

Trichoderma속의 染色體에 관한 研究

閔丙禮*·채영규·崔榮吉

祥明女子大學 生物學科*·漢陽大學校 生物學科

Chromosomal Studies on the Genus *Trichoderma*

Byung-Re Min,* Young Gyu Chai and Yong-Keel Choi

Department of Biology, Sangmyung Women's University,* Seoul 110 and

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133, Korea

Abstract: The life cycle of 17 species of *Trichoderma* was elucidated to seize the proper stage for observing the nuclear behavior and chromosome count. The most convenient stage for the purpose in their life cycle was the stage just before producing the asexual spore. Of the 17 species in the genus *Trichoderma* the haploid chromosome numbers were counted 5, 6, 7 and 10. Six chromosomes were most frequently observed. It is believed that the basic chromosome number is placed between 4 and 10, and that the number might be 6, referring to the related papers. It appears necessary to reclassify the single genus of *Trichoderma* into at least two or three genera.

Keywords: *Trichoderma*, Haploid chromosome number, Chromosome count.

*Trichoderma*속 균류는 불완전균류에 속하며(Rifai, 1969; Barnett and Hunter, 1972; Alexopoulos and Mims, 1979), Ascomycetes中에서 *Hypocrea*속에 속하는 몇 종류가 conidial states로서 *Trichoderma* states를 갖는 것으로 보고되어 있다(Webster, 1964; Dingley, 1957; Rifai, 1964; Rifai and Webster, 1966a, 1966b; Canham, 1969; Rogerson, 1970). *Trichoderma*속이 최초로 균류 문헌에 소개된 것은 1974년에 Persoon에 의한 것이며 1871년 Hartz에 의하여 *Trichoderma*속에 대한 정확한 種의 개념이 성립되었고, 이들의 분류는 Gilman(1957)에 의하여 상세히 보고되었다. 그러나 이 속에 대한 細胞學的인 혹은 細胞遺傳學的인 研究는 거의 되어있지 않다(Rifai, 1964). 균류의 염색체에 대한 연구가 매우 어려운 것은 이미 다른 논문에서 많이 지적되어 왔으며, 특히 현재까지 조사 보고된 균류의 염색체 수의 보문(Min et al., 1981)中에서 *Trichoderma*속의 염색체에 대한 보고는 아직 한편도 없다.

본 연구는 이러한 *Trichoderma*속 중에서 공시 균주 11種과 우리나라의 토양에서 분리 동정한 6種을 포함하여 17種의 균주를 분양받아 배양하면서 균사내의 영양학의 핵분열을 관찰하여 염색체수를 조사하였고 그

결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

ATCC로부터 구입한 11種으로는 *Trichoderma aur-eoviride*, *T. saturnisporum*, *T. koningii*, *T. pseudo-koningii*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. longibranchiatum*, *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. polysporium*, *T. virigatum* 등이고 우리나라 토양에서 분리 동정한 6種을 材料로 하였다.

균주의 培養은 2% malt extract agar(=MEA)를 멸균한 Petri-dish에 넣고 胞子를 接種시킨후 恒溫器에 넣어 약 25°C를 유지시켜 다량 배양하면서 계속 胞子를 취할수 있도록 하였다.

시료의 固定은 Rogers(1965a)의 方法에 따라 Farmer's 용액(anhydrous ethanol 3 : glacial acetic acid 1) 용액에 30분~12시간 고정처리 하였다. 고정된 시료는 70% ethanol로 세척하고, 이어 증류수로 2~3회 세척하였다. 그후 시료를 1 N HCl에서 8~12분 가수분해 처리한 후 60~70°C의 증류수로 수회 세척하였다.

시료의 염색은 Rogers의 方法에 따라 slide glass상에

少量의 材料를 놓고 phosphate buffer(pH 7.2)를 한 방울 떨어뜨린후 Giemsa staining solution (Merck)으로 3~4分間 염색하고 1~2회 증류수로 세척한다. 이어서 3% KOH를 적하한후 cover slip을 덮고 여분의 염색액은 여과지로 제거한후 squash하여 검경하였다.

현미경 검경은 매회 oil immersion을 이용하여 1,500배의 배율로 검경하였고 염색체를 분명히 식별 할수 있는 것만 분석하였다. 상태가 좋은것은 사진을 촬영하였다.

結果 및 考察

*Trichoderma*屬에 속하는 조사된 균류의 염색체 모양은 다른 균류에서 보고된 바와 같이(Sansome, 1964; Finley, 1970) 一般으로 점모양(dot-like)의 것이 大部分이며, 막대모양의 것이 혼재되어 있는 경우도 있었다. 染色體의 크기는 대체로 長徑이 0.2 μ에서 0.3 μ의 크기로서 매우 작은 편이며 지금까지 보고된 균류의 염색체중 가장 큰 크기를 가진것은 평균 11.5 μ에서 15.4 μ으로 보고된 *Puccinia ruelliae*가 있고 (Singh, 1979) 가장 작은 크기로는 *Xylaria curta*로서 0.1~1.6 μ으로 보고되어 있다(Rogers, 1968). 또한 균류의 염색체수는 一般으로 반수체의 수가 3개에서 28개 사이에 있으며 Olive(1965)에 의하면 8개의 염색체를 갖는 種이 가장 많다고 보고 한바 있으며, Fuller(1976)는 보통 균류의 염색체수는 15개 이하의 수를 갖는다고 보고 하였다.

본 研究에서 조사한 *Trichoderma*속의 17종에 대한 염색체수를 정리하면 Table I과 같다. *Trichoderma*속

Table I. The chromosome number of *Trichoderma* species based on the modal count ranged 71~91% frequency.

Chromosome number	Species
5	<i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. saturnisporum</i>
6	<i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. longibranchiatum</i> , <i>T. sp. No. 40</i> , <i>T. sp. No. 58</i> , <i>T. sp. No. 237</i> , <i>T. sp. No. 241</i>
7	<i>T. aureoviride</i> , <i>T. sp. No. 212</i>
10	<i>T. reesei</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. polysporium</i> , <i>T. virigatum</i> , <i>T. sp. No. 196</i>

Table II. The chromosome number and the number of species.

Chromosome number	Number of species
5	2
6	8
7	2
10	5
Total 17 species	

의 염색체수도 다른 균류에서와 마찬가지로 염색체의 수가 5개에서 10개 사이에 있었다. 그중에서 특히 반수체의 수가 6개인 종이 8종으로 가장 많고 10개인 것이 5種, n=5인 것이 2種, n=7인 것이 2종으로 밝혀졌다. 이 結果를 정리하면 Table II와 같다.

좀더 정확한 *Trichoderma*속의 기본염색체수를 알아보기 위하여, 자낭균류의 *Hypocrea*속과 비교 검토하였다. *Hypocrea*속은 그들의 imperfect stages를 갖는 속으로서 현재까지 알려진 염색체의 수는 3種으로서 (Table III) 4~7개의 염색체를 갖고 있었다.

균류의 염색체 구조와 수를 연구하는 데는 많은 난점이 있으나(Heath, 1978) 그럼에도 불구하고 여러 종에서 유사분열 및 감수분열을 관찰 보고되었다(Saksena, 1961; Rogers, 1964; 1965a; 1965b; Wilson and Pattick, 1968; Fuller, 1976). 그러나 *Trichoderma*속은 감수 분열을 하지 않기 때문에 균사내의 영양핵의 핵분열을 관찰할 수 있었다.

균류의 경우는 異數體와 倍數體가 많이 存在함이 보고되어 있으며, 그 기작으로는 細胞分裂 後期에 염색체의 不分離(non-disjunction)의 結果이거나, 혹은 영양균사의 핵에서 同時에 일어나는 核分裂동안에 방추사가 融合하여 異數體나 倍數體가 형성되는 것으로 說明되고 있다(Wilson, 1952; Day, 1956; Knox-Davies and Dickson, 1960; Rogers, 1968d).

또한 菌類의 細胞學的 研究에서 倍數體가 分類學的

Table III. Current information on the chromosome of the genus *Hypocrea*

Species	Chromosome number(n)	References
<i>Hypocrea citrina</i>	5	Canham 1969
<i>H. spinulosa</i>	7	Mathieson 1952
<i>H. schweinitzii</i>	4	Hanlin 1965

分化過程으로 볼 수 있음이 이미 보고되어 있으며 (Emerson and Wilson, 1954; McGinnis, 1956) 倍數體가 重要な 進化의 機作이 되고 있다고 발표된 보문 (Lu, 1964; Singh, 1972)도 있다.

이상과 같은 여러가지들을 비교 고찰하여 볼 때 *Trichoderma*속의 基本 染色體 수는 4~10개 사이에 있을 것으로 사료되었으며, 가장 많은 수의 種에서 볼 수 있었던 $n=6$ 개를 *Trichoderma*속의 기본 염색체수로 추론하였다. 그러나 *Trichoderma*속은 monotypic species가 아니고 형태적으로 밀접하게 관련된 다수의 종으로 구성되어 있으며 (Rifai, 1969), 더우기 *Trichoderma*속에 대한 細胞學的인 혹은 細胞遺傳學的인 研究가 거의 이루어지지 않고 있어 (Rifai, 1969) *Trichoderma* 속의 기본 염색체 수와 진화학적인 유연관계는 좀더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

摘 要

ATCC로부터 구입한 11種과 우리나라의 토양에서 분리 동정한 6種의 *Trichoderma*를 實驗 材料로 하였다. 2% malt extract agar 培地에서 培養하면서 菌사의 영양핵에서의 핵분열을 관찰하였다. 染色은 Giemsa staining solution으로 染色하였고 그들의 染色體 數를 세었다. 염색체의 形態는 다른 菌류와 마찬가지로 點 모양(dot-like)의 것이 大部分이었다. 染色體의 크기는 매우 작아서 0.2~0.3 μ 정도이다. 染色體의 수는 5~10 개로서 $n=5$ 인 種이 2種(*Trichoderma pseudokoningii*, *T. saturnisporum*)이고, $n=6$ 인 種은 8種(*T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. longibranchiatum*, *T. sp. No. 40*, *T. sp. No. 58*, *T. sp. No. 237*, *T. sp. No. 241*)으로 가장 많았다. $n=7$ 인 種은 2種(*T. aureoviride*, *T. sp. No. 212*)이고 $n=10$ 인 種은 5種(*T. reesei*, *T. harzianum*, *T. polysporium*, *T. virigatum*, *T. sp. No. 196*)으로 관찰되었다. 이상의 17種을 비교 검토하여 보면 *Trichoderma*속의 基本 染色體 數는 4~10개 사이에 있을 것으로 생각되며 그 중에서 가장 많은 數를 나타낸 $n=6$ 을 基本 染色體數로 추론하였다.

文 獻

Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. (1979): *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons, New York.
 Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972): *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing

Co., Minneapolis, pp. 241.
 Canham, S.J. (1969): Taxonomy and morphology of *Hypocrea citrina*. *Mycologia* 61:315-331.
 Cutter, V.M. (1942): Nuclear behavior in the *Mucorales* II. The Rhizopus, phycomyces and sporodinia patterns. *Bull. Torrey. Bot. Club.* 69:592-616.
 Day, P.R., Boone, D.M. and Keitt, G.W. (1956): *Venturia inaquilias(cke)* Wint. XI. The chromosome number. *Am. J. Bot.* 43:835-838.
 Dingley, J.M. (1957): Life history studies in the genus *Hypocrea* Fr. *Trans. Roy. Soc. New Zealand* 84:689-693.
 Emerson, R. and Wilson, C.M. (1954): Interspecific hybrid and the cytogenetic and cytotaxonomy of *Zuallomyces*. *Mycologia* 46:393-494.
 Flanagan, D.W. (1969b): Nuclear division in the vegetative hyphae of *Rhizopus nigricans* and *Phycomyces blakesleenus*. *Can. J. Bot.* 47:2055-2059.
 Fuller, M.S. (1976): Mitosis in fungi. *Int. Rev. Cyto.* 45:113-153.
 Finley, D.E. (1970): Somatic mitosis in *Ceratobasidium flavescens* and *Pellicularia koleroga*. *Mycol.* 62:474-485.
 Gilman, J.C. (1957): *A Manual of Soil Fungi*, 2nd edition, Ames, Iowa.
 Hanlin, R.T. (1965): Morphology of *Hypocrea schweinitzii*. *Am. J. Bot.* 52:570-579.
 Haskins, E.F. (1976): High voltage electron microscopical analysis of chromosomal number in the slime mold *Echinostelium minutum* de Bary. *Chromosoma* (Berl.) 56:95-100.
 Harris, S.E., Braselton, J.P. and Miller, C.E. (1980): Chromosomal number of *Sorosphaera veronicae* (Plasmediophoromycetes) based on ultrastructural analysis of syneptonemal complexes. *Mycol.* 72:916-925.
 Heath, I.B. (1978): Mitosis in the fungi in "Nuclear Division in the Fungi." Academic Press, New York.
 Knox-Davies, P.S. and Dickson, J.G. (1960): Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometasphaeria turcica*. *Am. J. Bot.* 47:329-339.
 Lee, Y.N. and Yoon, K.H. (1973): Studies on the amylase of *Rhizopus* (I). *Kor. J. Microbiol.* 11:

- 31-50.
- Lu, B.C. (1964): Polyploidy in the basidiomycetes, *Cyathus stercoreus*. *Am. J. Bot.* 51:343-347.
- Mathieson, M.J. (1952): Ascospore dimorphism and mating type in *Chromocrea spinulosa* (Fuckel). Petch n. comb. *Ann. Bot.* 16:449-466.
- McGinnis, R.C. (1953): Cytological studies of chromosomes of rust fungi. I. The mitotic chromosomes of *Puccinia graminis*. *Can. J. Bot.* 31:522-526.
- McGinnis, R.C. (1956): Cytological studies of chromosomes of rust fungi. III. The relationships of chromosome number to sexuality in *Puccinia*. *J. Heredity*. 47:255-259.
- Min, B.R. and Choi, Y.K. (1981): The chromosome number of fungi(I). *Kor. Jour. Microbiol.* 19:78-101.
- Min, B.R. and Choi, Y.K. (1981): (unpublished) Thin layer-slide culture of fungi.
- Min, B.R., Lee, T.J. and Choi, Y.K. (1982): Chromosomal studies on the genus of Rhizopus. I. Chromosomal studies on 7 species of the genus Rhizopus. *Kor. J. Microbiol.* 20:134-146.
- Olive, L.S. (1953): The structure and behavior of fungus nuclei. *The Botan. Rev.* 439-578.
- Olive, L.S. (1965): Nuclear behavior during mitosis, In "The Fungi I," Academic Press, 143-161.
- Rifai, M.A. (1969): A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Paper* No. 116, Commonwealth Mycol. Inst., Kew, England. 56p.
- Rifai, M.A. (1964): A reinvestigation of the taxonomy of the genus *Trichoderma*. Pers. Unpublished M. Sc. Thesis, University of Sheffield.
- Rifai, M.A. and Webster, J. (1966a): Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. II. *H. aureoviridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49:289-296.
- Rifai, M.A. and Webster, J. (1966b): Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. III. *H. lactea* (= *H. citrina*) and *H. pulvinata*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 49:297-310.
- Rogerson, C.T. (1970): The hypocrealean fungi (Ascomycetes, Hypocreales). *Mycologia* 62:865-910.
- Rogers, J.D. (1965b): *Hypoxylon fuscum*: Cytology of the Aseus. *Mycol.* 57:789-803.
- Roger, J.D. (1964): *Hypoxylon prunatum*: The chromosome number. *Mycol.* 56:369-373.
- Roger, J.D. (1968a): *Hypoxylon deustem*: The Chromosome number. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:249-255.
- Roger, J.D. (1965a): The conidial stage of *Conichaeta ligniaria*: Morphology and cytology. *Mycol.* 57:368-378.
- Roger, J.D. (1968d): *Xylaria curta*: Cytology of the ascus. *Can. J. Bot.* 46:1337-1340.
- Saksena, H.K. (1961): Nuclear phenomena in the basidium of *Ceratobasidium praticolum* (Kotila) Olive. *Can. J. Bot.* 39:717-725.
- Singh, U.P. (1979): Cytology of *Puccinia ruelliae*. *Mycol.* 71:1197-1205.
- Singh, U.P. (1972): Morphology of chromosome in *Ravenellia* sp. *Mycol.* 64:205-207.
- Storey, F.H. and Mann, J.D. (1967): Chromosome contraction by O-isopropyl-N-phenylcarbamate(IPC). *Stain. Tech.* 42:15.
- Webster, J. (1964): Culture studies in *Hypocrea* and *Trichoderma*. I. Comparison of perfect and imperfect stage of *H. gelatinosa*, *H. rufa*, and *Hypocrea* sp. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47:75-96.
- Wilson, C.M. and Patrick, W.F. (1968): The life cycle and cytology of *Brachyallomyces*. *Can. J. Bot.* 46:1361-1367.
- Wilson, C.M. (1952): Meiosis in *Allomyces*. *Bull. Torrey. Bot. Club.* 79:139-160.

<Received May 5, 1985; Accepted June 5, 1985>

Plate 1. Chromosomes of *Trichoderma*

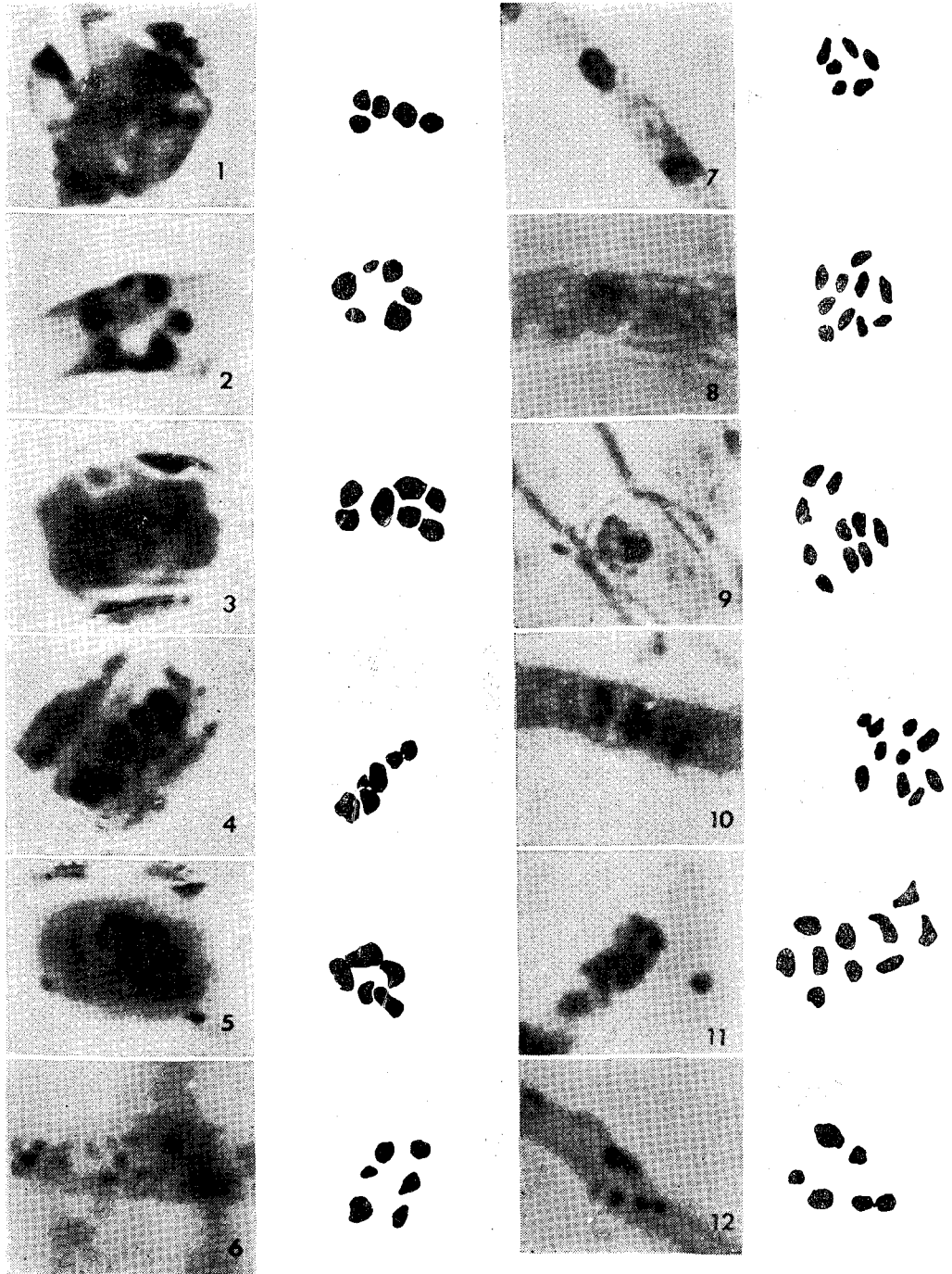
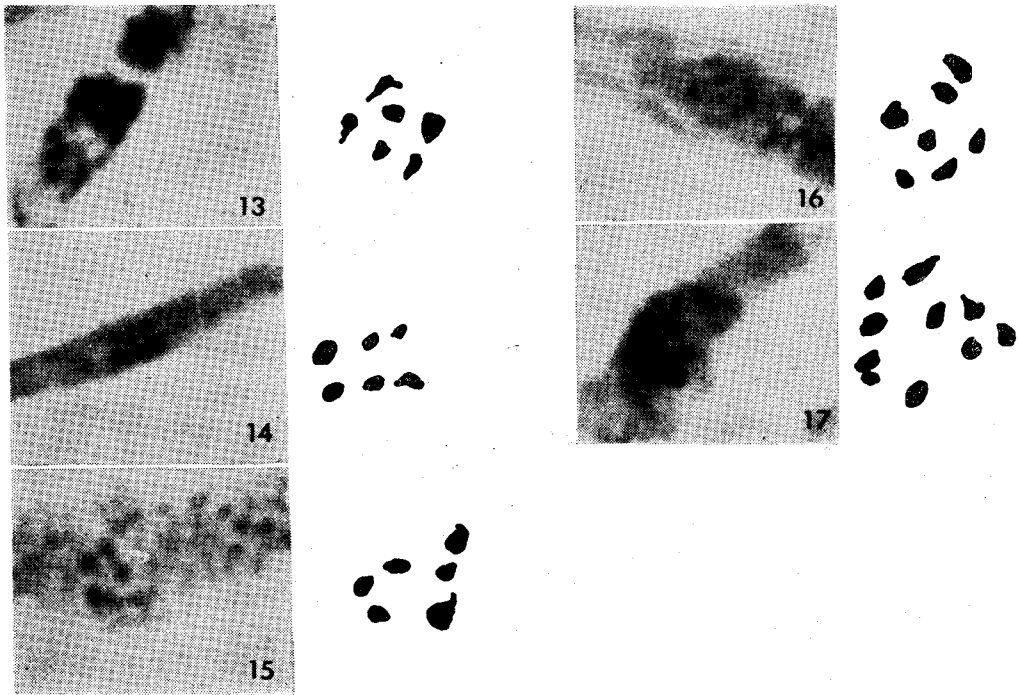


Plate 2. Chromosomes of *Trichoderma*



List of Species

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| 1. <i>Trichoderma pseudokoningii</i> | 10. <i>T. polysporium</i> |
| 2. <i>T. viride</i> | 11. <i>T. virigatum</i> |
| 3. <i>T. aureoviride</i> | 12. <i>T. sp. No. 40</i> |
| 4. <i>T. koningii</i> | 13. <i>T. sp. No. 58</i> |
| 5. <i>T. saturnisporum</i> | 14. <i>T. sp. No. 237</i> |
| 6. <i>T. hamatum</i> | 15. <i>T. sp. No. 241</i> |
| 7. <i>T. longibranchiatum</i> | 16. <i>T. sp. No. 212</i> |
| 8. <i>T. reesei</i> | 17. <i>T. sp. No. 196</i> |
| 9. <i>T. harzianum</i> | |