

Aspergillus nidulans 색소결핍 억제돌연변이주의 세포벽 미세구조

정 윤 신*

Department of Pathology and Immunology, box 8118, Washington University School of Medicine, 660 S. Euclid, St. Louis, MO 63110, USA

Received October 2, 2003 / Accepted November 27, 2003

Ultrastructure of Cell Wall in the Suppressor Mutant of Null Pigmentation (SU-NPG) of *Aspergillus nidulans*. Yun Shin Chung*. Department of Pathology and Immunology, box 8118, Washington University School of Medicine, 660 S. Euclid, St. Louis, MO 63110, USA – To investigate the effect of the cell wall on the pigmentation and branching in *Aspergillus nidulans*, ultrastructure of cell wall in suppressor mutant of the null pigmentation (SU-NPG, SU602) has been examined. Scanning electron micrographs (SEM) revealed that the most outer layer of conidia wall peeled off in SU-NPG on day 6 from the complete conidiation. They also showed that hyphal growth and branching were not well developed in SU-NPG. Transmission electron micrographs (TEM) showed that the plasma membrane was not crenulated and the hyphal wall was thick in SU-NPG. These results indicated that the ultrastructure of cell wall in SU-NPG might be modified. Cytochemical analysis showed that the cell wall in SU-NPG was differentiated into C1, C3, C2 and C4 layer in conidia and H1, H3, H2 and H4 layer in hyphae. C3 layer and H3 layer existed in SU-NPG. The increment of the diameter in SU-NPG hyphae might be caused by the thickness of H3 layer. These results suggest that SU-NPG may have an immature but the differentiated structure for the pigmentation in cell wall.

Key words – *Aspergillus nidulans*, SU-NPG, conidia, hyphae, cytochemical analysis

자낭균류에 속하는 *Aspergillus nidulans*는 형태발생과정 중 2차 대사과정에 의하여 무성포자(conidia)에는 암록색소(dark green pigment), 유성포자(ascospore)에는 자주색소(violet pigment) 및 균사체 (mycelium)에는 멜라닌이 합성되는데, 이러한 색소는 대부분 세포벽에 침적된다. 세포벽에 존재하는 색소 중 멜라닌은 chitinase나 β -glucanase와 같은 효소들의 공격과 x-선, γ -선 및 자외선 조사 등으로부터 세포를 보호하는 기능을 한다고 알려져 있다[1,5,10]. 한편 *Podospora anserina*에서는 유성분화에 결함이 생긴 돌연변이주 중 대부분이 phenol oxidase 기능이 저하되어서 멜라닌을 합성하지 못하는 돌연변이주임이 밝혀져 있으며[6], *Schizophyllum commune*에서도 phenol oxidase가 basidiocarp 형성에 필수적인 효소임이 밝혀짐으로써[9], 균류에서의 색소를 단순히 세포벽 성분으로보다는 분화기작과 관련지어서 이해하려는 노력이 가중되어 왔다.

본 연구에 이용된 *A. nidulans*의 색소결핍 억제돌연변이주 (suppressor mutant of null pigmentation, SU-NPG)는 무성포자(conidium) 및 유성포자(ascospore)가 야생형의 경우처럼 정상으로 보이나, 성장속도, 무성 및 유성분화의 속도는 야생형(FGSC4)에 비하여 4-5 시간 정도가 지연되는데, 이는 균사의 분지속도가 지연되기 때문인 것으로 생각되었다.

균사 분지형성을 위하여 견고한 세포벽에 가수분해효소가 작용하여 분해되어야하는데[7], 색소합성을 위하여 세포벽구조가 필요할 것이고, 이는 균사 분지형성 및 세포벽 재구성과

관련되어 있을 것이다. 따라서 SU-NPG도 색소합성 및 색소 침적은 정상적일지라도 세포벽 구조에 이상이 있을 것으로 생각된다. 또한, SU-NPG의 세포벽 구조 또는 세포벽 합성이 야생형과는 다르게 변화되었다고 생각되는데, 이는 SU-NPG 세포벽에 이상이 있음을 나타내는 특징 중의 하나로서 이들이 Novozyme에 의한 원형질체 형성속도가 FGSC4에 비하여 매우 빠르다는 점이다[2]. 이는 FGSC4가 Novozyme에 대한 inhibitor를 형성하기 때문에 이들 돌연변이에 비하여 원형질체의 형성속도가 느리거나, 이들 돌연변이주들에 있어서 균사 정단의 세포벽에 이상이 생겨서 원형질체 생성이 잘 될 수 있는 구조를 지니기 때문으로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 *A. nidulans*의 색소결핍 억제돌연변이주(SU-NPG)를 이용하여 색소형성 및 분지형성에 미치는 세포벽의 미세구조에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 *A. nidulans* 균주는 색소결핍 억제돌연변이주(SU-NPG)인 SU601 (Green *npgA1*; *suA6npgA1*)과 SU602 (Chartreuse *npgA1*; *pyroA4*; *nicB8*; *chaA1*; *suA6npgA1*)를 사용하였다.

배지 및 배양조건

*A. nidulans*의 종균 및 포자수확을 위하여 Harsani 등[8]의 완전배지(complete medium, CM)에서 37°C로 3일 내지 6일

*Corresponding author

Tel : 1-314-362-9045, Fax : 1-314-362-8888

E-mail : chungy@pathbox.wustl.edu

간 배양하였고, 균사(hyphae) 배양을 위하여 CM에서 3일간 배양한 무성포자를 수확하여 1×10^6 /ml이 되게 하여 37°C에서 8시간 배양 후, 제한온도인 42°C에서 6시간 동안 배양하였다.

분생포자, 자낭포자 및 균사체의 전자현미경 관찰

수확한 분생포자, 자낭포자 및 균사체를 전고정을 위하여 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2)에 희석시켜 4% glutaraldehyde (pH 7.2)가 되게 준비된 용액에서 4°C로 4시간 동안 처리하였다. 그 후, 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2)에 용해시켜 최종 농도가 1%인 OsO_4 용액으로 4°C, 4시간 동안 처리하여 후고정 후, 동일 buffer로 3회 세척하였다. Ethanol (Merck) 농도 순으로 각 세포들을 각각 15분씩 처리한 다음 무수 ethanol에서 5분씩 2회 처리하여 탈수시켰다. 주사형 전자현미경(SEM) 관찰을 위하여 무수 ethanol로 탈수된 세포들에 isoamyl acetate와 에탄올 혼합액에 15분씩 처리하였다. 그 후, 무수 isoamylacetate에 15분씩 2회 처리하여 탈수시키고, 액체 이산화탄소를 이용하여 임계점 건조기(Ladd)를 이용하여 건조시켰다. 준비된 시료를 sputter coater (Ladd)로 gold coating 후 주사형 전자현미경(JSM-T330A, Jeol)으로 관찰하였다. 투과형 전자현미경(TEM) 관찰을 위하여 무수 에탄올로 탈수된 세포를 propylene oxide에 15분씩 2회 처리하여 수분을 제거한 후 epon mixture를 침투시켰다. 그 후 epoxy resin으로 포매한 다음, 30°C, 45°C와 65°C에서 각각 12시간 동안 중합시켰다. 세포가 포함된 block을 초박절편기(LKB)로 diamond knife를 사용하여 50-80 nm 두께로 박절하였다. 절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여[12] 투과형 전자현미경(TEM, JEM-1200EXII, Jeol)으로 관찰하였다.

세포의 화학적 미세구조를 관찰하기 위하여 세포가 포함된 block을 50-60 nm로 초박절편 절편을 gold grid에 모으고 탄수화물 염색을 하였다[2,4,14,15]. Parafilm 위에 1% (w/v) periodic acid 수용액을 한 방울 떨어뜨리고 절편을 1시간 동안 산화시켰다. Grid를 증류수로 세척하고 10% acetic acid (v/v) 물방울에서와 20% acetic acid 물방울에 각각 15분씩 담근 후, 20% acetic acid에 녹인 0.2% (w/v) thiocarbonylhydrazide (Sigma) 수용액에서 24시간 동안 처리하였다. Grid를 20% acetic acid, 10% acetic acid와 증류수에 각각 15분간 담근 후 증류수로 세척하였다. 사용 바로 전에 1% (w/v, 수용액) mild silver protein (20% silver, Sigma)을 준비하여 1.5 ml 미세 원심관에 넣고 10,000 g에서 2분간 원심분리하여 입자물질을 제거시킨 용액을 준비하였다. 사용직전에 준비된 1% mild silver protein 용액으로 절편을 암소에서 2시간 동안 염색하였다. 신선한 증류수 방울에 5분씩 3회 옮겨서 담근 후, 증류수로 세척 후 투과형 전자현미경(JEM-1200-EXII, Jeol)으로 세포의 화학적 미세구조를 관찰하였다.

결 과

색소결핍 억제돌연변이주(SU-NPG)의 형질

SU-NPG는 42°C에서는 분생포자(conidia)가 발아되지 못하고, 37°C에서 발아를 시킨 후 42°C에서는 정상적인 정단생장(apical growth)을 못하는 온도감수성 돌연변이주(temperature sensitive mutant, ts)이며, 격막 간의 길이가 짧고, 균사의 정단모양은 둥글다[2]. SU-NPG의 이와 같은 특징은 세포벽의 구조 또는 기능에 이상이 있기 때문으로 추측된다. 균사분지 형성을 위하여 견고화된 세포벽에 가수분해효소가 작용하여 분해되어야 하는데[2-4,7], 색소합성을 위한 세포벽 구조를 필요로 할 것이다. 이는 균사 분지형성과도 관계가 있을 것이며, 세포벽 재구성과도 관련되어 있을 것이다[3,4]. 실제로 FGSC4에 비하여 SU-NPG는 복합적 세포벽 분해효소인 Novozyme에 의하여 원형질체가 매우 빠르게 생성된다[2]. 이는 SU-NPG 세포벽이 효소에 의하여 더욱 분해되기 쉬운 구조를 지니는 것으로 사료되었으므로, 전자현미경을 이용하여 세포벽의 구조변화를 관찰하였다.

SU-NPG 세포의 표면구조

각 균주를 CM 액체배지에서 37°C로 8시간 동안 진탕 배양한 후 42°C로 옮겨서 6시간 동안 배양한 균사의 표면을 SEM으로 관찰하였다. SU-NPG에서는 FGSC4[2,4]에 비하여 균사 표면은 거칠었고, 균사 분지는 정상적이었으나, 균사가 굴곡되었으며, 균사 직경은 야생형에 비하여 매우 두꺼웠다(Fig. 1). FGSC4에서 분생 포자벽은 CM 평판배지에서 37°C로 3일과 6일 및 2개월 동안 배양하였을 때 외각에 독특한 굴곡 층을 가지고 있는데[2,4,5], SU-NPG에는 이러한 외각의 굴곡 층이 존재하였으나, 외각의 굴곡 층이 불안정하여 배양 6일째부터 박리되었다(Fig. 2). SU-NPG는 FGSC4에 비하여



Fig. 1. Scanning electron micrograph of the *A. nidulans* SU602 mycelia grown at 37°C for 8 hours and 42°C for 6 hours in a liquid complete medium. Bar: 5 μm .



Fig. 2. Scanning electron micrograph of the conidia in *A. nidulans* SU602. They were grown in a complete medium at 37°C for 6 days. Arrow indicates the outer wall of the conidia. Bar: 1 µm.

분생포자의 생존력이 시간이 지남에 따라 매우 떨어지는데 (자료 미제시), 이는 외각 굴곡 층의 불안정성과 관련이 있을 것으로 생각된다.

CM 평판배지에서 4일 동안 배양된 자낭포자를 순수하게 분리하여 표면을 관찰한 결과, 야생형인 FGSC4에는 자낭포자의 중앙부에 크고 분명하며, 잘 분화된 두가닥의 띠가 존재하는데[2,4] SU-NPG(SU602)에서는 자낭포자가 거의 형성되지 못하였고, NPG 억제 돌연변이주의 한 종류인 SU601 (*npgA1; subnpgA1*, green conidia color)에서만 자낭포자가 형성되었으나 그 크기는 크지만 수는 매우 적고 두 가닥의 띠가 중앙부에 불완전한 상태로 존재하였다(Fig. 3). 이상의 결과들로부터 SU-NPG에서 균사, 분생포자 및 자낭포자의 표 구조는 비정상적이며 불안정함을 알 수 있었다.

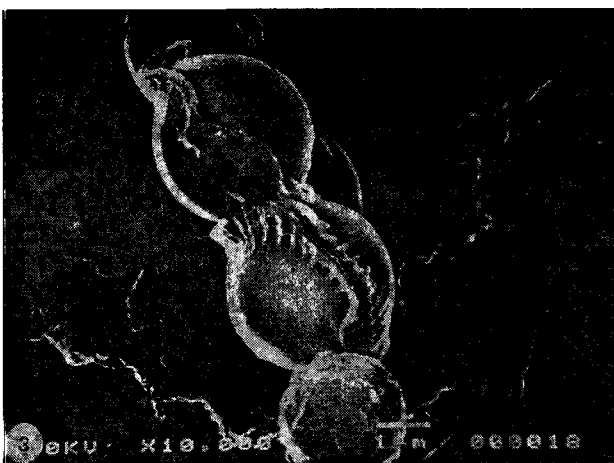


Fig. 3. Scanning electron micrograph of the *A. nidulans* SU601 ascospores grown at 37°C for 4 days in a complete medium.

SU-NPG 세포벽의 미세구조

균사를 박절하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색을 하면 그 세포벽은 바깥 쪽에 전자밀도가 높은 층과 안 쪽에 전자밀도가 낮은 층으로 되어 있었다. SU-NPG에서 균사 세포벽은 그 두께가 FGSC4에 비하여[2], 2배 정도 증가되었다 (Fig. 4). 따라서 SU-NPG에서 균사 직경의 증가는 세포벽 두께에 기인되었음을 알 수 있었다. SU-NPG 경우는 정단부위가 FGSC4에서 비하여 둥근모양을 하고 있었다. 분생포자는 FGSC4에 비하여 SU-NPG에서 큰 차이는 없었으나, 그 두께가 다소 얇아졌다(Fig. 5).

SU-NPG에서 세포벽 미세구조의 이상과 이들 형질과의 관련성을 조사하고자 Sewall 등[14]의 방법에 따라 탄수화물 염



Fig. 4. Transmission electron micrograph of the longitudinal section in the *A. nidulans* SU602 mycelia. They were grown at 37°C for 8 hours and 42°C for 6 hours in a complete medium. PM (plasma membrane). Bar: 100 nm.



Fig. 5. Transmission electron micrograph of the cross section in *A. nidulans* SU602 conidia. They were grown in a complete medium at 37°C for 3 days. PM (plasma membrane) and V (vacuole). Bar: 100 nm.

색을 하여 TEM으로 세포벽의 화학적 미세구조 차이를 관찰하였다. 탄수화물 염색을 하여 관찰 시 FGSC4의 균사 세포벽은 네 층으로 구성되어 있었는데[2,4], 외부환경과 경계를 이루는 맨 바깥 층은 H1 층, 그 바로 안 쪽 층은 H3 층, 그 안 쪽에 불균일하며 탄수화물 염색에 강한 양성반응을 나타내는 층은 H2 층, 원형질막과 인접한 맨 안 쪽 층은 H4 층이다. NPG의 균사 세포벽은 H1 층과 H3 층이 존재하지 않고 탄수화물 염색에 강한 양성반응을 보이는 불균일한 H2 층과 원형질막과 인접부위에 견고하게 형성된 H4 층으로만 이루어져 있었다[2,4]. 그러나, SU-NPG에는 H1 층, H2 층, H4 층이 FGSC4와 유사하게 발달하였으나 H3 층이 매우 두껍게 발달하였다(Fig. 6). NPG에서는 색소결핍 및 균사분지 저조 등의 형질이 세포벽에서 H1 층과 H3 층이 결여되어 나타나는 현상이라고 생각할 수 있었는데, SU-NPG에서는 두꺼운 H3 층에 의하여 색소결핍 돌연변이를 억제하는 것으로 생각된다.

야생형인 FGSC4 분생포자벽은 네 가지 층인 C1 층, C3 층, C2 층과 C4 층으로 이루어져 있는데[2,4,14], 외부와 경계를 이루는 최외각 층인 C1 층이, 그 안 쪽에 C3 층, 그 안 쪽에 비교적 염색이 약하게 되는 C2 층이 있고, 맨 안 쪽에 원형질막과 인접한 C4 층이 있다. NPG 분생포자벽은 C3 층이 결여되어 있고 C2 층으로만 되어 있는데, 그 염색 정도는 다소 약하였다[2,4]. 또한 SU-NPG 분생포자벽에는 4 가지 층이 정상적으로 존재하였지만, C2 층보다 C3 층이 잘 발달하였음을 알 수 있었다(Fig. 7).



Fig. 6. Transmission electron micrograph of the carbohydrate stained section in the *A. nidulans* SU602 mycelia. They were grown in a complete medium at 37°C for 8 hours and 42°C for 6 hours. H1, H3, H2 and H4 mean the differentiated wall layers of the mycelia, PM (plasma membrane). Bar: 100 nm.

고 찰

*A. nidulans*에서 분리된 색소결핍 돌연변이를 37°C에서 특



Fig. 7. Transmission electron micrograph of the carbohydrate stained sections in the *A. nidulans* SU602 conidia. They were grown at 37°C for 3 days in a complete medium. C1, C3, C2 and C4 show the differentiated wall layers of the conidia. PM means plasma membrane. Bar: 100 nm.

이하게 억제하는 SU-NPG는 42°C에서 포자발아, 정단생장 및 분화과정 등에 결함이 있는 온도감수성 돌연변이인데, 형질상의 특징으로 볼 때 세포벽의 구조에 이상이 있을 것으로 추정되었으므로, 본 연구에서는 이러한 SU-NPG의 세포벽 형태를 정밀 조사함으로써 색소합성과정에 필요한 세포벽의 구조에 대한 지식을 얻고자 하였다.

SU-NPG에서는 균사 두께가 FGSC4에 비하여 증가되었으며, 그 표면은 거칠었다(Fig. 1). 또한, SU-NPG에서의 균사 정단은 둥글었다. 균사 정단의 모양은 둥근 것일 수록 활기가 없으며 그 모양이 가늘고 날카로울수록 활기있는 구조라는 견해[13]에 비추어 볼 때 SU-NPG는 형태적으로 활기가 없는 구조를 나타내는 것으로 보인다.

FGSC4 분생포자는 외각에 굴곡 층(C1 층) [14]이 2개월 이상 동안 계속 유지되는데[2,4] SU-NPG에서는 이러한 층이 배양 6일 쯤부터 박리되었다(Fig. 2). 이 때문에 SU-NPG의 분생포자는 야생형에 비하여 생존력이 떨어지는 것으로 보인다(자료미제시). 이들 돌연변이주들에서 자낭포자의 미분화 및 외부구조의 불완전성은 세포벽의 α -glucan과 α -glucanase가 유성기관인 cleistothecium의 발달과 관계가 있다는 보고 [16,17]에 비추어 볼 때 SU-NPG의 세포벽 구조물 중 α -glucan 함량이 FGSC4에 비하여 적을 것으로 보인다. 또한 분생포자와 균사의 미세구조를 관찰한 결과, 분생포자와 균사 세포벽은 바깥 쪽에 있는 전자밀도가 높은 층과 안 쪽에 있는 전자밀도가 낮은 층으로 되어 있었다(Fig. 4, 5). NPG에서 세포벽 두께는 FGSC4와 차이가 없었으나[2,4], SU-NPG에서는 그 두께가 두꺼웠다(Fig. 4). SU-NPG에서 균사 직경의 증가는 균사벽 두께의 증가 때문임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *A. nidulans*에서 분생포자가 성숙함에 따라 그 벽의 두께

가 얇아진다는 결과[11,14]와 유사한 것으로서 군사 세포벽도 성숙함에 따라 그 두께가 얇아지는 것으로 생각된다. 이상의 결과들로부터 SU-NPG에서 세포벽 구조는 FGSC4와는 다른 것을 알 수 있었다.

군사 절편에 탄수화물 염색을 하여 세포화학적 미세구조를 관찰하면 FGSC4에서 군사 세포벽은 분생포자에서처럼 네 층으로 되어 있었는데, 바깥 층은 H1 층, 그 바로 안 층은 H3 층, 그 안 층은 H2 층, 세포질과 인접한 부위에 있는 맨 안쪽 층은 H4 층으로 구성되어 있었다. 반면, NPG 군사 세포벽은 H1 층 과 H3 층이 결여되어 있었으며, H2 층이 불균일하고 압축되지 않은 채 존재 하였고, 그 안 쪽에 H4 층이 존재하였다[2,4]. 그러나, SU-NPG의 군사 세포벽은 FGSC4에서처럼 네 층인 H1 층, H3 층, H2 층과 H4 층으로 분화되어 존재하였는데, H3 층의 두께가 매우 두꺼웠다(Fig. 6). Sewall 등[14]은 분생포자벽이 여러 층으로 분화되더라도 총 두께가 증가하지는 않았다고 제시하였는데, FGSC4의 군사 세포벽은 여러 층으로 분화되더라도 세포벽 두께가 증가되지 않았으나[2,4], SU-NPG의 군사 세포벽은 H3 층의 두께에 의해 그 두께가 증가되었음을 알 수 있었다. 탄수화물 염색을 하여 세포화학적 미세구조를 관찰하면 FGSC4에서 분생포자벽은 C1 층, C3 층, C2 층과 C4 층으로 되어 있었는데, 이러한 층들은 분화초기에 맨 바깥쪽에 C1 층, 그 안쪽에 C2 층이 있는데 C2 층이 압축되지 않아서 매우 두께가 두꺼우나, 분화가 될수록 C2 층이 압축되어 얇아지고, 더욱 분화하면 맨 바깥쪽에 존재하는 C1 층과 그 안 쪽의 C2 층 사이에 C3 층이 존재하고, 맨 안쪽의 세포질과 인접한 부위에 전자밀도가 높은 C4 층이 형성되었음을 알 수 있었는데[2,4,14], SU-NPG의 분생포자벽도 FGSC4의 그것과 유사하였다. NPG의 군사 세포벽에는 H3 층이 존재하지 않았으며, 그 분생포자벽에는 C3 층이 결여되어 있었는데, 이러한 층들의 부재 때문에 군사체에서 멜라닌 합성이 되지 못하고, 분생포자에서 각종 색소합성을 하지 못하는 것으로 사료된다. 따라서, 이러한 C3 층과 H3 층은 세포분화 시 색소형성 및 군사 분지형성에 필수적인 세포벽 구조임을 알 수 있었다. SU-NPG는 FGSC4에서와는 다른 비정상적인 성장을 하였지만, 색소결핍 돌연변이를 억제하였는데, SU-NPG의 군사 세포벽에는 H3 층이 매우 두꺼우나, 색소가 침적되기 위한 세포벽의 구조는 형성되는 것으로 사료된다.

요 약

*A. nidulans*의 색소결핍 억제돌연변이주(suppressor mutant of the null pigmentation; SU-NPG)의 세포벽 구조가 색소형성 및 군사분지에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다. SEM으로 세포 표면구조를 관찰한 결과, 완전배지에서 배양된 SU-NPG의 분생포자벽은 최외각 층이 6일째부터 박리되었으며, 군사생장이 저조하였다. TEM으로 관찰

한 결과, 군사 세포벽은 매우 두꺼워졌다. 이러한 전자현미경 관찰 결과는 이들 돌연변이주의 세포벽 구조가 NPG 및 야생형의 그것과는 다르다는 것을 시사한다. 군사에 탄수화물 염색을 한 후, 세포화학적 미세구조를 관찰한 결과, 분생포자벽은 C1, C2, C3와 C4 층으로 되어 있었고, 군사 세포벽은 H1, H2, H3 와 H4 층으로 되어 있었다. 이러한 C3 층과 H3 층은 세포분화 시 색소형성 및 군사 분지형성에 필수적인 세포벽 구조임을 시사한다. SU-NPG는 FGSC4에서와는 다르게 비정상적인 군사생장을 하였지만, 색소결핍 돌연변이를 억제하는데, 이는 SU-NPG의 군사 세포벽에는 H3 층이 형성되었으며, 세포벽 형성과정은 정상적으로 진행되기 때문으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bloomfield, M. J. and M. Alexander. 1967. Melanin resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.* **174**(2), 377-383.
2. Chung Y. S. 1995. Ultrastructure of the null pigmentation mutant (*npq*) in *Aspergillus nidulans*. Thesis for Ph. D. in Chonbuk National University.
3. Chung, Y. S., K. S. Chae, D. M. Han and K. Y. Jahng. 1996. Chemical composition and structure of hyphal wall of null pigmentation mutant of *Aspergillus nidulans*. *Molecules and Cells* **6**(6), 731-736.
4. Chung, Y. S., J. M. Kim, D. M. Han, K. S. Chae, and K. Y. Jahng. 2003. Ultrastructure of the cell wall in null pigmentation mutation, *npqA* of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology.* **41**(3), 224-231.
5. Claverie-Martin, F., M. R. Diaz-Torres and M. J. Geoghegan. 1988. Chemical composition and ultrastructure of wild-type and white mutant *Aspergillus nidulans* conidial walls. *Curr. Microbiol.* **16**, 281-287.
6. Esser, K. and W. Minuth. 1970. The phenoloxidase of the ascomycete *Podospora anserina*. VI. Genetic regulation of the formation of laccase. *Genetics* **64**, 441-458.
7. Harold, F. M. 1990. To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**(4), 381-431.
8. Harsani, I., I. A. Granek and D. W. Mackenzie. 1976. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* **48**, 51-74.
9. Leonard, T. J. 1971. Phenol oxidase activity and fruiting body formation in *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* **106**, 162-167.
10. Luther, J. P. and H. Lipke. 1980. Degradation of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 145-155.
11. Oliver, P. T. P. 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **73**, 45-54.
12. Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
13. Saunders, P. T. and A. P. J. Trinci. 1979. Determination of

- tip shape in fungal hyphae. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 469-473.
14. Sewall, T. C., C. M. Mims and W. E. Timberlake. 1990. Conidium Differentiation in *Aspergillus nidulans* wild type and wet-white (*wetA*) mutant strains. *Develop. Biol.* **138**, 499-508.
 15. Silva, M. T. and P. M. Macedo. 1987. Improved Theiery staining for the ultrastructural detection of polysaccharides. *J. Submicrosc. Cytol.* **19**(4), 677-681.
 16. Zonneveld, B. J. M. 1972. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans*: The significance of α -(1-3) glucan of the cell wall and α -(1-3) glucanase for cleistothecium development. *Biochim. Biophys. Acta.* **273**, 174-187.
 17. Zonneveld, B. J. M. 1974. α -(1-3) glucan synthesis, correlated with α -(1-3) glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **81**, 445-451.