양상을 나타내었다. 이로써 효소의 전기영동법을 이용한 동위효소 양상의 분석이 원형질체 융합에 의한 잡종의 분리 및 분석에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

REFERENCES

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown, A.H.D., E. Nevo, D. Zohary, and O. Dagan, 1978. Genetic variation in natural population of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Genetica* **49**: 97-108.
- Burton, K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribo-nucleic acid. *Biochem. J.* **62**: 315-323.
- Coughlan, M.P., 1985. Cellulose hydrolysis: the potential, the problems and relevant research at Galway. *Bioche. Soc. Trans.* **13**: 405-406.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis-II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Durand, H., M. Clanet, and G. Tiraby, 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enz. Microb. Technol.* **10**: 341-346.
- Ferenczy, L., 1980. Fusion of protoplast of auxotrophic fungal mutants: Diversity in the genetic background of nutritional comple-

- mentation. In: Advances in Protoplast Research. ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas. pp. 55-62. Permond Press. Oxford.
8. Ferenczy, L., 1984. Fungal protoplast fusion: basic and applied aspects. In: Cell Fusion: Gene Transfer and Transformation. ed. by R.F. Beer, Jr. and E.G. Bassett. pp. 154-169. Raven Press. New York.
  9. Giles, K.W. and A. Myers, 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**: 93.
  10. Hansen, E.M., C.M. Brasier, D.S. Shaw, and P.B. Hamm, 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: Evidence for emerging biological species groups. *Br. Mycol. Soc.* **87**: 557-573.
  11. Hong, S.W., Y.C. Hah, and H.M. Park, 1984a. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 207-213.
  12. Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park, and N.J. Cho, 1984b. Intraspecific protoplast fusion in *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 103-110.
  13. Hong, S.W. and H.M. Park, 1985. Protoplast fusion in cellulolytic fungi, *Trichoderma* spp.. *Kor. J. Nat'l. Acad.* **24**: 121-157.
  14. Kwon, K.S., 1988. Studies on the biosynthesis of  $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus nidulans*. Ph. D. Thesis. Seoul National University.
  15. Merivuori, H., K.M./Siegler, J.A. Sands, and B.S. Monteneuort, 1985. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* **15**: 411-414.
  16. Monteneuort, B.S., 1983. *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends in Biotech.* **1**: 156-161.
  17. Murkovic, M., W. Steinen, and H. Esterbauer, 1987. Electropfusion of *Trichoderma reesei* protoplasts. *Lett. Appl. Microbiol.* **5**: 107-109.
  18. Ogawa, K., J.A. Brown, and T.M. Wood, 1987. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM9414 by protoplast fusion using color mutants. *Enz. Micro. Technol.* **9**: 229-232.
  19. Park, H.M. and S.W. Hong, 1988. Analysis of intraspecific protoplast fusion products in *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **26**: in press.
  20. Park, H.M., J.M. Jeong, S.W. Hong, Y.C. Hah, and C.N Seong, 1986. Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. *Kor. J. Microbiol.* **24**: 91-97.
  21. Sato, M., M. Ichinoe, and O. Tsuruta, 1980. Usefulness of gel electrophoresis comparison of peroxidase for identification of *Fusarium* species. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **21**: 229-235.
  22. Tooly, P.W., W.E. Fry, and M.J. Villareal Gonzalez, 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infectans* populations. *J. Hered.* **76**: 431-436.
  23. Toyama, H., K. Yamaguchi, A. Shinmyo, and H. Okada, 1984a. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 363-368.
  24. Toyama, H., T. Yokoyama, A. Shinmyo, and H. Okada, 1984b. Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma*. *J. Biotechnol.* **1**: 25-35.
  25. Zamir, D. and I. Chet, 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 578-580.

(Received Feb. 14, 1989)