

## *Aspergillus nidulans*에서 NSD 돌연변이주의 분리 및 분석

한동민\* · 한유정 · 김지현 · 장광엽<sup>1</sup> · 정윤신<sup>1</sup> · 정재훈<sup>2</sup> · 채건상<sup>3</sup>

원광대학교 분자생물학과

<sup>1</sup>전북대학교 생물학과

<sup>2</sup>한국과학기술원 생명과학과

<sup>3</sup>전북대학교 분자생물학과

## Isolation and Characterization of NSD mutants in *Aspergillus nidulans*

Dong Min Han\*, Yoo Jeong Han, Jee Hyun Kim, Kwang Yeop Jahng<sup>1</sup>,  
Yoon Shin Chung<sup>1</sup>, Jae Hoon Chung<sup>2</sup> and Keon Sang Chae<sup>3</sup>

Department of Molecular Biology, Wonkwang University, Chonbuk 570-749

<sup>1</sup>Department of Biology, Chonbuk University, Chonbuk 560-756

<sup>2</sup>Department of Life Science, KAIST, Taejon 305-701

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology, Chonbuk University, Chonbuk, 560-756

**ABSTRACT:** Several mutants which never underwent to sexual development(NSD) of *Aspergillus nidulans* were analyzed genetically and physiologically. They were divided into two groups according to their characteristics of asexual development after release from aeration block. The mutants in first group proceeded asexual development immediately after removal of aeration block, while those in second group did 10 hours or more later. The NSD mutants were separated into 4 complementation groups, *nsdA*, *nsdB*, *nsdC* and *nsdD*. The *nsdA* and *nsdD* genes were linked to *AcrA1* on linkage group II and *pabaA1* on linkage group I, respectively. The mutant alleles were all recessive to wild type allele in heterokaryon state. The mutants did not develop cleistothecia on any of carbon sources, except NSD208 which developed cleistothecia on lactose.

**KEYWORDS:** *Aspergillus nidulans*, sexual development, mutants(NSD)

### 서 론

자웅동체 자낭균(homothallic ascomycete)인 *Aspergillus nidulans*는 체세포 분열을 통하여 무성포자를 생성하는 무성생식과정과 감수분열에 의해 자낭포자를 생성하는 유성생식과정등의 생활사를 가지며, 각각의 포자를 형성하는 과정에서는 독특한 형태발생이 이루어진다(Smith *et al.*, 1977; Zonneveld, 1977). 이 가운데 무성포자인 분생포자(conidia)가 발생하는 과정에 관하여는 많은 연구가 진행되어 왔으며, 최근에는 이 과정에 관여하는 유전

\*Corresponding author

자들이 다수 분리되어, 각 유전자들의 기능과 이들 유전자 사이의 단계적 조절에 대한 결과들이 축적되고 있다(Timberlake, 1990).

영양번식 균사가 conidiophore로 분화하기 위해서는 일정한 성장시간(competent time)이 요구되는 것으로 알려졌으며(Axelrod *et al.*, 1973). 또한 competent time 근처에서의 nitrate reductase와 같은 유도성 효소의 양이나 포도당 소모율이 급격히 변화하는 것이 보고된 바 있다(Gealt and Axelrod, 1974). Competence는 유전적으로 조절되어지므로, 세포내에 분화에 관한 자체 설계된 내부 시간조절 시스템(self-programmed internal clock system)이

있을 것으로 예상된다. Competence을 획득한 후 분화하도록 유도되어진 균사는 foot cell, conidiophore, vesicle 및 phialides로의 일련의 분화과정을 거쳐, 최종적으로 분생포자를 생성한다. Clutterbuck (1969)은 무성분화에 이상이 있는 돌연변이를 대량 분리하여 분석함으로써, 이 과정에 관여하는 유전자를 다수 동정하였다. 이들 중에서 *brlA*, *abaA*, *wetA*, *γA*, *wA* 등의 유전자가 분리되어 이들 유전자의 구조 및 상호 조절기작에 대한 연구가 진행되었다(Timberlake, 1980: Law and Timberlake, 1980: Johnstone *et al.*, 1985: Boylan *et al.*, 1987: Timberlake, and Marshall, 1987: Adams *et al.*, 1988: O'Hara *et al.*, 1989: Mirabito *et al.*, 1989).

유성분화과정에 관련된 연구는 무성분화과정의 그것과 비교할 때 상대적으로 매우 미약하다. 유성생식과정에서는 두종류의 세포가 영양변식 균사에서 각기 다른 방향으로 분화해 나가는데, 그 하나는 Hülle cell로, 또 다른 하나는 primodia로 분화해 나가고 이 primodia는 최종적으로는 cleistothecia로 분화한다(Zonneveld, 1977). 자낭과 자낭포자는 cleistothecia 속에서 생성되므로 cleistothecia의 형성 단계가 유성분화의 가장 중요한 단계로 간주될 수 있다. Cleistothecia 이전에 형성되어 최종적으로는 숙성된 cleistothecia 주위를 에워 싸는 Hülle cell의 역할에 대해서는 별로 밝혀진 바 없다. 유성분화과정에 특이하게 관여하는 유전자에 관하여서 특별히 밝혀진 바 없으며 단지 몇몇의 무성포자 결손 돌연변이체가 cleistothecia도 형성하지 못하는 것이 보고되었고(Kurtz and Champe, 1981), 최근에  $\alpha$ -tubuline을 암호화하는 유전자 중 하나인 *tubB* 유전자가 자낭포자의 형성에 중요하게 작용한다는 결과(Kirk and Morris, 1991)가 알려졌을 뿐이다. 이렇게 유성분화과정에 특이하게 관여하는 유전자에 대한 연구가 미진한 까닭은 유성생식기관이 형성되기 이전에 무성포자가 무성하게 생성되어 나중에 형성되는 유성생식 기관을 덮어버리므로 유성생식 돌연변이체의 대량분리가 난이하기 때문이다. Han *et al.*(1990)은 무성포자의 발생은 거의 억제하면서 유성분화에는 전혀 영향을 미치지 않는 조건을 설정하여 이 조건하에서의 유성분화의 각 단계에 이상이 생긴 돌연변이체를 대량으로 분리할 수 있게

되었다. 유성분화에 이상이 생긴 돌연변이를 크게 3군, 즉, 유성분화가 전혀 일어나지 않는 NSD(never in sexual development), 유성분화과정의 일정단계에서 중단된 BSD(block in sexual development) 그리고, 유성분화가 최종까지 진행되지만 그 양이나 생성 시기가 야생형과 다른 ASD(abnormal in sexual development)로 분류하였던 바(Han *et al.*, 1990), 본 연구에서는 NSD에 속하는 돌연변이의 특성에 대해 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*Aspergillus nidulans*의 야생형 균주인 FGSC4 (*velA*<sup>+</sup>)와 FGSC168을 교배하여 *biA1*, *sB3*, *velA*<sup>x</sup>의 유전자형을 갖는 recombinant, VE4를 분리하여 NSD돌연변이의 분리를 위해 사용하였으며, NSD 돌연변이의 유전자 분석을 위하여 FGSC163, R3, FGSC237 등의 검색균주를 이용하였다. 분리된 NSD돌연변이주와 검색균주 사이의 교배로부터 다양한 recombinants를 분리하여 유전적 분석에 사용하였다. 이들의 유전자형은 Table 1에 나타내었다.

### 배지 및 배양

세포의 배양은 완전 배지(CM)에서 37°C로 3일간 배양하였고 유전학적 분석을 위해서는 필요한 영양요구물이 첨가된 최소 배지(MM)를 사용하였다(Harsani *et al.*, 1976). 균총의 크기를 제한하기 위해서 배지에 sodium deoxycholate를 최종농도 500 mg/l 되게 첨가하였다(Upshall *et al.*, 1977). 유성분화의 양상은 최소배지에 casein hydrolysate가 첨가된 배지에서 밀봉배양(Han *et al.*, 1990)을 하여 유성분화쪽으로 유도한 뒤 조사하였다.

### 돌연변이 유발

균주를 3일간 배양한 후 0.08% Tween80으로 무성포자를 G-3 glass filter로 여과하여 완전배지에서 2시간 동안 발아시켰다. 발아된 포자를 0.05 M sodium citrate 완충용액(pH 6.0)으로 세척하고 동일 완충용액에서 재현탁한 후 10<sup>7</sup> cells/ml로 희석하였다. 9 cm 배양접시에 평균 깊이가 2 mm 이하가 되

**Table 1.** List of strains used.

Strain	Phenotype	Genotype	Remarks
FGSC4		<i>velA</i> <sup>+</sup>	FGSC <sup>a</sup> wild type
FGSC168		<i>suA1adE20 adE20 biA1; sB3; choA1; chaA1 velA1</i>	FGSC test strain
FGSC163		<i>suA1adE20 yA2 adE20; AcrA1; pheA2; pyroA4; lysB5; sB3; nicB8; coA1 velA1</i>	FGSC test strain
FGSC237		<i>yA2 pabaA1; trpC802 velA1</i>	FGSC test strain
FGSC154		<i>adE20 biA1; wA3 cnxE16; sC12; methG1; nicA2; lacA1; choA1; chaA1 velA1</i>	FGSC test strain
R3		<i>adE20 biA1 riboA2; wA3 cnxE16; sC12; methG1; nicA2; lacA1; choA1; chaA1 velA1</i>	from Han(1986)
VE4		<i>biA1; sB3; chaA1 velA</i> <sup>+</sup>	FGSC4×FGSC168
N204-1	NSD	<i>pabaA1; nsdA4; chaA1 velA1</i>	FGSC237×N204
N219-4	NSD	<i>biA1 pabaA1 nsdD19; trpC802</i>	FGSC237×N219

a: FGSC; Fungal Genetic Stock Center

도록 7 ml의 현탁액을 취하고 실온에서 자석교반기로 돌리면서 자외선을 조사하였다. 사용한 자외선등(Ultraviolet product inc.)의 조사율은 16 erg/mm<sup>2</sup>/sec였다. 자외선을 조사한 세포를 적당히 희석한 후 0.1% casein acid hydrolysate(Sigma)을 첨가한 최소배지에 접종하였다. 이것을 paraffin film으로 밀봉하여 37°C에서 24시간 배양한 후 밀봉을 제거하였다. 밀봉을 제거하고 2일간 더 배양한 후 비정상적인 유성분화 양상을 보이는 colony를 이주시계를 이용하여 분리해 냈다. 처음 분리해 낸 colony로부터 돌연변이 clone을 재분리해 낸 후 표준 조건하에서 표현형을 확정하였다(Han *et al.*, 1990).

#### 유전학적 분석

이핵체와 이배체의 제조 및 연관군 결정은 Käfer (1968)의 방법에 따라 시행하였다.

#### 결과 및 고찰

VEL4 균주로부터 Han(1986)의 방법에 따라 자외선을 돌연변이원으로 하여 표준조건 하에서 전혀 유성분화를 하지 못하는 돌연변이주(NSD) 20여종을 분리하였다. NSD 돌연변이주들은 cleistothecia 뿐만 아니라 Hülle cell도 전혀 생성하지 못하였으며, 야생형에 비해 많은 양의 무성포자를 형성하였다. 이

돌연변이주들은 한천배지에서 24시간 동안 밀봉배양한 다음 밀봉을 해제하면 야생형과는 달리 무성분화가 진행되는데(Han *et al.*, 1990), 무성분화가 발생하는 양상에 따라 크게 두 군으로 나뉘어졌다. 첫째 군은 N204를 비롯한 대부분의 NSD 돌연변이들이 포함되는 것으로 밀봉해제 후 즉시 무성분화를 시작하였다(Fig. 1). 둘째 군은 N217과 N219 두종의 돌연변이로서, 밀봉해제 후 10시간 이상 지난 후에야 무성분화를 시작하였다. 각 군의 형태학적 특징을 보면, 첫째 군은 *velA1* 돌연변이처럼 웃자라는 aerial hyphae가 없어 conidial heads의 높이가 일정하고 발생하는 conidia의 양도 많았다. 그러나 둘째 군은 *velA*<sup>+</sup> 야생형처럼 aerial hyphae가 일정치 않게 웃자라며 conidia 양도 훨씬 적게 생성되었다. 야생형을 분화가 유도될 수 있는 시기(competent time)에 밀봉배양하면, 유, 무성 어느 쪽으로도 분화가 진행되지 않는다. 그러나, 8시간 이상 배양한 후 밀봉을 해제하면 유성분화만이 진행된다. 이것은 분화가 유도되는 시기에 aeration이 차단되면, 분화는 진행되지 않지만 유성분화 쪽으로 비가역적인 결정이 내려지기 때문인 것으로 보인다(Han *et al.*, 1990). NSD 돌연변이들은 유성분화로의 비가역적 결정이 내려지는 과정에 관여하는 유전자에 결손이 생긴 것으로 볼 수 있다. 첫째 군에 속하는 NSD 돌연변이들은 둘째 군에 속하는 것들보다 밀

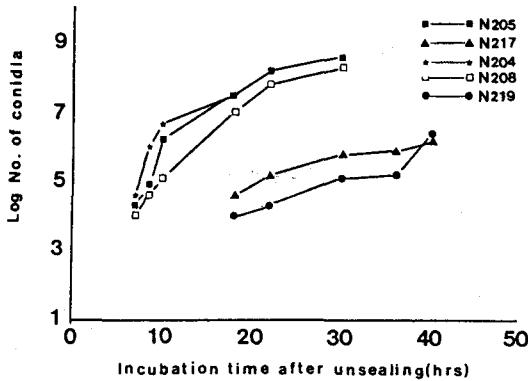


Fig. 1. Time of asexual development of various *nsd* mutants after unsealing. The mutants were cultured at the condition of restricted aeration by sealing the plate with the parafilm. After 24 hours the seals were removed. At appropriate time interval culture blocks were removed, suspended in Tween80 and the number of conidia was scored with Hemacytometer.

봉해제 후 무성분화가 발생하는 속도가 빠른 것으로 보아, 앞 단계에서 작용하는 것으로 생각할 수 있다.

NSD 돌연변이들을 야생형 검색균주(FGSC154 또는 FGSC163)와 교배하여 meiotic segregants를 조사하여 본 결과 N202, N204, N205, N208, N214, N215, N216 및 N219 등 8종의 돌연변이는 NSD segregants가 전체 segregants의 절반으로 나오므로써, 이들 돌연변이들은 한 종류의 유전자에서 돌연변이가 발생한 것으로 판명되었다(자료 미제시).

첫째 군에 속하는 NSD 돌연변이 중 8종을 서로 교배하여 異核體를 만든 다음 cleistothecia가 형성되는지 유무를 조사하여 complementation group을 정하였다(Table 2). 그 결과 첫째 군은 N204 group, N205 group 및 N208 group의 3개의 complementation group으로 나뉘었으며, 대부분의 첫째 군에 해당하는 NSD 돌연변이주들은 N204 group에 속하였다. 한편 둘째 군에 속하는 NSD19는 첫째 군의 모든 돌연변이주들과 complementation이 되었다(Table 2).

N204 group 중 N202, N204 및 N206의 돌연변이 유전자들을 mitotic segregation 방법(Kafer, 1968)을 이용하여 연관군을 조사하여 본 결과 모두 II번 염색체의 *AcrA1*에 연관되었음을 알 수 있었다(Table 3). 이들 유전자를 각각 Clutterbuck(1974)의 명명법에 따라 *nsdA2*, *nsdA4* 및 *nsdA6*로 명명하였다. N219의 유전자는 I번 염색체의 *paba1*에 연관되어 있었으며 *nsdD19*로 명명하였다. N205와 N208의 돌연변이 유전자들은 각각 *nsdB5*, *nsdC8*로 명명하였다.

각 돌연변이 유전자의 우열을 조사하기 위해 검색균주와 교배한 뒤 이핵체상태에서 heterozygous cleistothecia가 형성되는지 알아 보았다. 대부분의 NSD 돌연변이들과 검색균주 사이에 합성된 이핵체는 heterozygous cleistothecia를 형성하였으며(Table 1), 이 결과는 각 *nsd* 유전자들이 야생형 유전자에 대해 이핵체 상태에서 열성임을 나타낸다. NSD 돌연변이주들이 상호간 또는 야생형과 교배가

Table 2. Complementation grouping of various *nsd* mutants

NSD mutants	N202	N204	N205	N208	N214	N215	N216	N219
N202	-	-	+	+	-	-	-	+
N204		-	+	+	-	-	-	+
N205			-	+	+	+	+	+
N208				-	+	+	+	+
N214					-	-	-	+
N215						-	-	+
N216							-	+
N219								-

+; Cleistothecia were developed in heterokaryon

-; Cleistothecia were not developed in heterokaryon

**Table 3.** Mitotic segregation of *nsd* mutant genes.

Linkage group	N204-1×FGSC163		N219-4×R3	
	Genotype	No. of <i>nsdA</i> segregants	Genotype	No. of <i>nsdD</i> segregants
I	+	19	+	0
	<i>pabaA1</i>	12	<i>pabaA1</i>	26
			+	26
II			<i>riboA1</i>	0
	+	31	+	13
III	<i>AcrA1</i>	0	<i>wA3</i>	13
	+	21	+	16
IV	<i>pheA2</i>	10	<i>sC12</i>	10
	+	12	+	17
V	<i>pyroA4</i>	19	<i>methG1</i>	9
	+	23	+	5
VI	<i>lysB5</i>	8	<i>nicA2</i>	21
			+	14
VII			<i>lacA1</i>	12
	+	13	+	20
VIII	<i>nicB8</i>	18	<i>choA1</i>	6
	<i>chaA1</i>	15	+	12
	+	16	<i>chaA1</i>	14

가능하고 정상적인 유성분화를 진행시키는 점으로 미루어 보아, 이들 돌연변이들은 plasmogamy나 그 이후의 과정에 이상이 없음을 시사한다.

*Aspergillus nidulans*는 탄소원의 종류에 따라 분화가 일어나는 양상이 매우 다양하다(Table 4). Glucose는 가장 좋은 탄소원으로서 유성분화와 무성분화가 균형을 이루어 진행되며, fructose와 sucrose는 glucose와 거의 같은 성장과 분화 양상을 보인다(McCullough *et al.*, 1977). Lactose, glycerol, galactose, ethanol 및 acetate 등은 glucose 등보다 덜 좋은 탄소원으로서(McCullough *et al.*, 1977) 이들 각각을 단일 탄소원으로 하여 배양하였을 때, 성장이 glucose인 경우보다 늦지만 거의 유사한 성장속도를 보인다(Han *et al.*, in preparation). 그러나 분화양상은 탄소원 종류에 따라 상당히 달랐다(Table 4).

Acetate를 단일 탄소원으로 배양하였을 때 유성분화는 전혀 일어나지 않고 무성분화만 일어났다. 반면에, lactose, galactose 그리고 glycerol 배지에서는 무성분화가 거의 완전하게 억제되고, 대신 유성분화가 주로 일어났다. Ethanol 배지에서는 분화가 대체적으로 억제되고 aerial hyphae가 길게 웃자랐다. 이렇게 탄소원의 종류에 따라 분화의 양상이 달라지는 기작에 대해서는 정확히 알 수 없으나, energy 대사과정의 대사방식 또는 세포내의 energy 수준과 관련이 있을 것으로 생각된다. NSD 돌연변이들에서는 대부분 탄소원의 종류에 관계없이 무성분화만이 진행되었으며 그 양도 야생형에 비해 훨씬 많았다(Table 4). 다만 N208은 lactose가 단일 탄소원으로 공급되었을 때 야생형에 비해 늦고 또 작지만 cleistothecia가 발생하였다. Lactose는 *velA* 돌연변

**Table 4.** Effect of carbon sources on the developmental patterns of NSD mutants.

C source	conc.(%)	FGSC4( <i>vel</i> <sup>+</sup> )		N204		N205		N208		N219	
		AS <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S
Glucose	0.5	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
	1	++	++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
	2	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
	3	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
	6	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
	12	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
Glycerol	2	-	++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
Lactose	1	-	++	++	-	+++	-	+++	++	+++	-
galactose	1	-	+++	++	-	+++	-	+++	-	+++	-
Acetate	2	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-

a: Number of conidia : -; less than  $5 \times 10^4$ , +;  $5 \times 10^4$ - $10^6$ , ++;  $10^6$ - $10^7$ , +++;  $>10^7$  per  $0.25\pi\text{mm}^2$  of plate culture

b: Number of cleistothecia : -; less than 1, +; 2-10, ++; 10-100, +++;  $>101$  per  $0.25\pi\text{mm}^2$  of plate culture

이의 유성분화도 정상적으로 발생시키는 특징을 가지고 있는데, 그 기작을 아직 알 수는 없지만 lactose가 그 자체 또는 대사과정에서 생기는 유도체에 의해 *vel*<sup>+</sup> 유전자가 관여하는 경로와는 다른 경로로 유성분화를 유도할 것으로 추측된다(Han *et al*, in preparation). 따라서 *nsdC8*은 *vel*<sup>+</sup> 유전자와 같은 경로에서 유성분화를 조절하는 유전자일 것으로 추정되고, 나머지 *nsd* 유전자들은 유성분화를 유도하는 모든 조건과 관계없는 단계, 즉, 보다 뒷 단계에서 작용하는 유전자들이며, 특히 이들 중에서도 *nsdA*, *nsdB*들은 *nsdD* 보다 앞단계에서 작용할 것으로 사료된다.

## 謝 辭

이 논문은 1991년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

## 參考文獻

- Adams, T. H., Boylan, M. T. and Timberlake, W. E. 1988. *briA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362.
- Axelrod, D. E., Gealt M. and Pastushok, M. 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **34**: 9-15.
- Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., Zimmermann C. R. and Timberlake, W. E. 1987. Isolation and characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3113-3118.
- Clutterbuck, A. J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Clutterbuck, A. J. 1974. Genetic map of *Aspergillus nidulans*. In: Handbook of Genetics. vol. I., R. C. King ed., Plenum Publishing Co., New York, pp 447-510.
- Gealt, M. A. and Axelrod, D. E. 1974. Coordinate regulation of enzyme inducibility and developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **41**: 224-232.
- Han, D. M. 1986. UV repair and mutagenesis in *Aspergillus nidulans*. Ph. D. Thesis, Seoul Natl. Univ.
- Han, D. M., Han, Y. J., Lee, Y. H., Jahng, K. Y., Jahng S. H. and Chae, K. S. 1990. Inhibitory conditions of asexual development and their application for the screening of mutants defective in sexual development. *Kor. J. Mycol.* **18**: 225-232.
- Harsani, I., Granek I. A. and Mackenzie, D. W. 1976. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. ni-*

- dulans*. *Mutation res.* **48**: 51-74.
- Johnstone, I. L. J., Hughes S. G. and Clutterbuck, A. J. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* **4**: 1307-1311.
- Käfer, E. 1968. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **9**: 105-145.
- Kirk, K. E. and Morris, N. R. 1991. The *tubB*  $\beta$ -tubuline gene is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genes and devel.* **5**: 2014-2023.
- Kurtz, M. B. and Champe, S. P. 1981. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. *J. Bacteriol.* **148**: 629-638.
- Law, D. J. and Timberlake, W. E. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**: 509-517.
- Mirabito, P. M., Adams T. H. and Timberlake, W. E. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* Development. *Cell* **57**: 859-868.
- O'Hara, E. B. and Timberlake, W. E. 1989. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus. *Genetics* **121**: 249-254.
- Smith, J. E., Andeson, J. G., Deans S. G. and Davis, B. 1977. Asexual development in *Aspergillus*. In: *Genetics and Physiology in Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp 23-58. Academic Press, New York.
- Timberlake, W. E. 1990. Molecular genetics of *Aspergillus* development *Annu. Rev. Genet.* **24**: 5-36.
- Timberlake, W. E. and Marshall, M. A. 1988. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **4**: 162-169.
- Upshall, A., Gidding B. and Mortimore, I. D. 1977. The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 413-418.
- Zonneveld, B. J. M. 1977. Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*. In: *Genetics and physiology of Aspergillus*, edited by J. E. Smith and J. A. Pateman. pp 59-80. Academic press.