

電氣泳動法을 利用한 *Trichoderma* spp 分類可能性에 關한 研究

朴 元 穆* · 朴 龍 河* · 李 恩 影**

Application of Electrophoretic Methods for differentiation of *Trichoderma* species

Park, W.M.,* Y.H. Park,* and E.Y. Lee**

ABSTRACT

These researches were carried out to investigate the morphology of different species of *Trichoderma* and the possibilities of differentiation of the species of *Trichoderma* by electrophoretic methods.

Variations between the isolates of a species of *Trichoderma* indicate the genetical differences, also isozyme and protein patterns will be useful to investigate genetical variations between the isolates. It might be possible that distinct bands of isozymes of esterase, phosphotase, catalase, catalase differentiate species of *Trichoderma*.

緒 言

Trichoderma spp.는 土壤病原菌에 對해 Antagonistic effect 가 있는 土壤微生物로 植物의 生物學的 防除材料^{1,7)} 및 버섯栽培, 저장물에 被害를 입히는 有害菌으로 研究가 되어 왔다.^{1,8)}

Rifai¹⁶⁾에 의하면 本菌의 分類는 Persoon, 이 처음 論議 한 바 있으며 1871年 Harz, 20世紀에 Bisby, Gilman, Rifai 等에 의해 이루어져 왔다. 이들의 分類 根據는 菌의 形態學的인 것으로 Rifai¹⁶⁾는 phialospore 表面의 거칠고 매끄러운 狀態, 色, 크기, 形態, phialide 의 形態, conidiophore 의 分支形態, 두께, 굵기, sterile hyphae 의 有無, 培養器에 나타나는 colony 의 形態 및 色, 배출대사물의 色素 等이었다. 이러한 形態的인 分

類는 觀察者의 主觀, 菌의 培養條件 및 培養期間에 따라 phialospore 의 形成程度와 Colony 의 形成狀態가 달리 나타나므로 잘 못 分類되어 질 수 있다.

電氣泳動法의 protein, isozyme patterns 를 利用한 生物의 分類는 여러 方面에서 좋은 結果를 보여주었다. 朴¹⁴⁾, 孫¹⁷⁾, Kahler⁹⁾ 等은 esterase 의 isozyme pattern 로 植物의 分類를 하였고, Franke⁵⁾ 等은 Physarale 目의 分類, Clar 等³⁾은 *Phytophthora* 의 分類, Stou 等¹⁹⁾에 의한 *Thamnidium* sp.의 分類, Neelson 等¹³⁾에 의한 *Aspergillus* sp.의 分類, Meyer 等¹¹⁾에 의한 *Fusarium* sp.의 分類, Baptist 等²⁾에 의한 bacteria 의 分類 等, 高等生物에서 微生物까지 分類가 可能하다고 報告 된 바 있다. 이에따라 本 研究는 *Trichoderma* 分類의 亂點을 補完하기 위해 電氣泳動法의 導入이 可能한 가를 究明하기 위해 實施하였다.

*高麗大學校 農科大學

**林業試驗場

材料 및 方法

使用菌株: 本實驗에 使用한 菌株는 나무표피, 土壤, 버섯에 寄生하는 *Trichoderma* 屬에 속하는 6種, 19菌株를 使用하였다. 채취된 菌株는 peptone dextrose agar 에서 3~4日間 培養後, pour plate method 를 利用하여 single colony 를 分離 培養하였다. 形態的인 分類는 本 菌들을 malt extract agar 에 3~4日間 培養後 Rifai의 分類 Key¹⁶⁾를 利用하여 *Trichoderma*의 種을 分類하였다.

電氣泳動 材料抽出: 菌株를 Modified Czapek dox medium 50ml 를 담은 100ml Erlenmeyer flask 에 接種後, 25°C incubator 에서 10日間 培養하였다. modified Czapek-dox medium 은 NaNO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, CaCl_2 0.05g, ZnSO_4 0.01g, CuSO_4 0.001g, Glucose 10g, Yeast Extract 5g, H_2O 1000ml 이다. 培養後, 菌株를 büchner funnel(Filter paper; whatman No. 1)로 거른後, 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 菌絲를 씻어냈다. 菌絲 2g 을 小量의 洗滌된 모래와 함께 5ml 의 Tris-HCl buffer(pH7.5)를 유발에 넣어 微細하게 마쇄後, 冷凍高速遠心分離機에서 12,000g 로 30分間 4°C 에서 遠心分離하여 上等液을 取하여 電氣泳動 材料로 使用하였다.

電氣泳動法: 分離 gel 은 2~25% polyacrylamide gradient gel¹⁷⁾과 7% homogenous polyacrylamide gel¹⁸⁾의 두가지 方法을 使用하였다. gradient gel 에서는 esterase 와 phosphatase 의 isozyme patterns 를 觀察하였고 7% homogenous gel 에서는 protein patterns 와 catalase isozyme patterns 를 觀察하였다. gradient gel buffer 는 0.35M Tris-HCl(pH 8.9)이었고 homogenous gel buffer 는 0.1M Tris-HCl(pH8.9)이었다. tray buffer 는 두 方法 共히 0.125M Tris-Glycine buffer (pH8.4)을 증류수로 1:5 로 희석 使用하였다. 試料는 tube 當 100 μ l 를 使用하였으며 電壓은 7% homogenous gel 에서는 처음 100V 로 1時間 維持後, 200V 로 높여 2時間 電氣泳動시켰으며 gradient gel 에서는 처음 100V 로 1時間 維持後 200V 로 높여 23時間 電氣泳動시켰다.

發色法: 電氣泳動이 끝난後, gel 을 꺼내어 觀察하고자 하는 酵素의 種類에 따라 다음과 같이 發色시켰다.

1. protein: gel 을 發色液(800ml H_2O +200ml Methanol+70ml Acetic acid+60g Trichloroacetic acid: 1% Comassie brilliant blue R250=40:1)에 浸漬하여 1時間 經과後 脫色液(H_2O :Methanol:Acetic acid=14:1)에 12時間 浸漬하였다.¹⁷⁾

2. Esterase: gel 을 0.1M Tris-HCl(pH 7.2) buffer 에 30分間 buffer 를 2번 갈아주면서 浸漬하여 gel 의 酸度를 調節한後, 發色液(α -naphthylacetate 50mg, Acetone 2cc, Fast blue RR salt 50mg, 0.1M Tris-HCl buffer(pH7.2) 100ml)에 35°C 에서 浸漬하여 band 가 明確하여 질 때까지 發色하였다.¹⁷⁾

3. Phosphatase: gel 을 0.1M Acetate buffer(pH5.2)에 30分間 buffer 를 2번 갈아주면서 浸漬한後, 發色液(α -naphthylphosphate 60mg, Fast garnet G.B.C. salt 50mg, MgCl_2 (10% 용액) 6ml, 0.1M Acetate buffer(pH5.2) 100ml)에 37°C 에서 30分間 어두운 곳에서 發色시켰다.

4. Catalase: gel 을 蒸溜水에 15分間 浸漬한後, 0.03% H_2O_2 에 1~2分間 再浸漬하고 發色液(2% FeCl_3 : 2% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ =1:1)에 10分間 浸漬하여 發色하였다.

모든 gel 은 發色이 끝난後, 5% Acetic acid 에 浸漬하여 4°C 에서 保存하였다.

結果 및 考察

形態의 分類: colony 의 特徵은 *Trichoderma* spp. 를 malt extract agar medium 에 25°C 에서 3~4日間 培養後 實溫에서 5日間 방치하여 觀察하였다.

T. polysporum 의 colony 는 白色을 띄우므로 다른 種과는 區別이 뚜렷하였으며 *T. viride* 는 colony 가 배지에 雲문形態로 絨毛를 形成하였다. *T. pseudokoningii* 는 배지에 노란색의 pigments 를 分泌하였으며 colony 의 形態로 *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. hamatum* 의 區別은 어려웠으나 *T. koningii* 의 胞子는 주로 Petri dish 배두리로 몰려 形成하였다.

현미경적 特徵을 觀察하기 위하여 *Trichoderma* spp. 를 malt extract agar 에 2~3日間 培養後 400x 또는 1000x 로 觀察하였다. 菌絲의 分枝形態에서 *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. polysporum*, *T. hamatum* 등은 規則的이었고 *T. viride* 와 *T. pseudokoningii* 는 不規則的이었다. 不規則的 分枝形態에서 *T. viride* 는 main branch 와 side branch 가 比較的 예각을 이루고 있으며 *T. pseudokoningii* 는 比較的 직각을 이루었다. *T. viride* 는 胞子表面이 1000x 에서 immersion oil 을 使用하여 觀察하였을 때 거칠게 보이고 *T. pseudokoningii* 의 胞子表面은 매끄럽게 보이므로 두 種間의 區別이 되었다. 規則的인 分枝形態에서 *T. polysporum* 은 胞子가 투명하며 sterile hyphae 를 形成하였고 *T. hamatum* 은 conidiophore 가 두껍고 짧으며 phialide 가 密集되어 있어 分枝形態는 *T. polysporum* 과 비슷

하나 胞子가 靑色이고 sterile hyphae를 形成하지 않으므로 區別이 되었다. *T. koningii*와 *T. harzianum*의 分枝形態는 비슷하여 區別이 되지 않으나 胞子の 形態 및 크기로 區別이 되었다. *T. koningii*의 胞子是 綠은 녹색으로 타원형이며 胞子の 크기가 3-4.8×1.9-2.8 μ 로 원형인 *T. harzianum* 胞子 크기인 2.4-3.2(~3.5)×2.2-2.8(~3) μ 에 비해 대단히 크므로 區別이 되었다. 이와같은 方法으로 수집된 菌은 6種으로 區別이 되었는데 *T. viride* 4菌株, *T. harzianum* 4菌株, *T. koningii* 2菌株, *T. polysporum* 3菌株, *T. pseudo-koningii* 4菌株, *T. hamatum* 1菌株이었다.

그러나 malt extract agar에서 5일이 지난 後 현미

경을 利用한 觀察은 conidiophore가 密集되어 있어 菌絲의 分枝形態로 種間의 區別이 不可能하였다. 特히, potato dextrose agar에서는 *Trichoderma* spp.의 colony 形態 및 色感이 달리 나타나는 경우가 많아 區別에 도움이 되지 않았다.

protein 및 isozyme patterns에 의한 分類: *Trichoderma*의 種間 isozyme patterns와 protein patterns의 比較는 band의 有·無에 따라 Table 1, 2, 3에 表記하였다.

1. Esterase isozyme patterns: Esterase patterns에 의한 分類는 Fig. 1에서와 같이 6種間 뚜렷한 區別이 있었다. *T. viride*의 特徵的 band는 7개로 1, 3-4, 5,

Table 1. Distribution of isozyme bands of esterase from different species of *Trichoderma* on 2~25% gradient gels

Isozyme	Band No.	<i>T. viride</i>	<i>T. harzia.</i>	<i>T. koning.</i>	<i>T. polysp.</i>	<i>T. pseudo.</i>	<i>T. hamat.</i>
esterase	1	+	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	+
	2-1	-	-	-	-	+	+
	2-2	-	-	-	+	-	+
	3	-	-	-	+	-	+
	3-1	-	-	-	-	+	+
	3-2	-	-	+	-	+	-
	3-3	-	+	-	+	-	-
	3-4	+	+	-	+	-	-
	4	-	-	-	+	-	-
	4-1	-	-	-	+	-	-
	5	+	-	+	-	+	+
	5-1	-	-	+	-	-	+
	5-2	-	-	-	+	-	-
	5-3	-	-	+	-	-	+
	5-4	-	-	-	+	-	-
	5-5	+	-	+	-	-	-
	5-6	+	+	-	-	+	-
	5-7	-	-	-	+	-	-
	5-8	-	-	-	-	-	+
	6	-	-	-	+	-	+
	6-1	-	+	-	-	-	-
	6-2	-	-	+	-	-	-
	6-3	-	-	-	+	+	+
	7	-	-	+	-	-	+
	7-1	+	-	+	-	-	-
	7-2	+	-	+	-	-	+
	7-3	-	+	-	-	+	-

+ : presence, - : absence

Table 2. Distribution of protein bands from different species of *Trichoderma* on 7% homogenous gels.

	Band No.	<i>T. viride</i>	<i>T. harzia.</i>	<i>T. koning.</i>	<i>T. polysp.</i>	<i>T. pseud.</i>	<i>T. hamat.</i>
protein	1	..	+	..	+	+	..
	1-1	..	+	+	+
	1-2	+	+	+
	1-3	..	+
	2	+	..	+	..	+	..
	2-1	+	..	+
	3	+	+	+	+
	3-1	+
	3-2	+	+
	4	..	+
	4-1	+	+	..	+
	4-2	+
	4-3	..	+
	5	+	+	..
	5-1	+
	6	+	..	+	..	+	..
	6-1	+	..	+	..
	7	..	+
	7-1	+	+	+	..
	8
9	+	

+: presence, ..: absence

Table 3. Distribution of isozyme bands of phosphotase and catalase from different species of *Trichoderma* on 2~25% gradient gels and 7% homogenous gels.

	Isozyme	Band No.	<i>T. viride</i>	<i>T. harzia.</i>	<i>T. koning.</i>	<i>T. polysp.</i>	<i>T. pseudo.</i>	<i>T. hamat.</i>
phosphotase		1	+	+
		2	+	+	+	..	+	+
		2-1	+
atalase		1	+	+
		2	+	+	+	..	+	+
		2-1	+

+: presence, ..: absence

5, 5-6, 7-1, 7-2였으며 5~6 band는 個體에 따라서는 나타나지 않았다. *T. harzianum*의 特徵的 band는 5로 3-3, 3-4, 5-6, 6-1, 7-3이었다. 個體에 따라 Rf 0.3, 0.49, 0.52, 0.60, 0.63, 0.68, 0.69, 0.71, 0.73, 0.87, 0.90에 band가 나타나는 등 個體間 band 形態에 많은 차이가 있었다. *T. koningii*의 特徵的 band는 9개로

2, 3-2, 5, 5-1, 5-3, 5-5, 6-2, 7, 7-2이었고 7-2 band는 個體에 따라 나타나지 않았다. *T. polysporum*의 特徵的 band는 11개로 2-2, 3, 3-3, 3-4, 4-4-1, 5-2, 5-4, 5-7, 6, 6-3이었고 3, 4, 4-1, 5-2 band는 個體에 따라 나타나지 않기로 하였고 Rf 0.85에 band가 나타나기도 하였다. *T. pseudokoningii*의 特徵的 band는 7개로 2-1,

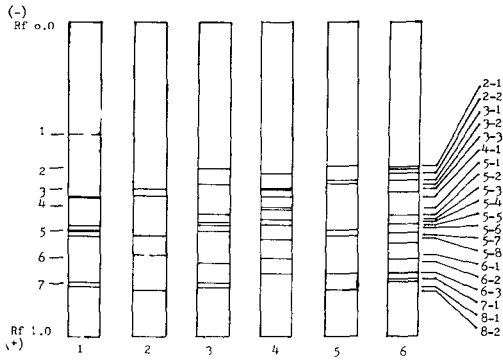


Fig. 1. Isozyme patterns of esterase of *Trichoderma* spp. on the 2~25% gradient gel.

- 1, *T. viride* 2, *T. harzianum*
- 3, *T. koningii* 4, *T. polysporum*
- 5, *T. pseudokoningii* 6, *T. hamatum*

3-1, 3-2, 5, 5-6, 6-3, 7-3이었고 個體에 따라 Rf 0.51에 band가 나타나기도 하였다. *T. hamatum*의 band는 13개로 2, 2-1, 2-2, 3, 3-1, 5, 5-1, 5-3, 5-8, 6, 6-3, 7, 7-1이었다.

Esterase patterns에 의한 分類는 Meyer,¹¹⁾ Franke⁵⁾, Neelson¹³⁾ 등에 의한 結果와 同-하게 種間 뚜렷한 差異를 보여 주므로 esterase patterns에 의한 *Trichoderma* 分類는 可能性이 높았다.

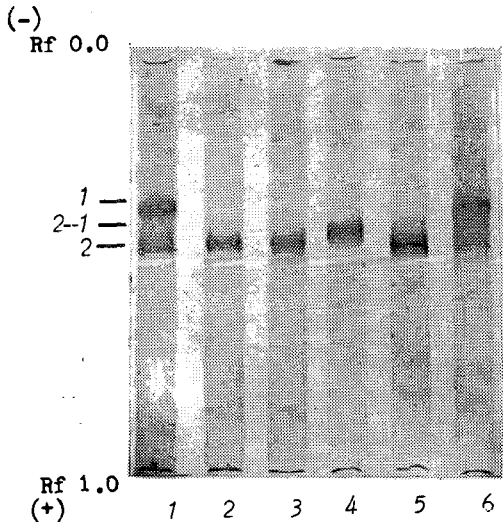


Fig. 2. Isozyme patterns of phosphatase of *Trichoderma* spp. on the 2~25% gradient gel.

- 1, *T. viride* 2, *T. harzianum*
- 3, *T. koningii* 4, *T. polysporum*
- 5, *T. pseudokoningii* 6, *T. hamatum*

2. phosphatase isozyme patterns: phosphatase patterns에 의한 種의 分類는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 band 形成이 單調롭게 나타난다. *T. viride*와 *T. hamatum*은 1, 2에 band가 있었고 *T. viride*의 個體에 따라 Rf 0.39, 0.44에 band가 나타나기도 하였다. *T. polysporum*의 band는 2-1에 1개 있었다. *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* 등은 2에 1개 band가 形成하였으므로 *Trichoderma* 種間의 區別은 phosphatase patterns만으로 不可能하였다. *T. hazianum*은 個體에 따라 Rf 0.46에 *T. polysporum*은 Rf 0.44에 band가 나타나기도 하였다. phosphatase patterns에서 個體間 變異는 *T. hazianum*에서 2개, *T. polysporum*에서 1개, *T. viride*에서 1개 등이었다.

3. protein patterns: protein patterns에서 個體間 약 30개 이상의 band가 나타나는데 band의 形成位置는 種內 個體間 minor band로 差異가 있었으나 major band는 *T. harzianum*을 제외한 다른 種에서는 種內 一致하였다. Fig. 3은 protein을 發色한 major band만의 zymogram이다. *T. viride*의 major band는 8개로 1-2, 2, 2-1, 3, 3-1, 6, 7-1, 8이었다. *T. harzianum*은 個體間 major band의 形成位置 差異가 많았으나 共通의 4에 뚜렷하였다. *T. koningii*의 major band는 8개로 2, 2-1, 3, 4-1, 4-2, 6, 6-1, 9이었다. *T. polysporum*의 major band는 8개로 1, 3-1, 3-2, 4-1, 5, 5-1이었다. *T. pseudokoningii*의 major band는 7개로 1, 1-1, 1-2, 2, 5, 6, 6-1, 7-1이었다. *T. hamatum*의 major band는 4개로 1-1, 1-2, 3, 4-1이었다.

protein patterns에 의한 分類는 Glynn,⁶⁾ Kulik¹⁰⁾, Baptist²⁾ 등의 結果와 同-하게 種間 뚜렷한 差異가 있었다. Steward¹³⁾에 의하면 "protein patterns에 의한

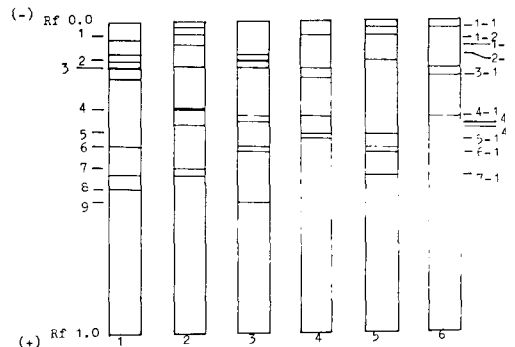


Fig. 3. Protein patterns of *Trichoderma* spp. on the 7% polyacrylamide gel.

- 1, *T. viride* 2, *T. harzianum*
- 3, *T. koningii* 4, *T. polysporum*
- 5, *T. pseudokoningii* 6, *T. hamatum*

호는 종間 metabolism의 差異에 의한 것"으로 protein polymorphism에 의한 종間 區別은 微生物 taxonomy에 電氣泳動의 利用 可能性을 示唆하고 있다.

4. Catalase isozyme patterns: catalase patterns은 Fig. 4에서와 같이 3개 band를 形成한다. *T. viride*는 1, 3의 2개 band로 다른 종과 區別이 뚜렷하고 *T. polysporum*은 1, 2, 3의 3개 band로 區別이 되었으나 *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*의 band는 1개의 同 位置로 종間 差異가 없었다.

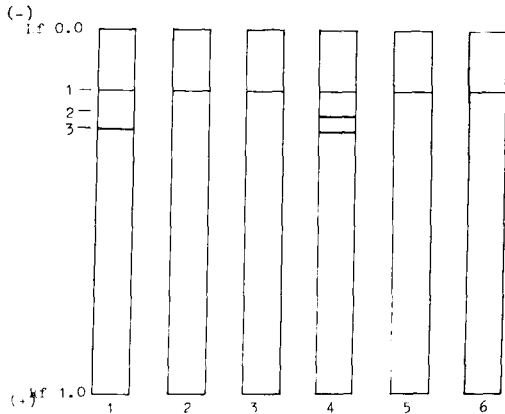


Fig. 4. Isozyme patterns of Catalase of *Trichoderma* spp. on the 7% polyacrylamide gel.

1. *T. viride* 2. *T. harzianum*
3. *T. koningii* 4. *T. polysporum*
5. *T. pseudokoningii* 6. *T. hamatum*

Meyer 등^{11,12)}에 의하면 *Fusarium oxysporum*, *F. solarioles*間에는 esterase, phosphatase patterns이 個體間 部分的 差異가 있었으나 종間 差異가 뚜렷하였으므로 *F. oxysporum*의 formae間 分類는 個體間 差異보다 formae間 差異가 비슷하므로 formae間 分類는 어렵다고 하였다. 이러한 종內 heterogenicity는 Nealson과 Garber¹³⁾에 의한 *Aspergillus* 종間 taxonomy, Penderdy와 Turner¹⁴⁾에 의한 *Mortierella*의 종間 分類等에 報告된 바 있다. *Trichoderma*의 protein 및 isozyme patterns에서도 個體間 變異가 있었으며 *T. harzianum*의 종內 個體 變異는 다른 종內 變異보다 많은데 이는 종內 heterogenicity가 크기 때문이다 推定된다.

*Trichoderma*의 分類는 protein, esterase patterns에서 종間 뚜렷한 差異를 보여주고 phosphatase와 catalase patterns에서는 종間 band 위치가 同 一하거나 비 同 一하여 종間 分類는 어려웠다. 이와같이 *Trichoderma*

의 分類는 protein 및 特定酵素의 isozyme patterns를 選拔하여 使用하면 可能性이 더욱 크리라 推定되며 enzyme patterns에 따라 종間 差異가 있는것은 종間 taxonomy에 電氣泳動의 導入이 可能하다는 것을 보여 주고 있다.

問題는 모든 酵素가 모든 종의 分類에 모음이 되지 않는 것에 있다. 따라서 이러한 研究를 發展시킨다면 어떤 酵素를 어떠한 方法으로 어떻게 使用하는가에 따라 종間 明確한 區別이 되어지리라 생각된다. 또한 *T. harzianum*의 protein 및 esterase patterns에서 나타난 바와 같이 同 一種內 個體間 差異가 많은것은 形態的으로 同 一하나 遺傳的인 變異가 同 一種內 상당히 存在하리라 推定되며 電氣泳動에 의한 종의 分類方法은 종內 遺傳學 研究에 모음이 될것이다. 종의 分類는 形態學的인 面도 可能하나 形態學的인 面을 補完하기 위하여 電氣泳動法을 補條的으로 使用할 때, 可能性은 더욱 클 것이다.

摘要

1. 本 研究는 *Trichoderma* 종間 形態의 分類와 電氣泳動法을 利用한 分類의 可能性에 關하여 研究하였다.

2. 電氣泳動法을 利用한 *Trichoderma*의 enzyme patterns에서 各 種의 特徵의 band를 갖고 있어 種의 分類에 可能性을 보였으며 個體間 band 形成에 差異가 있는 것은 遺傳學的 變異가 種內 存在하며 電氣泳動法은 種內 遺傳學 研究에 도움이 되리라 看做된다.

3. *Trichoderma* spp.의 分類는 esterase, protein patterns으로 明確하게 6種間 區別되며 phosphatase, catalase patterns으로는 6種間 部分的 區別이 되었다.

LITERATURE CITED

1. Abd-El-Moity, T.H., and M.N. Shatla. 1981. Biological control of white rot disease of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *T. harzianum*. Phytopathol. Z. 100 : 29-35.
2. Baptist, J.N., C. R. Shaw, and M. Mandel. 1969. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. J. Bacteriol. 99 : 180-188.
3. Clare, B.C., and G.A. Zentmyer. 1966. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. Phytopathol. 56 : 1334-1335.
4. Davis, M.G., and I. Shimpkins. 1975. Electrophoretic techniques principles and techniques of

- practical biochemistry. Edited by B.L. Williams. and K. Willson, London 256p.
5. Franke, R.G., and J.A. Berry 1972. Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some Myxomycetes, order Physarales. *Mycologia* 64 : 830-840.
 6. Glynn, A.N., and J. Reid. 1969. Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Botany* 47 : 1823-1831.
 7. Harman, G.E., I. Chet, and R. Baker. 1980. *T. hamatum* effects on seeds and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *R. solani*. *Phytopathol.* 71 : 286-290.
 8. Hashiok, Y., M. Komatsu, and I. Arita. 1961. *T. viride*, as an antagonist of wood-inhibiting Hymenomycetes. 1. Ecology and physiology of *Trichoderma* occurring on the log-wood of *L. edodes* Sing. *Rept. Tottori Mycol. Ins. (Japan)* 1 : 1-18.
 9. Kahler, A.L., and R.W. Allard. 1970. Genetics of isozyme variants in barley. 1. Esterase. *Crop Sci.* 10 : 444-448.
 10. Kulik, M.M., and A.G. Brooks. 1970. Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* spp. *Mycologia* 62 : 365-376.
 11. Meyer, J.A., E.D. Garber, and S.G. Shaeffer. 1964. Genetics of phytopathogenic fungi. XII. Detection of esterase and phosphotase in culture filterates of *Fusarium oxysporum* and *F. xylarioides* by starch gel zone electrophoresis. *Botaz. Gaz.* 125(4) : 298-300.
 12. Meyer, J.A., and J.L. Renard. 1969. Protein and esterase patterns of two formae species of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* 59 : 1409-1411.
 13. Nealson, K.H. and E.D. Garber. 1967. An Electrophoretic survey of esterase, phosphotase, and leucin aminopeptidase in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycologia* 59 : 330-336.
 14. Park, W.M., and H. Stegmann. 1979. Rice protein patterns comparison by various Page-techniques in slabs. *Z. Acker. U. Pflanzenbau.* 148 : 446-454.
 15. Perbedy, J.E., and M. Turner. 1968. The esterase of *Mortierella ramanniana* in relation to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 51 : 303-312.
 16. Rifail, M.A. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. *Mycol. papers* 116. Commonwealth Mycological Inst. Kev. Surrey, England. 56p.
 17. Son, E.R., W.M. Park, and J.I. Lee. 1981. Identification of Rape(*Brassica napus* L.) varieties by electrophoretic method. The memorial papers for the sixtieth birthday of Dr. Jeong Haeng Ree. 38-42.
 18. Steward, F.C., R.F. Lyndon, and J.T. Barber. 1965. Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins: A study on pea seedlings in relation to development. *Am. J. Bot.* 52(2) : 1409-1411.
 19. Stout, D.L., and C.R. Shaw. 1973. Comparative enzyme patterns in *Thamnidium elegans* and *T. anomalum*. *Mycologia* 65 : 803-808.