エノキタケの遺伝学 VI. 生理学的自然突然変異体による連鎖研究**

武 丸 恒 雄

岡山大学理学部生物学教室

昭和 32 年 8 月 21 日 受領

UDC: 575: 582. 284.

Résumé

The linkage among genes controlling growth, colouration and mating system, was studied. The mating system of *Collybia velutipes* is dependent on two pairs of incompatibility factors, *A* and *B*. In the present study, the independent inheritance of these factors was confirmed (Table 2).

The author has obtained a spontaneous mutant monokaryon by isolating single basidiospores derived from the fruit-body *NL-55P*. A wild-type monokaryon grows rapidly with abundant aerial mycelium and is yellow or yellowish-white; whereas the mutant is slow-growing with scant aerial mycelium and is pure white without any trace of colour (Fig. 1). The combination, wild-type haplont $\times$ mutant monokaryon, yielded a dikaryotic hybrid mycelium which grew more rapidly with abundant aerial mycelium than the wild-type parent and was coloured (Fig. 1 and Takemaru, 1957a). It is clear that, in the hybrid dikaryon, fast growth, colouring, and luxuriant aerial mycelium of wild-type monokaryon are dominant over slow growth (*fa*), colourless (*c*), and reduced aerial mycelium (*ae*) of mutant monokaryon, respectively.

As shown in Table 3, each of these mutant genes, *c*, *fa*, and *ae*, segregates in 1:1 ratio with respective wild-type genes. Table 4 indicates that no linkage exists between the mutant genes and incompatibility factors.

The three mutant genes belong to the same linkage group, being arranged in order of *c-fa-ae*. The map distance between *c* and *fa* is $75/328=22.9$ units, and that between *fa* and *ae* $46/328=14.0$ units. Coefficient of coincidence is 0.76 (Table 5).

Wakayama (1932) has reported that the haploid number of chromosomes for *C. velutipes* is four, suggesting the existence of four linkage groups in the fungus. In the present study, three of the four linkage groups were detected (Fig. 2).

材料及び方法

エノキタケの二核性系統 *NL-55* 菌から発生した子実体 *55P* より、いくつかの単孢子培養を分離したところ、野生型のものに混って自然突然変異体が出現した。本系統の野生型菌糸体は、常用の馬鈴薯蔗糖寒天上において、豊富な気中菌糸を形成して、旺盛な生育を示し、程度の差はあるが、何れも黄色味を帯びている (Fig. 1, 左)。ところが、上述の変異体においては、

* Department of Biology, Faculty of Science, Okayama University, Okayama, Japan.

** 岡山大学理学部生物学教室 植物形態学業績 No. 58. 文科研論文, 課題番号 407097.

全く着色が行われていなく、また既に筆者 (Takemaru, 1957a) によって報告されたように、菌糸体の生長率が野生型のそれに比べて著るしく劣り、気中菌糸体の発生もひどく抑制されている (Fig. 1, 右)。

Fig. 1. Mycelia of *Collybia velutipes* growing on potato-sucrose agar slants. 9 days old (Natural size). Left: wild-type monokaryon 5. Right: spontaneous mutant monokaryon 9. Middle: hybrid dikaryon 5 x 9.

このような変異形質がどのような遺伝様式を示すか、更に、交配系を支配している2対の不和合性因子 A, B とどのような連鎖関係にあるかなどを調査するために、変異体 (単孢子系統 9) を野生型 (単孢子系統 5) に交配して、その F_1 を追求した。系統 5 と 9 は、それぞれ A^2B^1 及び A^1B^2 で表わされる交配型をもち、両者は互に和合することができる。両系統を同一の試験管内培養基上に植え付け、その結果形成された二核性雑種菌糸体 (Fig. 1, 中央) から、子実体 59 が発生するのを待って、総数 328 F_1 -単孢子培養を分離した。

単孢子分離は、いつものように稀釈平板法によった。なお、子実体形成の方法については、IV 報 (Takemaru, 1957b) を参照されたい。生長率の測定に関しては、III 報 (Takemaru,

1957a) に詳しく述べてあるが、この形質はかなりはっきりしたものであって、ペトリ皿による測定をまつまでもなく、単に試験管培養によるだけで、差を明確につかむことができた。使用培養基は常用の馬鈴薯蔗糖寒天、培養温度は 25°C である。

交 配 系

現在までに、帽菌類・腹菌類の約 230 種について、支配系の決定が行われているが、その 55 % は四極性を示している (Whitehouse, 1949)。一般に、四極性を示す交配系は、 A と B の 2 対の不和合性因子によって支配されていることは、周知の事実であるが、両因子の連鎖関係を分析した報告は極めて少い。これまでに筆者によって調査された範囲では、連鎖分析が行われた帽菌類は、Table 1 に示す数種にすぎない。この表から明かなように、これらの種に

Table 1. Linkage data for the two incompatibility factors, A and B , in certain tetrapolar species of Hymenomycetes

Species	Investigators	Parental combinations	Recombinations	Total
<i>Aleurodiscus polygonium</i>	Kniep (1922)	143~153	143~153	293
<i>Coprinus fimetarius</i>	Brunswik (1924)	87	98	185
<i>C. lagopus</i>	Mittwoch (1951)	217	220	437
<i>C. macrorrhizus</i> f. <i>microsporus</i>	Kimura (1952)	56	54	110
<i>Galera tenera</i>	Oikawa (1939)	164	140	304
<i>Schizophyllum commune</i>	Kniep (1922, '23)	46	45	91
" "	Papazian (1951)	111	104	215

Table 2. The independent inheritance of the incompatibility factors in *Collybia velutipes*

Fruit-body	Parental combinations	Recombinations	Total	χ^2 (for 1:1)	P
59 ($A^1B^2 \times A^2B^1$)	155	173	328	0.988	0.50~0.30

おいては何れも親型と組換型の出現頻度が 1:1 とみて差支えないと考えられるので、両因子はリンクしていないと云うことができよう。しかし、次にあげた数種においては、($A^1B^1 + A^2B^2$) と ($A^1B^2 + A^2B^1$) の出現頻度が 1:1 からひどく偏異している (確率 5%):

<i>Collybia tuberosa</i>	(14, 5)	(Harnack, 1931)
" "	(14, 3)	(Arnold, 1935)
<i>Coprinus auricomus</i>	(12, 3)	(Quintanilha, Quintanilha and Vasermanis, 1941)
<i>Pleurotus pinsitus</i>	(10, 2)	(Vandendries, 1934)
<i>Polystictus zonatus</i>	(21, 7)	(Vandendries and Brodie, 1933)

けれどもこの場合には、何れが親型で何れが組換型であるかが明らかでなく、分析された個体数も極めて少数であるため、両因子が或いはリンクしているのではないかと一応の疑いをもつことは許せるとしても、これを以て直ちに同一連鎖群に属すると云い切ることはできない。たゞ、*Collybia tuberosa* においては、偶然かも知れないが、二人の研究者が何れも、一つの型が他の型よりも多く出現する傾向を報告していることは、この菌における不和合性因子の連鎖関係に興味ある示唆を与えているものであろう。

さて、筆者は上述の 2 単胞子培養 5 (A^2B^1) と 9 (A^1B^2) の間で交配を行い、その結果形成された子実体 59 から、総計 328 の F_1 -単胞子培養を分離し、その交配型を分析したところ、Table 2 のような結果を得た。この表から明らかなように、エノキタケにおいては、不和合性因子 A と B の間には連鎖がみられない。

以上のように、これまで分析された種においては、何れも不和合性因子の間に連鎖が発見されなかった。菌類中で最も高等だと考えられている帽菌類において、このような事実がみられたことは、進化の面からみて興味深いものがある。というのは、Mather (1942) も指摘しているように、不和合性因子が 2 対存在するということだけでも、1 対の場合（即ち二極性、子囊菌に多い）と比べて、同一子実体からの胞子同士による和合組合せの頻度を減少させ（即ち、不和合性因子が 1 対の場合の inbreeding の頻度は 50%，2 対の場合は 25%），反対に outbreeding の機会を多くする結果となるわけであるが、更にこれらの 2 因子がリンクしていない時に、outbreeding が最も効率よく行われることが考えられるからである。

突然変異形質

i) 野生型×突然変異体の F_1 分析：単胞子培養 9 は上記のように、着色・生長などの点で欠陥のある自然突然変異体であるが、これを野生型系統 5 に交配すると、生じた二核性の雑種菌糸体は、野生型と同じように着色し、気中菌糸も豊富であり、特に生長率の点では野生型をしのいでいる (Fig. 1 及び Takemaru, 1957a)。このことは、変異体のもつこれらの諸形質が何れも劣性形質であることを示している。しかし、ここで注意しなければならないことは、われわれが問題にしている雑種菌糸体は、他の多くの生物にみられるような二倍体 ($2n$) ではなくして、実は二核体 ($n+n$) であるということである。一般に、帽菌類の有性生殖は、plasmogamy と karyogamy の時期が非常にずれているところに大きな特徴がある。Karyogamy が行われて、いわゆる $2n$ 核がみられるのは、胞子形成寸前の担子内部に限られる、ごく短い期間にすぎないのであって、それまでの長い栄養相は $n+n$ のいわゆる二核菌糸体である。しかしながら、Zattler (1924) が *Schizophyllum commune* の子実体形および *Collybia velutipes* の着色について、Macrae (1937) が *Panus stypticus* の発光性について、Quintanilha and Balle (1940) が *Coprinus fimetarius* の矮小菌糸体について、更に Nobles (1935) が *Peniophora Allescheri* の生長率およびコニディア形成について観察しているように、優性の発現には必ずしも 2 核の融合が必要ではなく、 $n+n$ で以て $2n$ と同じ効果を生ずることを述べている。

Table 3. Independent inheritances of the mutant genes, c , fa , and ae , with respective wild-type genes

	Colouration		Growth rate		Aerial mycelium	
	coloured +	colourless c	faster +	slower fa	luxuriant +	reduced ae
Numbers	157	171	162	166	168	160
Total	328		328		328	
χ^2 (for 1:1)	0.598		0.0488		0.195	
P	0.50~0.30		0.90~0.80		0.70~0.50	

さて、上記 5×9 の二核性雑種菌糸体により形成された子実体から分離された、328 個の F_1 -単胞子培養を用い、着色・生長率・気中菌糸体の 3 形質について調査したところ、Table 3

に表わされているように、何れの形質についてもそれぞれ 1:1 のメンデル分離を示し、これらの形質が、それぞれ *c*, *fa*, *ae* で表わされる劣性遺伝子によって支配されていることが明らかとなった。

エノキタケの色の遺伝については、上述のようにすでに Zattler (1924) が詳しい分析を行っていて、色の発現には *Rr* と *Vv* の 2 対の対立遺伝子が関与していることを報告している。なお、これらの遺伝子は何れも不和合性因子 *A*, *B* とはリンクしていないと云う。筆者の実験においても、*F*₁-菌糸体に濃淡いろいろの程度の着色がみられ、着色の強弱を支配するもう 1 対の対立遺伝子の存在を暗示しているが、詳しい分析は後にゆすり、今回はたゞ菌糸体に色がついているか否かということについてののみ分析し、色の濃さの程度は考慮に入れなかつた。また、生長率の遺伝については、上述の Nobles (1935) の *Peniophora Allescheri* に関する研究があり、気中菌糸体の遺伝については、Mittwoch (1951) の *Coprinus lagopus* に関する実験があるが、何れも筆者の場合と同じ結果が報告されている。

Table 4. Linkage data between mutant genes and incompatibility factors

Loci	Parental combinations	Recombinations	Total	χ^2 (for 1:1)	P
<i>c</i> , <i>A</i>	158	170	328	0.439	0.70~0.50
<i>c</i> , <i>B</i>	165	163	328	0.0122	0.95~0.90
<i>fa</i> , <i>A</i>	165	163	328	0.0122	0.95~0.90
<i>fa</i> , <i>B</i>	166	162	328	0.0488	0.90~0.80
<i>ae</i> , <i>A</i>	156	172	328	0.780	0.50~0.30
<i>ae</i> , <i>B</i>	169	159	328	0.305	0.70~0.50

Table 5. Linkage data for the three mutant genes (Three-point testcross)

Phenotypes of F ₁			Genotypes of F ₁			Number	Types
Colouration	Growth rate	Aerial mycelium					
coloured	faster	luxuriant	+	+	+	105	Parental types
colourless	slower	reduced	<i>c</i>	<i>fa</i>	<i>ae</i>	110	
coloured	slower	luxuriant	+	<i>fa</i>	+	5	Double crossovers
colourless	faster	reduced	<i>c</i>	+	<i>ae</i>	3	
coloured	slower	reduced	+	<i>fa</i>	<i>ae</i>	30	Crossovers in region I
colourless	faster	luxuriant	<i>c</i>	+	+	37	
coloured	faster	reduced	+	+	<i>ae</i>	17	Crossovers in region II
colourless	slower	luxuriant	<i>c</i>	<i>fa</i>	+	21	
Map distance between <i>c</i> and <i>fa</i> =22.9			Map distance between <i>c</i> and <i>ae</i> =32.0				
Map distance between <i>fa</i> and <i>ae</i> =14.0			Coefficient of coincidence= 0.76				

ii) 突然変異遺伝子と不和合性因子の連鎖分析：次にこれらの 3 遺伝子が不和合性因子とリンクしているかどうかを調査した。Table 4 はその結果を示したものであるが、この表から、*c*, *fa*, *ae* は何れも、*A* とともにまた *B* とともにリンクしていないことが明らかである。

iii) 3 突然変異遺伝子間の連鎖分析：次に *c*, *fa*, *ae* の間では、どのような連鎖関係があるかを調べた。その結果は Table 5 に示されている。この表から、これらの 3 遺伝子は同一の連鎖群に属していることが明らかである。*c*~*fa* 間の組換え価は $75/328=22.9\%$ 、*fa*~*ae* 間

では $46/328=14.0\%$, $c \sim ae$ 間では $105/328=32.0\%$ であるが、このことから、これら3遺伝子が $c-fa-ae$ の順序に排列していることが考えられる。なお、この際の一致係数は 0.76 であった。

連鎖群

エノキタケの細胞学的研究は、すでに Wakayama (1932) によって行われ、本菌の染色体数は $n=4$ と報告されている。このことは、本菌には4連鎖群が存在することを示唆している。

上記の筆者の実験から、不和合性因子 A と B とは互に別々の連鎖群に属し、また3突然

変異遺伝子 $c-fa-ae$ は同一の連鎖群内に排列していて、これらは A, B の何れともリンクしていないことが判明した。従って、いま A が乗っている連鎖群を I, B の属する群を II で表わすことにすれば、 $c-fa-ae$ は第三番目の連鎖群 III に属していることになる (Fig. 2)。

以上のように、4群考えられる連鎖群のうち3群について、多少の知見を得たわけであるが、第四番目の連鎖群については、今後の研究に待ちたい。

Literature cited

- Arnold, J.D. 1935. A comparative study of certain species of *Marasmius* and *Collybia* in culture. *Mycologia* 27: 388-417.
- Brunswik, H. 1924. Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetengattung *Coprinus*. Bot. Abhandl. (Goebel) 5: 1-152.
- Harnack, W. 1931. Die Entstehung des Paarkernmyzels bei *Collybia tuberosa* Bull. und *Schizophyllum commune* Fr. *Z. Bot.* 24: 353-380.
- Kimura, K. 1952. Studies on the sex of *Coprinus macrorhizus* Rea f. *microsporus* Hongô. I. Introductory experiments. *Biol. J. Okayama Univ.* 1: 72-79.
- Kniep, H. 1922. Über Geschlechtsbestimmung und Reduktionsteilung (Untersuchungen an Basidiomyzeten). *Verh. phys.-med. Ges. Würzburg* 47: 1-28.
- 1923. Über erbliche Änderungen von Geschlechtstfaktoren bei Pilzen. *Z. i. A. V.* 31: 170-183.
- Macrae, R. 1937. Infertility phenomena of the American and European forms of *Panus stypticus* (Bull.) Fries. *Nature* 139: 674.
- Mather, K. 1942. Heterothally as an out-breeding mechanism in fungi. *Nature* 149: 54.
- Mittwoch, U. 1951. Studies in the genetics of some X-ray-induced morphological mutants in *Coprinus lagopus*. *J. Genet.* 50: 202-205.
- Nobles, M.K. 1935. Conidial formation, mutation, and hybridization in *Peniophora Allescheri*. *Mycologia* 27: 286-301.
- Oikawa, K. 1939. Diploidisation and fruit-body formation in the Hymenomycetes. *Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ.* 14: 245-260.

- Papazian, H.P. 1951. The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* **36**: 441-459.
- Quintanilha, A. and S. Balle 1940. Étude génétique des phénomènes de nanisme chez les Hyménomycètes. *Bol. Soc. Broter. Sér. 2.* **14**: 17-46.
- , L. Quintanilha and A. Vasermanis 1941. La conduite sexuelle et la systématique des Hyménomycètes. *Rev. Mycol.* **6**: 3-48.
- Takemaru, T. 1957a. Genetics of *Collybia velutipes*, III. Growth rates of certain strains. *Biol. J. Okayama Univ.* **3**: 182-186.
- 1957b. Ditto., IV. "Interpolarity" occurring in the strain *NL-55* (in Japanese). *Bot. Mag. Tokyo* **70**: 238-243.
- Vandendries, R. 1931. La polarité sexuelles et le régime conidien chez *Pleurotus pinsitus*. *Bull. Soc. mycol. Fr.* **50**: 203-212.
- and H.J. Brodie 1933. Nouvelles investigations dans le domaine de la sexualité des Basidiomycètes et étude expérimentale des barrages sexuels. *Cellule* **42**: 165-210.
- Wakayama, K. 1932. Contributions to the cytology of fungi. IV. Chromosome number in Auto-basidiomycetes. *Cytologia* **3**: 260-284.
- Whitehouse, H.L.K. 1949. Multiple-allelomorph heterothallism in the fungi. *New Phytol.* **48**: 212-244.
- Zattler, F. 1924. Vererbungsstudien an Hutpilzen (Basidiomyzeten). *Z. Bot.* **16**: 433-499.