

18S 리보솜 RNA 부분 염기서열에 의한 *Trichoderma*속 및 관련 불완전균류의 진화학적 유연관계

이광재 · 안원근 · 이재동 · 주우홍*

부산대학교 미생물학과

*장원대학교 생물학과

Evolutionary Relationships of the Genus *Trichoderma* and Related Taxa Based on the Partial Sequences of 18S Ribosomal RNA

Goang Jae Lee, Won Gun An, Jae Dong Lee and Woo Hong Joo*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735

*Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

ABSTRACT: The evolutionary relationships of the genus *Trichoderma* and related taxa were assessed using partial sequencing of 18S ribosomal RNA. Phylogenetic tree divided into three major groups; 1. *Saccharomyces cerevisiae*-*Geotrichum klebahnii*-*Alternaria mali* group; 2. *Neurospora crassa*-*Aspergillus*-*Penicillium*-*Chrysosporium pannorum*-*Scopulariopsis* sp. group; 3. *Trichoderma* group. The genus *Trichoderma* seemed to be phylogenetically separated from *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* and *Penicillium* groups, and have passed through it's own evolutionary pathway.

KEYWORDS; Evolutionary relationships, *Trichoderma*, phylogeny, ribosomal RNA sequence

Cellulose, lignin 등의 섬유소 자원은 지구상에서 광합성에 의해 생산되는 유기물질의 상당부분을 점하고 있으나 완전한 이용은 이루어지고 있지 않다. 그래서 이들 유기생물자원이 미생물에 의해 효율적으로 분해되어 이용된다면 농업폐기물의 이용, 장래 부족할 것으로 예상되는 식량과 에너지 자원의 대체 자원 및 환경오염 문제 해결의 면에서 유용하리라 생각되어 많은 연구가 진행되고 있다. 현재 cellulose를 분해할 수 있는 균류 중 cellulolytic enzyme을 생산하는 *Trichoderma*속은 다수 분리되어 형태학적, 생리학적 및 생화학적 성질을 기초로 하여 동정되어 있으나(Zamir, 1985; Manczinger, 1987), 현행의 분류기준에 의한 분류는 생육 상태, 배양조건 등에 의해 그 결과가 불완전하고, 또 판정하는 사람에 따른 개인적인 차이를 배제할

수 없으므로 좀 더 신속하고 객관적인 기법의 도입이 요망된다. 이러한 필요성에 따라 1970년대부터 계통관계 해명을 위해 전 생물에 공통적으로 존재하는 핵산을 분석하려는 시도가 행해지고 있다. 특히 리보솜은 단백질의 합성을 담당하는 거대분자로 전 생물에 존재하며, RNA와 단백질의 복합체로 구성되어 있으므로 그 구조 및 기능상에서도 세균에서 인간까지 기본적으로 동일할 뿐만 아니라 구성 성분의 염기치환율이 낮고 보존성이 높으므로 리보솜 RNA는 분자 진화학적으로 계통을 논하는데 분자시계로 최적의 조건을 갖추고 있다(Hori and Osawa, 1986; Walker and Doolittle, 1983; Woese 1987). 그러나 리보솜 RNA의 전체에 대한 일차 염기배열을 결정하는 데에는 시간적으로 큰 제약이 있으므로 비교적 연구가 잘 진척되지 않고 있다. 특히 균류는 핵산을 추출하는 방법이 어렵고 결과에도 변이가 심하여 현재까지는 그 data가 매

*Corresponding author

우 부족한 실정이다. 본 연구는 리보솜 RNA 특히 18S 리보솜 RNA의 부분 염기배열을 결정하고 이들 결과를 기초로 하여 cluster 분석을 통하여 *Trichoderma*속의 균주 및 관련 분류군의 분자 진화학적인 측면에서의 계통과 유연관계를 규명하는 것을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

사용균주와 DNA primer

18S 리보솜 RNA 염기배열의 결정에는 *Trichoderma hamatum* IAM 12505(=IFO 31291), *Tr. harzianum* IAM 12506(=IFO 31292), *Tr. koningii* IAM 12534, *Tr. viride* IAM 5141, *Chrysosporium pannorum* KCTC 6060(=ATCC 16222), *Scopulariopsis* sp. KCTC 6088(=ATCC 44206), *Geotrichum klebahnii* KCTC 6183(=ATCC 20001), *Alternaria mali* KCTC 1936(=ATCC 44899, IFO 8984)의 8균주를 사용하였고, 비교를 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*(Hogan *et al.*, 1984), *Neurospora crassa*(Sogin *et al.*, 1986)의 18S 리보솜 RNA 염기배열, *Eurotium repens*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *A. flavus*, *Chaetosartoria cremea*, *A. raperi*, *Sclerocleista ornata*, *Hemicarpenales paradoxus*, *Warcupicella spinulosa*, *A. oryzae*와 *H. acanthosporus* (Chang *et al.*, 1991)의 18S 리보솜 RNA 부분염기서열, *Talaromyces flavus*와 *Eupenicillium crustaceum*(Logrieco *et al.*, 1990)의 18S 리보솜 RNA 염기배열을 사용하였다.

DNA primer는 *Saccharomyces cerevisiae*의 18S 리보솜 RNA 염기배열 1627에서 1641까지에 상보적인 5'-ACGGCGGTGTGTAC-3'(Hogan *et al.*, 1984)를 사용하였다.

공시균주의 배양

공시균주를 Czapek yeast broth, malt extract broth, Czapek yeast extract broth 그리고 YM broth에 약 27°C에서 2~3일간 배양하였다. 배양된 균체는 filtration 또는 원심분리에 의해 수거되

었다.

리보솜 RNA의 추출, Reverse transcriptase primer extension 반응

리보솜 RNA는 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 방법에 의해 추출하였다(Chomczynski and Sacchi, 1987). 추출한 리보솜 RNA 1 μ l에 5 μ l의 primer(2.5 μ g/ml)와 1.5 ml의 5X hybridization buffer를 혼합하여 90°C에서 5분간 가열하여 annealing 시켰다. Hybridization된 리보솜 RNA-primer 혼합액 7 μ l을 2-deoxyadenosine 5'- α -[35S] triphosphate (dATP [α -35S]; 0.37 MBq/ μ l) 1.0 μ l, 5X reverse transcription buffer 6 μ l, reverse transcriptase 3 μ l(4 units/ μ l)가 들어있는 tube에 가하여 혼합, ddCTP, ddATP, ddTTP, ddGTP로 반응시킨 후 extension 반응을 중지시켰다. 전기영동에는 8% acrylamide gel을 사용하였다.

진화거리 계산식 Jukes와 Cantor식, Knuc 및 Dnuc에 의한 cluster 분석

진화거리 계산식 Jukes와 Cantor식(Jukes and Cantor, 1969), Knuc(Kimura, 1980) 및 Dnuc(Hori and Osawa, 1986)을 사용하여 Unweighted pair group average method에 의해 cluster 분석을 행하였다. 이 cluster 분석에는 Tanaka 등(1984)의 personal computer RNA sequence cluster 분석용 program을 사용하였다.

결과 및 고찰

18S 리보솜 RNA의 1419에서 1623에 해당하는 부위 약 204개의 염기배열을 결정하여 Hogan 등(1984)에 의한 *S. cerevisiae* 18S 리보솜 RNA 전 염기배열과 비교하였다. 리보솜 RNA의 강한 2차 구조 형성에 의하여 결정할 수 없었던 일부 염기는 "N"으로, alignment gap 또는 deletion은 ". "으로 표시하였다(Fig. 1).

*Ch. pannorum*은 결정된 염기배열에서는 *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *Aspergillus* group, *Penicillium*의 teleomorph인 *T. flavus* 등과 큰 차이

	° 1421	° 1431	° 1441	° 1451	° 1461	° 1471	° 1481	° 1501	° 1511		
<i>S. cerevisiae</i>	AU	AACAGGUCUCUG	UGAUGGCCUUCU	AGAAGGUCUCU	GGGCGGCACG	CGCGCUACAC	UGACGGAGCC	AGCGAGUC	UAAGCUCUGCC	CGAGAGUCUCU	UGGUAUAUCU
<i>N. crassa</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>E. repens</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>A. fumigatus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Em. nidulans</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>A. flavus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>C. crenea</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>A. raperi</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Sc. ornata</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>H. paradoxus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>W. spinosa</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>A. oryzae</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>H. acanthosporus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>T. flavus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Eu. crustaceum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Ch. pannorum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Scopulariopsis</i> sp.	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>G. klebahnii</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Al. mali</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Tr. hamatum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Tr. harzianum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Tr. koningii</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
<i>Tr. viride</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
	° 1521	° 1531	° 1541	° 1551	° 1561	° 1571	° 1581	° 1591	° 1601	° 1611	
<i>S. cerevisiae</i>	U	GUGAAACUCC	GUCGUGCCUG	GGAUAPAGCA	UGGUAUUAU	UGCUCUCAA	CGAGGAUUC	CGAGUACA	GCUUCGUGUG	AUAGACGUGCC	
<i>N. crassa</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>E. repens</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>A. fumigatus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Em. nidulans</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>A. flavus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>C. crenea</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>A. raperi</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Sc. ornata</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>H. paradoxus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>W. spinosa</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>A. oryzae</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>H. acanthosporus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>T. flavus</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Eu. crustaceum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Ch. pannorum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Scopulariopsis</i> sp.	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>G. klebahnii</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Al. mali</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Tr. hamatum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Tr. harzianum</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Tr. koningii</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
<i>Tr. viride</i>	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	

Fig. 1. Aligned sequences of 18S rRNA partial sequence (the position 1419 through 1623).

Dashes, nucleotides identical to those of *S. cerevisiae*; N, not determined base; ·, alignment gap or deletion.

Abbreviation: *S. Saccharomyces*; *N. Neurospora*; *E. Eurotium*; *A. Aspergillus*; *Em. Emmericella*; *C. Chaetosartorya*; *Sc. Sclerocleista*; *H. Hemicarpenales*; *W. Warcupiella*; *T. Talaromyces*; *Eu. Eupenicillium*; *Ch. Chrysosporium*; *G. Geotrichum*; *Al. Alternaria*; *Tr. Trichoderma*.

Table 1. Matrix of evolutionary distance (*D_{nucl}*) among the species of genus *Trichoderma* and related taxa.

n	0(2)	0(3)	0(4)	0(5)	0(6)	0(7)	0(8)	0(9)	0(10)	0(11)	0(12)	0(13)	0(14)	0(15)	0(16)	0(17)	0(18)	0(19)	0(20)	0(21)	0(22)	0(23)
1 0(1)	0.023	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.039	0.042	0.048	0.045	0.042	0.039	0.039	0.052	0.045	0.082	0.030	0.062	0.068	0.112	0.065	0.065
1 0(2)		0.026	0.033	0.026	0.033	0.030	0.030	0.033	0.039	0.036	0.026	0.030	0.036	0.048	0.039	0.072	0.052	0.075	0.075	0.108	0.055	0.075
1 0(3)			0.006	0.000	0.000	0.009	0.003	0.006	0.012	0.014	0.000	0.003	0.009	0.020	0.039	0.045	0.065	0.086	0.075	0.108	0.065	0.082
1 0(4)				0.006	0.006	0.009	0.003	0.006	0.012	0.014	0.006	0.003	0.009	0.020	0.039	0.045	0.065	0.086	0.075	0.108	0.065	0.082
1 0(5)					0.000	0.009	0.003	0.006	0.012	0.014	0.000	0.003	0.009	0.020	0.039	0.045	0.065	0.086	0.075	0.108	0.065	0.082
1 0(6)						0.009	0.003	0.006	0.012	0.014	0.000	0.003	0.009	0.020	0.039	0.045	0.065	0.086	0.075	0.108	0.065	0.082
1 0(7)							0.006	0.009	0.014	0.017	0.009	0.016	0.012	0.023	0.042	0.048	0.065	0.086	0.075	0.112	0.068	0.082
1 0(8)								0.003	0.009	0.012	0.003	0.000	0.006	0.017	0.036	0.042	0.062	0.082	0.072	0.104	0.062	0.079
1 0(9)									0.006	0.009	0.006	0.003	0.009	0.014	0.039	0.045	0.065	0.079	0.068	0.104	0.062	0.075
1 0(10)										0.003	0.012	0.009	0.014	0.009	0.045	0.059	0.065	0.079	0.075	0.112	0.068	0.082
1 0(11)											0.014	0.012	0.017	0.012	0.042	0.042	0.062	0.075	0.072	0.108	0.065	0.079
1 0(12)												0.003	0.009	0.020	0.039	0.045	0.065	0.086	0.075	0.108	0.065	0.082
1 0(13)													0.006	0.017	0.036	0.042	0.062	0.082	0.072	0.104	0.062	0.079
1 0(14)														0.012	0.036	0.042	0.058	0.082	0.072	0.104	0.062	0.072
1 0(15)															0.048	0.039	0.065	0.082	0.079	0.116	0.072	0.079
1 0(16)																0.072	0.058	0.086	0.082	0.108	0.058	0.079
1 0(17)																	0.086	0.089	0.089	0.123	0.082	0.100
1 0(18)																		0.045	0.086	0.123	0.079	0.082
1 0(19)																			0.075	0.119	0.079	0.072
1 0(20)																				0.100	0.065	0.062
1 0(21)																					0.052	0.093
1 0(22)																						0.062

The numbers above the diagonal are percentages of difference corrected for multiple base changes by the method of Hori and Osawa (1986).

1=*S. cerevisiae*; 2=*N. crassa*; 3=*E. repens*; 4=*A. fumigatus*; 5=*Em. nidulans*; 6=*A. flavus*; 7=*C. cremea*; 8=*A. raperi*; 9=*S. ornata*; 10=*H. paradoxus*; 11=*W. spinosa*; 12=*A. oryzae*; 13=*H. acanthosporus*; 14=*T. flavus*; 15=*Eu. crustaceum*; 16=*Ch. pannorum*; 17=*Scopulariopsis* sp.; 18=*G. klebahnii*; 19=*Al. mali*; 20=*Tr. hamatum*; 21=*Tr. harzianum*; 22=*Tr. koningii*; 23=*Tr. viride*.

가 없었으나 *Scopulariopsis* sp.는 다소 염기배열에서 변화가 있었다. *G. klebahnii*는 상기 2군중보다 *S. cerevisiae*와 더 유사하였다. 한편 *Al. mali*는 다른 공시균종과는 다른 부위에서 다소 변화를 보였다. *Trichoderma*속의 균종은 비교한 다른 균주와는 염기배열에서 많은 차이가 관찰되었다. 특히 *Trichoderma*속의 균종에만 특이적인 염기배열이 1500부위를 전후해서 확연히 관찰되어 *Trichoderma* 동정용 DNA probe 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Dissimilarity에 의한 진화거리는 대표적으로 *Dnuc*에 의한 결과를 Table 1에 나타내었다. *Ch. pannorum*과 *Scopulariopsis* sp.는 *S. cerevisiae*와 0.06에서 0.09의 거리에 있었고, *G. klebahnii*와 *Al. mali*는 *S. cerevisiae*와 각각 0.026과 0.062의 거리에 있었다. *Trichoderma*는 *S. cerevisiae*와 0.068에서 0.113의 거리에 있었고, *Ch. pannorum*, *Scopulariopsis* sp.과도 동일한 거리를 보였다.

Fig. 2에는 진화거리 계산식 *Dnuc*에 의한 Cluster의 결과를 보여주고 있다. 전체적으로 보면 계통수는 3개로 대별되며, 첫번째 group은 *S. cerevisiae*

와 *G. klebahnii*, *Al. mali*로 구성되어 있으며, 두번째 group은 *N. crassa*와 *Aspergillus* 균종, *Penicillium*의 teleomorph 균종, *Ch. pannorum*, *Scopulariopsis* sp.로 구성되어 있음을 알 수 있고, *Trichoderma*는 세번째 group을 형성하고 있다. 한편 *Trichoderma*는 *Tr. hamatum*과 *Tr. viride*의 subgroup과 *Tr. harzianum*과 *Tr. koningii*의 subgroup으로 나누어져 있었다.

Jukes와 Cantor식, *Knuc*에 기초한 계통수 (unpublished data)는 동일하였으나 *Dnuc*에 의한 계통수보다 세분화되는 양상을 보였다. 또한 *G. klebahnii*와 *Al. mali*는 *Ch. pannorum*, *Scopulariopsis* sp.와 먼 거리에서 연결되었다. *Trichoderma*는 역시 먼 거리에서 독자적인 cluster 이루고 있다.

이상의 결과에서 *Trichoderma*는 계통적으로 상당히 오래전에 *S. cerevisiae*, *Aspergillus*, *Penicillium* 군에서 분화되어 독자적인 진화 경로를 거쳤으나 형태적으로는 변화가 없어 구별이 되지 않고 있다고 생각되며 현 data에서 보면 하나의 taxa로 봄이 타당하다고 생각된다. *Trichoderma*는 버섯의 병원균, cellulase 생산균, composting

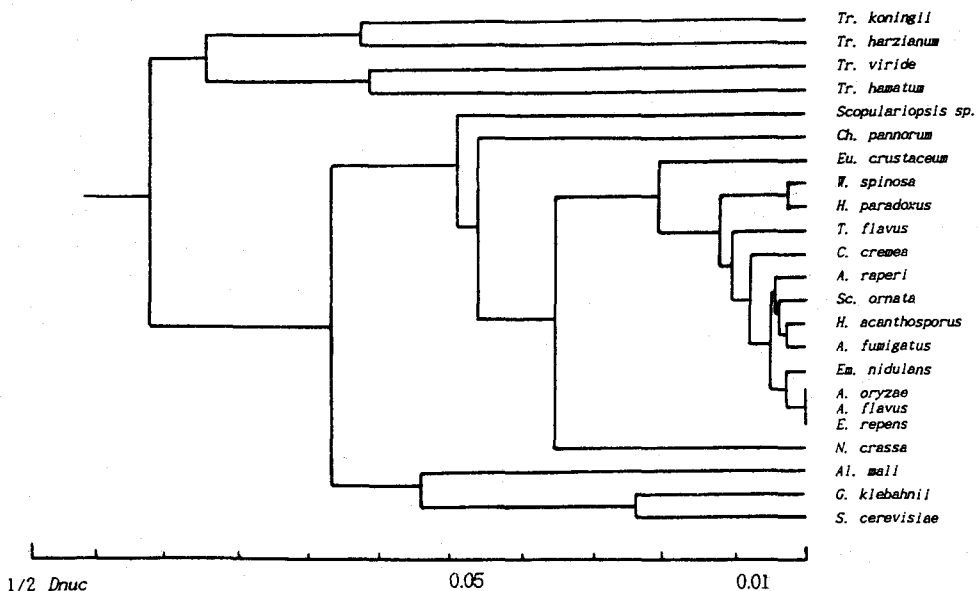


Fig. 2. Phylogenetic tree for the species of genus *Trichoderma* and associated genera. The tree was constructed by UPGMA method. 1/2 *Dnuc*=relative evolutionary distance deduced from Hori and Osawa's formula (1986). For Abbreviations; See Fig. 1.

이용균 및 식물병원균의 길항미생물로서 사람과 불과분의 관계에 있는 균종이다. 그러나 이들간의 상호 구별은 여러가지 난점을 수반하고 있다. 특히 Meyer 등(1992)은 restriction fragment length polymorphisms(RFLPs)로 *Trichoderma* 균종을 분석한 결과 cellulase 생산균인 *Tr. reesei*가 *Tr. longibrachiatum*과는 다른 균을 형성한다고 하나 Arisan-Atac(1995)의 random amplified polymorphic DNA amplification(RAPD) 분석 결과로 보면 상기 두 균종이 동일한 group을 형성하였다. 또한 *Tr. viride*로 동정된 균주도 동일한 group을 형성하지 않는다는 Arisan-Atac(1995)의 결과에서 보다 해상력이 높은 1차 염기 배열에 기초한 상호 유연관계의 해명이 절실하며 본 실험에서 비교되지 않은 *Trichoderma* 균종 *Tr. reesei*, *Tr. todica*, *Tr. longibrachiatum*, *Tr. polysporum*, *Tr. pseudokoningii*, *Tr. virgatum*, *Tr. saturnisporum*, *Tr. parceramosum*, *Tr. citrinoviride*, *Tr. piluliferum*과 이들의 teleomorph인 *Hypocrea*를 포함하여 진 염기배열 결정 등을 기초한 계통해석에 대한 상세한 연구가 요구되고 있다. *Trichoderma*속과 유사한 균류에는 *Trichoderma*형의 분생자병과 유사한 형태인 *Pachybasidium*형, *Cephalosporium*(*Acemonium*)형, *Gliocladium virens*형, *Gliocladium deliquescens*형 등의 분생자병을 가진 종과 이들과 중간형을 나타내는 균종 등도 보고되고 있다. 또한 *Trichoderma*의 teleomorph인 *Hypocrea*와 유사한 *Podostroma*속, *Thuemenella*속, *Protocrea*속 등의 teleomorph속에서 자낭포자를 분리 배양하면 분생자 세대는 여러가지 중간형 그리고 심지어 다른 form-genera로 해석될 수 밖에 없는 종도 다수 있다. 이들을 종합적으로 해석하여야만 *Trichoderma*와 관련 teleomorph속의 개념이 확실히 될 것으로 추정된다.

적 요

*Trichoderma*속과 관련균의 진화학적 유연관계를 18S 리보솜 RNA 부분염기배열(1419-1623)에 의하여 결정하였다. 계통수는 3개로 대별되었다

(*Saccharomyces cerevisiae*-*Geotrichum klebahnii*-*Alternaria mali* group, *Neurospora crassa*-*Aspergillus*-*Penicillium*-*Chrysosporium pannorum*-*Scopulariopsis* sp. group, *Trichoderma* group). *Trichoderma*속은 계통적으로 오래전에 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, *Penicillium* groups과 분화되어 독자적인 진화경로를 거처온 것으로 믿어진다.

사 사

이 논문은 1991년도 한국학술진흥재단 자유공모 과제 연구비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

參考文獻

- Arisan-Atac, I., E. Heidenreich, and C.P. Kubicek. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Letters*. **126**: 249-256.
- Chang, J.-M., H. Oyaizu and J. Sugiyama. 1991. Phylogenetic relationships among eleven selected species of *Aspergillus* and associated teleomorph genera estimated from 18S ribosomal RNA partial sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 289-308.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Hogan, J.J., R.R. Gutell, and H.F. Noller. 1984. Probing the conformation of 18S rRNA in yeast 40S ribosomal subunits with kethoxal. *Biochemistry* **23**: 3322-3330.
- Hori, H. and Osawa. 1986. Evolutionary change in 5S rRNA secondary structure and a phylogenetic tree of 352 5S rRNA species. *Biosystems* **19**: 163-172.
- Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein*

- Metabolism, Vol 3, ed. by H.N. Munro. Academic Press, New York, p. 21-132.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Logrieco, A., S.W. Petersor and D.T. Wicklow. 1990. Ribosomal RNA comparison among taxa of terverricillate *Penicilia*. In Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. ed. by Samsor. R.A. and J.I. Pitt. Plenum Press, New York, P. 343-355.
- Manczinger, L. 1987. Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 9(3): 241-217.
- Mankin. A.S. Skryabin, K.G. and Rubtsov, P. M. 1986. Identification of ten additional nucleotides in the primary structure of yeast 18S rRNA. *Gene.* 44: 143-145.
- Meyer, W., R. Morawetz, T. Borner and C.P. Kubicek. 1992. The use of DNA-fingerprint analysis of the *Trichoderma aggregate*. *Curr. Genet.* 21: 27-30.
- Sogin, M.L., K. Miotto, and L. Miller. 1986. Primary structures of the *Neurospora crassa* small subunit ribosomal RNA coding region. *Nucl. Acids Res.* 14: 9540.
- Tanaka. Y., T. Tarumi, and K. Wakimoto. 1984. Pasokon Tokei Kaiseki Handobukku, II Tahenryou Kaiseki Hen (Handbook of statistical Analysis) (In Japanese) Kyoritu Shuppan Co., Tokyo, p. 226-257.
- Walker, W.F. and W.F. Doolittle. 1983. 5S rRNA sequences from eight basidiomycetes and fungi imperfecti. *Nucl. Acids Res.* 11: 7625-7630.
- Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbial Reviews* 51: 221-271.
- Zamir, D. 1985. Application of enzyme electrophoresis for the indentification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 31: 578-580, 7.