

## *Aspergillus nidulans*에 있어서 無成分化의 抑制條件과 이를 利用한 有性分化缺損 突然變異株의 大量分離

한동민 · 한유정 · 이영훈\* · 장광엽\*\* · 장승환\*\* · 채건상\*\*\*

원광대학교 자연대 분자생물학과, 한국과학기술원 화학과\*,  
전북대 자연대 생물학과\*\*, 전북대 자연대 분자생물학과\*\*\*

### Inhibitory Conditions of Asexual Development and their Application for the Screening of Mutants Defective in Sexual Development

Dong Min Han, Yoo Jeoung Han, Young hoon Lee\*, Kwang Yeop Jahng\*\*  
Seung Hwan Jahng\*\* and Keon Sang Chae\*\*\*

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

\*Department of Chemistry, KAIST, Taejeon 305-701,

\*\*Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, and

\*\*\*Department of Molecular Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

**ABSTRACT:** In order to find an useful condition under which the mutants defective in sexual development could be isolated, the effects of several cultural conditions on the developments of *Aspergillus nidulans* were examined. Among several conditions found to restrict the asexual sporulation but enhance the sexual process, the interference of aeration by sealing the plates with sealing film was the most useful one for the purpose of mutant isolation. Sealing at any time before 20 hours from inoculation prevented both sexual and asexual process. When the seal was removed after 24 hours, however, the mycelia developed only to sexual organs. Using this property, the early morphogenic process of sexual development could be easily observed and a number of mutants that showed some defects in the process could be isolated. The mutants were divided into 3 groups, NSD (never in sexual development), BSD (block in sexual development) and ASD (abnormal in sexual development). NSD mutants never produced either the Hülle cells or cleistothecia and some produced the asexual organs even when the aeration was restricted. BSD mutants were blocked in the process of Hülle cell, cleistothecia, crozier, ascii or ascospore formation. ASD mutants had defects in the amount of cleistothecia, time of cleistothecial maturation or color of ascospores.

**KEYWORDS:** *Aspergillus nidulans*, NSD, BSD, ASD

자가교배 자낭균(homothallic ascomycete)인 *Aspergillus nidulans*는 두종류의 생활사를 가진다. 하나는 체세포 분열을 통하여 무성포자를 생성하는 무성생식 생활사이고, 또 하나는 감수분열에 의해 자낭포자를 생성하는 유성생식 생활사이다. 이러한 각각의 포자를 형성하는 과정에서는 독특한 형태 발생이 이루어 진다. 무성생식 과정의 초기에는 영양변식 균사로 부터 foot cell이 형성되고 이 근세

포로 부터 conidiophore가 형성된다. Conidiophore 끝에 vesicle이 형성되고 vesicle로부터 phialides가 phialides 끝에서 budding에 의해 conidia가 발생된다(Smith *et al.*, 1977). 그러나 유성생식의 초기 분화에 대해서는 거의 밝혀진 바 없다. 유성생식 과정에서는 두 종류의 세포가 영양변식 균사에서 각기 다른 방향으로 분화해 나간다. 그 하나는 Hülle cell로, 또다른 하나는 primordia로 분화해 나가는데,

이 primodia는 최종적으로는 cleistothecia로 분화한다(Zonneveld, 1977). 자낭과 자낭포자는 cleistothecia속에서 생성되므로 cleistothecia의 형성 단계가 유성분화의 가장 주요한 단계로 간주될 수 있다. cleistothecia 이전에 형성되어 최종적으로는 숙성된 cleistothecia 주위를 에워싸는 Hülle cell의 역할에 대해서는 별로 밝혀진 바 없다.

영양변식 균사가 conidiophore로 분화하기 위해서는 일정한 성장시간(competent time)이 요구되는 것으로 알려져 왔다(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 조절되어 지므로, 세포내에 분화에 관한 자체 설계된 내부 시간 조절 시스템(self-programmed internal clock system)이 있을 것으로 예상된다. Competence을 획득한 후 분화하도록 유도되어진 균사는 일련의 분화과정을 거친다. 일련의 무성생식기관의 분화를 조절하는 유전자 중 일부는 분리되어 cloning되었고 생화학적으로 분석되었다(Timberlake, 1980 : Law *et al.*, 1980 : Johnstone *et al.*, 1985 : Boylan *et al.*, 1987 : Timberlake, 1987 : Adams *et al.*, 1988 : O'Hara *et al.*, 1989 : Mirabito *et al.*, 1989)

유성생식 분화에 대한 competence도 무성생식 분화와 동일한 경로를 통하여 얻어지는지 또는 상이한 경로를 통하여 얻어지는지는 알려진 바 없다. 또한 유성생식 분화 과정에 관여하는 어떠한 유전자도 보고된 바 없다. 몇몇의 무성포자 결손 돌연변이체가 cleistothecia도 형성하지 못하는 것이 보고되었으나(Kurtz and Champe, 1981) 유성생식 분화에 관한 어떠한 특성도 연구된 바 없다. 유성생식기관이 형성되기 이전에 무성포자가 무성하게 생성되어 나중에 형성되는 유성생식 기관을 덮어버리므로 유성생식 돌연변이체의 대량분리가 난이하다. 본 연구에서는 유성분화의 조절기작을 연구하기 위한 첫번째 과정으로 무성포자의 발생은 완전히 억제하면서 유성분화에는 전혀 영향을 미치지 않는 조건을 설정하여 이 조건하에서의 유성분화의 각 단계에 이상이 생긴 돌연변이체를 대량 분리하고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 균주

Fungal genetic stock Center(FGSC)로부터 분양받은 *Aspergillus nidulans* FGSC4(veAl<sup>+</sup>)을 야생형으로 사용하였으며, 미확인 유성생식관련 돌연변이의 보유유무를 조사하기 위해 몇 종의 FGSC 검색균주(FGSC237, FGSC168, FGSC163, FGSC159, FGSC154)를 사용하였다.

### 배양 배지

YG(yeast extract-glucose)배지는 Timberlake(1980) 방법에 의거하여 제조하였다. 완전배지와 최소배지는 Pontecorovo *et al.*(1953) 및 Harsani *et al.*(1976)가 기술한바와 동일한 조성으로 제조하였다. Colony 크기를 제한하기 위해서는 배지에 0.05% sodium deoxycholic acid(Sigma)을 첨가하였다. 배지의 pH는 멸균전에 6.0으로 조정하였다. 고체배지는 사용 전에 하루동안 실온에서 건조시킨 후 사용하였다.

### 배양 조건

접종은 3일 동안 배양된 무성포자를 0.08% Tween 80으로 수확하여 사용하였다. 수확한 무성포자를 적당히 희석한 후 1 ml의 현탁액을 접종하여 3일 동안 37°C에서 배양하였다. 밀봉 실험을 위해서는 배양접시를 paraffin film(Whatman)으로 24시간동안 밀봉하였다. 세포 분화 기관은 해부 현미경하에서 측정하였다. 무성생식 기관으로는 conidial heads를 측정하였고 유성생식 기관으로 Hülle cell aggregates를 측정하였다.

### 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 완충용액으로 세척하고 동일 완충용액에서 재현탁한 후 10<sup>7</sup> cells/ml로 희석하였다. 9 cm 배양접시에 평균 깊이가 2 mm 이하가 되도록 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 최소

배지에 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 colony를 재분리해낸 후 표준 조건하에서 표현형을 확정하였다(결과 및 고찰 참조).

**結果 및 考察**

**유성분화를 억제하는 배양조건**

유성분화는 배지의 종류나 양에 따라 변화가 심하므로(Zonneveld, 1980) 돌연변이체들의 여러가지 표현형이나 유성분화에 미치는 여러조건을 비교하기 위해서는 표준조건을 설정하는 것이 필수적이다. 특별한 언급이 없는 한 Merck제품의 포도당과 Difco 제품의 한천을 함유한 최소배지를 표준배지로 사용하였고, 배지의 양은 배양접시당 30 ml, 배지의 pH는 멸균 전에 6.0으로 조정하였다. 표준접종량은 10<sup>6</sup> cells/ml이 되도록 희석하여 배양접시당 1 ml을 접종하였다. 몇종의 *Aspergillus* 완전배지에서의 분화양상을 표준배지의 분화양상과 비교한 것을 Table I에 나타내었다. 완전배지에서 무성분화는 어느정도 저해되는 반면 유성분화는 촉진되었다. 최소배지에 casein hydrolysate을 첨가한 배지가 가장 효과적으로 무성분화를 억제하고 유성분화를 촉진함으로써, 유성분화를 연구하는데 가장 좋은 배지임을 알 수 있었다. Table II에는 배양접시를 밀봉하여 공기를 차단하였을 때 나타나는 분화양상을 나타내었다. 밀봉하였을 경우 배지의 양에 관계없이 거의 완벽하게 무성분화가 저해되었다. 무성분화에 대한 저

**Table I.** Sexual and asexual development on various media

Media type <sup>a</sup>	Asexual amount <sup>b</sup>	Development time (days) <sup>c</sup>	Sexual amount <sup>d</sup>	Development time (days) <sup>e</sup>
YG	++	2	++	3
CM	++	2	++	2
MM	+++	2	+	4
MM+CA	+	2	+++	2

<sup>a</sup>: Medium composition (C & N source)  
 YG: glucose 2%, yeast extract 0.5%  
 CM: glucose 1%, yeast extract 0.15%, casein hydrolysate 0.15% sodium nitrate 0.1%, vitamins  
 MM: glucose 1%, sodium nitrate 0.1%  
 MM+CA: glucose 1%, sodium nitrate 0.1%, casein hydrolysate 0.1%  
<sup>b</sup>: No. of conidial heads/mm<sup>2</sup>  
 +: less than 100/mm<sup>2</sup>  
 ++: more than 100 but less than 200/mm<sup>2</sup>  
<sup>c</sup>: Time required for detection of colored conidial heads  
<sup>d</sup>: No. of cleistothecium/mm<sup>2</sup>  
 +: less than 5/mm<sup>2</sup>  
 ++: more than 5 but less than 10/mm<sup>2</sup>  
 +++: more than 10/mm<sup>2</sup>  
<sup>e</sup>: Time required for detection of brownish cleistothecia

해효과는 casein hydrolysate을 첨가한 배지에서 더욱 확실히 나타났으며, 따라서 돌연변이를 분리하기 위한 최적배양 조건은 casein hydrolysate가 첨가된 최소배지에 밀봉배양하는 것이다. 완전배지에서나 casein hydrolysate가 첨가된 배지에서 무성생식보다 유성생식으로의 분화가 선호되는 이유는 정확히 알 수는 없으나, Energy 대사과정의 대사 방식 또는 세포내의 energy 수준과 관련이 있을 것으로 생각된다. *Aspergillus niger*에서 TCA 회로의 유기산들이 conidiogenesis를 촉진하며(Galbraith

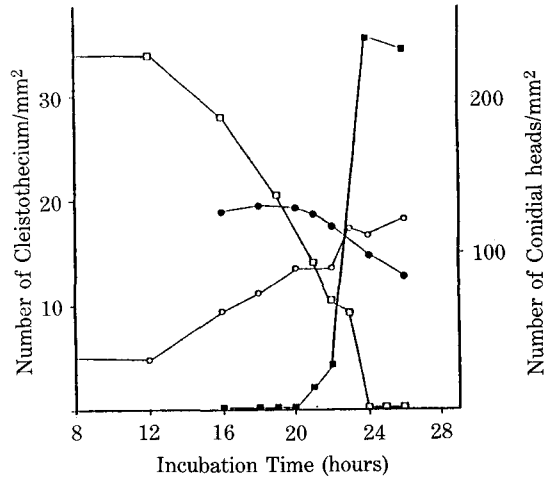
**Table II.** Effects of plate sealing on sexual and asexual development

Volume of media per plate (ml)	No. of cleistothecia per mm <sup>2</sup>				No. of conidial head per mm <sup>2</sup>			
	Unsealed		Sealed		Unsealed		Sealed	
	-CA	+CA	-CA	+CA	-CA	+CA	-CA	+CA
20	1.1	11.2	9.0	11.8	238	66	1	2
30	4.0	14.5	16.2	17.4	253	40	3	2
40	9.8	17.8	20.0	21.6	248	35	1	1
50	14.2	21.4	27.8	29.6	236	22	0	0

and Smith, 1969), 무성분화가 진행되는 동안 TCA 회로의 효소들이 높은 활성을 나타낸다는(Ng *et al.*, 1972) 보고는 무성분화가 TCA 회로와 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 또한 *Aspergillus nidulans*에서 TCA 회로 의존성 탄소원인 acetate를 유일한 탄소원으로 주어졌을 경우에 유성분화가 전혀 일어나지 않는 결과(Han, 미발표 결과)는 TCA 회로 이전의 glucose degradation 과정이 유성분화에 있어 중요함을 나타낸다. 밀봉에 의해 야기될 수 있는 환경의 변화가 크게 O<sub>2</sub>의 고갈, CO<sub>2</sub>의 축적 및 humidity의 증가 등으로 고려하여 볼 때, 무성분화가 억제되는 원인은 TCA 회로가 영향을 받기 때문인 것으로 생각되며, 좋은 영양상태에서 무성분화보다 유성분화가 선호되는 이유도 바로 이러한 energy 대사의 운용과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

#### 효과적인 밀봉 및 해제시기

30 ml 이상의 배지를 함유한 배양접시를 밀봉한 채 배양하면 영양번식을 하고 있는 상태에서 성장이 중단되며 적당한 시기 이후에 밀봉을 제거하면 유성생식 방향으로만 분화가 진행된다. 이는 밀봉에 의해 야기되는 어떤 조건이 무성생식의 분화만 선택적으로 저해함을 의미한다. 그러나 밀봉을 지나치게 오래할 경우 유성생식으로의 분화도 영향을 받기 때문에, 무성생식만 저해하는 효과적인 밀봉 및 해제시기를 조사하였다. Fig. 1에서 보듯이, 무성생식의 경우 20시간 이전에 밀봉한 것에서는 거의 완벽하게 conidial heads를 형성하지 못했으나, 20시간 직후의 밀봉에서는 conidial heads가 관찰되었으며, 24시간 이후에는 밀봉하지 않는 경우와 유사한 양의 conidial heads가 형성되었다. 이와 대조적으로, 유성생식의 경우는 20시간 이전의 밀봉배양에서 최다수의 cleistothecia를 형성했으나 20시간 이후의 밀봉에서는 점차 그 수가 감소했다. 또한, 밀봉해제시기에 따른 유성 및 무성분화도 시기별로 다르게 나타났는데, 무성생식의 경우 12시간 이전에 행한 밀봉해제에서는 거의 일정하게 최다수의 conidial heads의 형성이 감소되었으며, 24시간 가까이에서는 거의 완벽하게 conidial heads가 형성되지 못했다. 유성생식의 경우도 12시간 이전의 밀봉해제는 거의 일정한 최저의 cleistothecia를 형성했으나, 12시간 이후에 행한 밀봉해제에서는 점차로 cleistothecia의 수가 증가했다. 이상의 결과로 보아 밀



**Fig. 1.** Development of sexual and asexual organs according to the time of sealing or unsealing. One set of plates were sealed just after inoculation and unsealed after incubation of various times. The numbers of conidial heads (open squares) and cleistothecia (open circles) were scored from 5 day cultures. The other set of plates were sealed after incubation of various times and unsealed after further incubation of 24 hours. The numbers of conidial heads (closed squares) and cleistothecia (closed circles) were scored in same way.

봉에 의한 무성생식의 저해 및 그에 의한 유성생식으로의 분화결정은 20시간부터 24시간사이의 배양기에 일어나고 있음으로 사료된다. 이 시기는 무성분화가 유도되기 위해 필요한 competent time (Axelrod *et al.*, 1973)과 거의 일치하는 성장시기로서, 이 때에 밀봉에 의해 야기된 어떤 조건에 의해 무성분화가 억제되면 유성분화로의 비가역적인 분화결정이 이루어지는 것으로 생각할 수 있다.

#### 접종크기에 대한 밀봉배양효과

무성생식을 효과적으로 저해하고 유성생식은 촉진하는 조건인 casein hydrolysate 첨가배지에서의 밀봉배양은 10<sup>6</sup> cell을 접종하는 표준조건 하에서 얻어진 것이다. 밀봉효과에 대한 원인을 정확히 알 수는 없지만 산소의 결핍, CO<sub>2</sub>의 축적 또는 humidity의 증가 등으로 추측할 수 있다. 어느 경우이든 배양체의 대사량, 또는 대사방식과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며, 따라서 plate에 접종되는 접종량과 plate 내의 공기양이 밀봉효과에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 효과적으로 돌연변이를 얻기

**Table III.** Inoculum size & media volume required to restrict the asexual development by aeration block

Media volume (ml)	Number of colony per plate				
	0-100	100-200	200-400	400-600	600-800
30	++	++	+	-	-
40	++	+	-	-	-
50	+	-	-	-	-

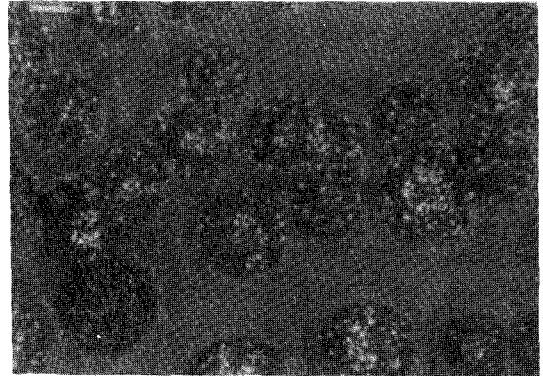
+: less than 100 conidial head/mm<sup>2</sup>  
 ++: more than 101 conidial head but less than 200/mm<sup>2</sup>  
 -: less than 10 conidial head/mm<sup>2</sup>

위해서는 plate 당 500개 이하의 colony가 형성되도록 집중해야 하기 때문에, 이 범주에서의 밀봉효과를 plate 당 배지양을 변화시키며 조사하여 보았다. Table III에서 보듯이 접종량과 배지양이 작을수록 무성생식으로의 분화가 많아지고 접종량과 배지양이 클수록 억제되었다. 돌연변이를 얻기 위한 최적 조건은 40 ml의 배지 200-400개의 colony를 형성시키는 접종량으로서, 밀봉의 효과를 충분히 얻을 수 있었다(Fig. 2).

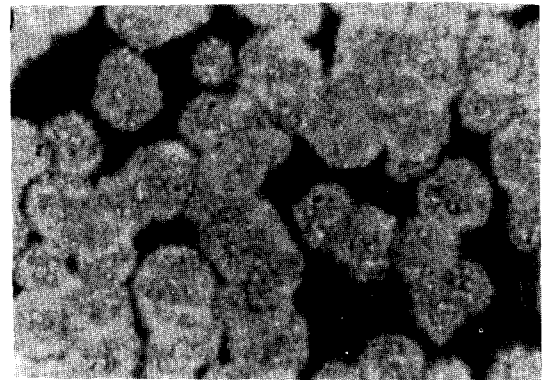
**돌연변이주 분리 및 분류**

이상과 같은 결과로부터, 유성생식과정에 이상이 생긴 돌연변이주를 분리할 수 있는 최적조건을 얻어, Han(1986)의 돌연변이 유발방법에 따라 3차에 걸쳐 모두 300여종의 돌연변이를 분리하였다. 이 돌연변이주들을 그 형태발생과정에 따라 크게 3 group으로 나누었는데, 유성생식과정이 전혀 관찰되지 않는 NSD(never in sexual development), cleistothecia, Hülle cells, ascus 또는 ascospores 형성 등의 분화가 어떤 단계에서 막혀 더 이상 진행이 되지 않는 BSD(block in sexual development), 유성분화의 최적단계까지 진행은 되지만 분화양상이 야생형의 경우와 다른 ASD(abnormal sexual development)가 그것이다. 이 돌연변이주들 중 전형적인 몇 종류의 분화적 특징을 Table V에 나타내었다.

NSD group에 속하는 돌연변이주들은 밀봉해제 후의 무성포자생성양상에 따라 2종류의 그룹으로 나뉘어 졌다. N13, N22 등은 밀봉해제 후 4시간 내에 conidiophore를 형성한 반면, N14, N24 등은, 20시간



A



B

**Fig. 2.** Shapes of colonies arisen on the sealed or unsealed plate. Most of the colonies formed on the unsealed plate showed both asexual (dark park of colony) and sexual (bright spots) organs by 4 days. (A). But several colonies were seen not to develop the cleistothecia (left bottom of A), which were not mutants. Although most of the colonies developed cleistothecia, the quantity and the time of maturation of cleistothecia fluctuated. Colonies formed on the sealed plate developed only cleistothecia which matured almost uniformly (B).

이상이 지난 뒤에야 conidiophore를 형성하였다. 첫째 그룹에 속하는 돌연변이주들은 밀봉에 의한 무성분화의 저해가 가역적인 것으로 미루어 보아 유성생식으로의 분화가 결정되는 단계에 이상이 있는 돌연변이주로, 둘째그룹에 속하는 돌연변이주는 밀봉해제 후에도 무성분화를 위한 competence를 획득하는 시간이 필요한 것으로 사료됨으로 유성분화로의 결정은 되었으나 초기단계에서 분화가 중단된 돌연변이주들로 추측된다. BSD에 속하는 돌연

**Table IV.** Morphogenesis of sexual organs by various mutans

Strain	Group	Laccase II	Hülle cell	Cleistothecia	Crozier	Ascus	Ascospore	Other phenotypes
N12	NSD	-	-	-	-	-	-	Group I
N13	NSD	-	-	-	-	-	-	Group I
N14	NSD	-	-	-	-	-	-	Group II
N15	NSD	-	-	-	-	-	-	Group I
N18	NSD	-	-	-	-	-	-	Group II
N22	NSD	-	-	-	-	-	-	Group I
N24	NSD	-	-	-	-	-	-	Group II
N100	NSD	-	-	-	-	-	-	Group I
B107	BSD	-	+/-	-	-	-	-	
B159*	BSD	+	+	-	-	-	-	
B108	BSD	+	+	-	-	-	-	
B5	BSD	+	+/-	+	-	-	-	
B24	BSD	+	+/-	+	-	-	-	
B19	BSD	+	+	+	-	-	-	
Mx	BSD	+	+	+	+	-	-	
Px	BSD	+	+	+	+	+	-	Diffuse purple pigment
F237	BSD	+	+	+	+	+	-	
A50	ASD	+	+	+	+	+	+	Reduced amount of cleistothecia
A39	ASD	+	+	+	+	+	+	Delayed maturation of cleistothecia
A34	ASD	+	+	+	+	+	+	Developed at upper part or edge of colony
Wx	ASD	+	+	+	+	+	+	Delayed formation of cleistothecia
Asd	ASD	+	+	+	+	+	+	Albino Asexual reduced Sexual increased
F154	ASD	+	+	+	+	+	+	Delayed, small cleistothecia, ve-
F168	ASD	+	+	+	+	+	+	Delayed, small cleistothecia, ve-

\*F; FGSC

변이주들 중에는 Hülle cell의 발생없이 cleistothecia가 발생되는 돌연변이주를 비롯하여, Hülle cell은 발생하지만 cleistothecia가 발생되지 않는 돌연변이주, Hülle cell과 cleistothecia가 모두 발생되지만 crozier, ascus 등 cleistothecia 내부의 기관의 발생이 중단된 돌연변이주등들이 다수 분리되었다. Hülle cell의 발생없이 cleistothecia만 생성되는 돌연변이

주들의 cleistothecia는 초기단계에서 분화가 중단된 채 성숙되지 못하였는데, 이는 Hülle cell의 기능이 cleistothecia의 성숙과정에 관여할 것이라는 가정 (Elis *et al.*, 1973; Zonneveld, 1977)을 강력하게 뒷받침한다. FGSC159와 FGSC237 등 유전학적 분석에 이용되고 있는 FGSC 균주들은 BSD group에 속하는 돌연변이 유전자를 가지고 있는 것으로 나

타났다. 따라서, 유성분화의 유전학적 연구를 위해서는 새로운 검색 균주(tester strain)을 제조하여야 할 것이다. 한편, ASD group에 속하는 돌연변이주들 중에는 cleistothecia의 maturation이 야생형에 비해 현저하게 늦은 것(A39), maturation은 정상이지만, cleistothecia 양이 줄어든 것(A50), cleistothecia가 colony의 특정부위에서만 발생하는 것(A34), ascospore의 색소가 결핍된 것(Wx), 무성생식이 저해되고 대신 유성생식이 증가된 것(As1) 등이 분리되었고, *veA1* marker를 지니고 있는 FGSC168과 FGSC154도 cleistothecia 형성이 늦기 때문에(Champe *et al.*, 1981) ASD group에 포함시켰다.

이상에서 보았듯이 배양접시를 밀봉하여 배양하는 단순한 방법으로 무성분화를 거의 완벽하게 차단하고 유성분화만을 발생시킬 수 있음으로써, 유성분화과정과 관련된 돌연변이주를 대량 분리하기가 용이하여져, 유성분화의 유전학적 접근이 가능하게 되었다. 앞으로, 밀봉배양이 무성생식과정을 특이하게 비가역적으로 저해하는 이유의 규명과, 분리된 여러 돌연변이주들이 유전학적 및 분자생물학적 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 摘 要

몇몇 배양조건이 유성 또는 무성분화에 미치는 영향을 조사하여, 유성분화 결손 돌연변이주를 분리하기 위한 효율적인 조건을 찾고자 하였다. 무성분화는 억제하며, 유성분화는 촉진시키는 여러조건 중 Casein hydrolysate를 첨가한 최소배지에 밀봉배양하는 것이 가장 효율적인 조건으로 선택되었다. 접종 후 20시간 이전에 밀봉하고 계속 배양하면, 유·무성분화 모두가 억제되나, 밀봉 후 20시간 정도 후에 밀봉을 해제하면 유성분화만이 진행되었다. 이러한 성질을 이용하여 유성분화과정에 이상이 일어난 돌연변이주를 대량 분리해 냈었으며, 이들의 분화양상에 따라 크게 3 group : NSD(never in sexual development), BSD(block in sexual development), ASD(abnormal in sexual development)으로 분류하였다. NSD 돌연변이주는 Hülle cell이나 cleistothecia 등의 유성생식기관을 전혀 생성하지 못하였고, BSD 돌연변이주는 Hülle cell, cleistothecia, crozier, asci 또는 ascospore 형성 중 어느 과

정에서 중단되어 분화가 끝까지 진행되지 못하였으며, ASD 돌연변이주는 유성분화의 최종단계까지 진행은 되지만 유성생식 기관의 생성시거나 양이 야생형과 현저하게 차이를 보였다.

### 參考文獻

- Adams, T.H., Boylan, M.T. and Timberlake, W.E. (1988): *brlA* 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): Isolated and characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3113-3118.
- Champe, S.P., Kurtz, M.B., Yager, L.N., Butnick, N.L. and Axelrod, D.E. (1981): In *The Fungal spore: Morphogenic Controls*, edited by G. Turian and H.R. Hohl. pp. 255-276. Academic Press. New York.
- Elis, T.T., Reynold, D.R. and Alexopoulos, C.C. (1973): Hülle cell development in *Emergicella nidulans*. *Mycologia.* **65**: 1028-1035.
- Galbraith, J.C. and Smith, J.E. (1969): Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid cultures. *J. Gen. Microbiol.* **59**: 31-45.
- Gealt, M.A. and Axelrod (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*. A thesis for Ph. D. degree in microbial genetics. Seoul National University.
- Harsani, I., Granek, I.A. and Mackenzie, D.W. (1976): Genetic damage induced by ethyl alcohol in *A. nidulans*. *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.
- Kuryz, M.B. and Champe, S.P. (1981): Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual develop-

- ment. *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., Admas, 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.
- Ng, W.S., Smith, J.E. and Anderson, J.G. (1972): Changes in carbon catabolic pathways during synchronous development of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* **71**: 495-504.
- O'Hara, E.B. and Timberlake, W.E. (1989): Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans*. *yA* locus. *Genetics* **121**: 249-254.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hermans, L.M., MacDonald, K.D. and Button, W.J. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**: 141-238.
- Smith, J.E., Anderson, 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. (1980): Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78**: 497-510.
- Timberlake, W.E. and Marshall, M.A. (1988): Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **4**: 162-169.
- 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.
- Zonneveld, B.J.M. (1980): Protease levels in relation to cAMP and a reserve polymer during growth and sexual differentiation of *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* **4**: 140-146.

**Accepted for Publication 20 November 1990**