

〈論文〉

エリンギの交配系および不和合性因子の解析*

小島 靖・村上重幸**・松本晃幸**・福政幸隆**

The Mating System and Analysis of Incompatibility Factors in *Pleurotus eryngii*

Yasushi OBATAKE・Shigeyuki MURAKAMI**・Teruyuki MATSUMOTO** and Yukitaka FUKUMASA-NAKAI**

エリンギ (*Pleurotus eryngii*) の交雑育種を進めるうえでの基礎的知見を得るため、その交配系を解析し、不和合性因子の遺伝的構成を検証した。供試した2菌株とも、子実体から単孢子分離した一核菌糸体は四極性ヘテロタリズムを示し、不和合性因子構成は連鎖しないAおよびBの2つの因子からなることが確認された。交配型分析の結果、B因子については組換え株が出現し、B因子は4.5-7.4cMの遺伝的距離で連鎖する α および β の2つの遺伝子座により構成されたと考えられた。一方、A因子の組み換え株は出現せず、A因子は極めて近接した2つの遺伝子座により構成されたと推察された。

The genetic constitution of A and B incompatibility factors in the two test strains of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél was examined by linkage analysis. Mating tests using basidiospore progeny from each of those confirmed that the mating system of *P. eryngii* is tetrapolar with two A and B incompatibility factors. There was no linkage between the A and B incompatibility factors in *P. eryngii* similar to various tetrapolar basidiomycetous mushrooms. The B incompatibility factor recombinants were found among about 20 spore isolates of each strain on the test crosses. It was also demonstrated that the genetic distance between two subunits of the B incompatibility factor in this fungus, $B\alpha$ and $B\beta$, were varied between 4.5 and 7.4 cM on the two strains. On the other hand, any A recombinant was not found in mating tests of the two strains.

1. 緒言

担子菌類の交配系はホモタリズムとヘテロタリズムに大別され、ヘテロタリズムは生殖能を有するヘテロカリオン(一般には二核菌糸体)の生成に関する遺伝子構成、すなわち和合性一核菌糸体間での二核化を制御する不和合性因子が1対か2対かによって二極性と四極性に分けられる。四極性は2対の複対立遺伝因子であるAおよびB不和合性因子から成り、二核化におけるそれぞれの遺伝子構成ならびに役割が明らかにされている¹⁾。四極性の交配系を持つ担子菌きのこについては、ウシグソヒトヨタケ [*Coprinus cinereus* (Schaeff.: Fr.) S. F.]²⁾、スエヒロタケ [*Shizophyllum commune* Fr.:Fr.]³⁾、シイタケ [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]^{4,5)} など詳しく調べられ、AおよびB因子は両者とも2つのサブユニットA α とA β 、B α とB β から成ることが確認されている⁶⁾。エリンギ [*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél.] は四極性の

交配系を持つことが、Ratanatragooldacha et al.⁷⁾ によって報告されている。本論文ではこれを再確認し、エリンギの交配系と不和合性因子の遺伝学的構成について調べた結果について報告する。

2. 材料および方法

2.1 菌株

実験に用いた菌株は、鳥取県内で商業的に栽培されているエリンギ菌株の子実体から組織分離した二核菌糸体株TMIC-2 (不和合性因子構成: A1B1+A2B2)、および森林総合研究所九州支所の根田 仁博士がチェコから入手したドイツ原産エリンギ二核菌糸体株 (Germany、不和合性因子構成: A3B3+A4B4) の2菌株である。

2.1 単孢子分離

子実体形成のため、上記の二核菌糸体株をブナ木粉・米ぬか培地 [ブナ (*Fagus crenata* Blume) 木粉: 米ぬ

* : 本研究は農林水産省委託事業「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」によるものである。

** : 財団法人日本きのこセンター菌茸研究所

** : Tottori Mycological Institute

か=3:1(容積比)、含水率65%]で培養した。培養には200mlポリプロピレン製容器を用い、培地を約120g詰め、121°Cで15分間殺菌した。放冷後接種した栽培ピンは、23°C暗黒下で40日間培養した後、培地上部の掻き取りと注水による発生処理を行い、温度15-20°C、相対湿度90±5%の部屋に移し、子実体の発生を促した。成熟子実体からヒダの一部を切り取り、滅菌シャーレの蓋の内側に張り付け一夜放置し、胞子紋を得た。その胞子紋を滅菌水に懸濁し、適当な濃度に希釈した懸濁液100 μ lをMA寒天培地(麦芽エキス20g、寒天20g、蒸留水1000ml)を10ml入れたシャーレ平板培地に塗布した。25°C暗黒下で3-5日間培養した後、発芽してきた菌糸体をつり上げ、新しいMAシャーレ平板培地に移植した。更に25°C暗黒下で、5-7日間培養し、顕微鏡下でクランプ結合の有無により一核菌糸体であることを確認した後、それらをMA斜面培地で維持した。

2.3 交配系分析

2つの菌株から無作為に得たそれぞれの一核菌糸体20系統を用いて、それらをMAシャーレ平板培地上にて総当たり組み合わせで交配した。交配には同平板培地に菌糸体片を約2mm離して接種し、25°C暗黒下で7-10日間培養した。新たに生長したコロニーの両端および接触部を顕微鏡下で観察し、その全ての部位においてクランプ形成が確認できたものを和合性組み合わせとし、一核菌糸体の交配型を決定した。この中から、異なる交配型を持つ4つのテスター株をそれぞれ選定し、それらとの交配の可否により残りの一核菌糸体すべての不和合性因子を決定した。

3. 結果および考察

表1にエリンギ2菌株から単胞子分離した一核菌糸体20系統を総当たり交配した結果を示す。この表から明らかのように、両菌株とも四極性の交配様式を示した。和合性組み合わせでは、両一核菌糸体のコロニー全体にクランプ結合の形成がみられた。B因子共通組み合わせでは、両一核菌糸体コロニーの接触部において部分的に偽クランプの形成がみられたが、バラージ反応は不明瞭であった。Germany株では、A因子が異なりB因子が共通であるB因子共通組み合わせでも、一核菌糸体の組み合わせによって、接触部の偽クランプ結合が確認できない場合が多かった。一方、両菌株ともA因子共通組み合わせではフラット反応はみられなかった。また、TMIC-2株では、A1B1およびA1B2の交配型テスターと和合できる一核菌糸体、あるいはA2B1およびA2B2の交配型テスタ

ーと和合できる一核菌糸体がそれぞれ1系統ずつ現われた。Germany株でも同様に、A4B3およびA4B4の交配型テスターと和合できる一核菌糸体が1系統現われた。

TMIC-2株においてはA1B1、A1B2、A2B1およびA2B2の交配型を有する一核菌糸体を、Germany株においてはA3B3、A3B4、A4B3およびA4B4の交配型を有する一核菌糸体を交配型テスターとし、これらを残りの一核菌糸体、それぞれ490系統および293系統と交配した結果を表2に示した。それぞれの4交配型A1B1:A1B2:A2B1:A2B2およびA3B3:A3B4:A4B3:A4B4はそれぞれ1:1:1:1に分離した。また、AおよびB因子の分離比はどちらも1:1に分離し、それらは別々の染色体に座乗していることが示された。

一方、両菌株ともA因子は共通でB因子の異なる2つのテスター(A1B1とA1B2、A2B1とA2B2、およびA3B3とA3B4、A4B3とA4B4)と交配可能な新たなB因子、すなわちB因子の組み換え型(Brec)が現われ、組み換え率はTMIC-2株が4.5%、Germany株が7.4%であった。しかし、どちらの菌株においてもA因子の組み換え型は出現しなかった。

次に、B因子の遺伝子座構成を検証するため、TMIC-2株由来のB因子組み換え型一核菌糸体(A1BrecおよびA2Brec)22系統を総当たり交配した。この結果を表2(a)に示すように、A1BrecとA2Brecはそれぞれ2つの交配型グループに分れ、B因子は2遺伝子座(α および β)から成ると考えられた。これは、元のB因子、B1[B(α 1, β 1)]およびB2[B(α 2, β 2)]が減数分裂にともなう組み換えの結果、Brec1[B(α 1, β 2)]およびBrec2[B(α 2, β 1)]が出現したと考えられる。同様に、表2(b)に示すようにGermany株においても、A3BrecとA4Brecそれぞれ2つのグループに分れ、B3[B(α 3, β 3)]およびB4[B(α 4, β 4)]が組み換えにより、Brec3[B(α 3, β 4)]およびBrec4[B(α 4, β 3)]になったと考えられる。

さらに、B不和合性因子の2遺伝子座構成を検証するため、以下の実験を行った。TMIC-2株由来のB因子組み換え型一核菌糸体を和合性組み合わせ、A1Brec1(α 1, β 2)(No.4)とA2Brec2(α 2, β 1)(No.2)を交配し、得られた二核菌糸体を子実体形成させ、107個の単胞子分離一核菌糸体を得た。これら107系統をTMIC-2株の4交配型テスター一核菌糸体(A1B1、A1B2、A2B1およびA2B2)と交配したところ、B1あるいはB2因子を持つ4つの交配型テスターとB因子共通交配となる新たな交配型が出現した(表3)。これらは、Brec1[B(α 1, β 2)]およびBrec2[B(α 2, β 1)]が組み換えしたこ

表1 エリンギの単孢子分離一核菌糸体総当たり交配結果

Table 1. Results of pairings among 20 monokaryotic isolates of *Pleurotus eryngii*, TMIC-2 (a) and Germany(b)

(a) TMIC-2

	A1B1					A1B2								A2B1			A2B2			A1Brec	A2Brec
	5	11	13	14	21	1	6	7	10	12	16	18	8	15	17	3	19	20	4	2	
A1B1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	
A1B2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	+	
A2B1	8	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
	15	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
	17	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
A2B2	3	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	
	19	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	
	20	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	
A1Brec	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+		
A2Brec	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	

(b) Germany

	A3B3						A3B4						A4B3					A4B4		A3Brec	
	2	7	13	16	18	20	1	8	9	10	15	17	3	4	12	14	19	6	11	5	
A3B3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	+	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
A3B4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	
3A4B	3	-	-	(+)	-	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	4	(+)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	14	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
A4B4	19	(+)	-	-	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
A3Brec	11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

+ : 二核化、(+) コロニー接触部のみ為クランプをもつヘテロカリオンが出現。

- : クランプ結合なし。

+ : dikaryotization, (+) contact zone heterokaryotization with pseudoclamp connections.

- : no clamp connection

表2 不和合性因子の分離比と組み換え型の出現

Table 2. Segregation analysis and occurrence of recombinant of the incompatibility factor in *Pleurotus eryngii*, TMIC-2 (A1B1+A2B2) and Germany (A3B3+A4B4)

(a) TMIC-2

	B因子 ^a Original B factor ^a		B因子組み換え型 ^b Recombinant ^b	
	B1 ($\alpha 1\beta 1$)	B2 ($\alpha 2\beta 2$)	Brec1 ($\alpha 1\beta 2$)	Brec2 ($\alpha 2\beta 1$)
A因子 A1	105	131	7	3
A factor A2	105	131	3	9
組み換え型 Recombinant	0	0		

494株、A total of 494 isolates. A1B1:A1B2:A2B1:A2B2, $\chi^2(1:1:1:1)=2.484$, $P=0.50-0.30$.

A1:A2=246:248, $\chi^2(1:1)=0.008$, $P=0.95-0.90$. B1:B2=210:262, $\chi^2(1:1)=0.077$, $P=0.90-0.80$.

B因子組み換え価 $22/494 \times 100=4.45\%$ 、Recombination value of B factor $22/494 \times 100=4.45\%$

^a α と β はB因子を構成する2つのサブユニットを表す。

^a α and β show two subunits which constitute B incompatible factor.

^bBrecはB不和合性因子の組み換えを表す。^bBrec shows recombination of B incompatible factor.

(b) Germany

	B因子 ^a Original B factor ^a		B因子組み換え型 ^b Recombinant ^b	
	B3 ($\alpha 3\beta 3$)	B4 ($\alpha 4\beta 4$)	Brec3 ($\alpha 3\beta 4$)	Brec4 ($\alpha 4\beta 3$)
A因子 A3	54	77	3	6
A factor A4	75	69	7	6
組み換え型 Recombinant	0	0		

297株、A total of 297 isolates. A3B3:A3B4:A4B3:A4B4, $\chi^2(1:1:1:1)=6.00$, $P=0.20-0.10$.

A3:A4=140:157, $\chi^2(1:1)=0.973$, $P=0.50-0.30$. B3:B4=129:146, $\chi^2(1:1)=1.051$, $P=0.30-0.20$.

B因子組み換え価 $22/297 \times 100=7.41\%$ 、Recombination value of B factor $22/297 \times 100=7.41\%$

表3 TMIC-2株由来B因子組み換え型一核菌糸体と合組み合わせ子実体より単胞子分離

Table 3. Segregation analysis of spore progenies derived from the cross A1Brec1($\alpha 1\beta 2$) \times A2Brec2($\alpha 2\beta 1$) between B incompatibility factor recombinant monokaryons isolated from TMIC-2

	B因子組み換え型 ^b Recombinant B factor ^b		B因子 ^a Original B factor ^a	
	Brec1 ($\alpha 1\beta 2$)	Brec2 ($\alpha 2\beta 1$)	B1 ($\alpha 1\beta 1$)	B2 ($\alpha 2\beta 2$)
A因子 A1	24	25	1	2
A factor A2	23	23	1	3
組み換え型 Recombinant	0	0		

102株 A total of 102 isolates.

B因子組み換え価 $7/102 \times 100=6.86\%$ Recombination value of B factor $7/102 \times 100=6.86\%$

a、bは表2をみよ。For a and b, see Table 2.

とにより、元のB1 [$B(\alpha 1, \beta 1)$] およびB2 [$B(\alpha 2, \beta 2)$] が出現したと考えられる。このときの組み換え価は6.9%であった。以上のことから、B因子は遺伝的距離が約6.2cM離れた2遺伝子座 α および β により構成されることが示された。Ratanatragoldacha et al.⁷⁾ はヒラタケ属の*P. cornucopiae*、*P. citrinopileatus*、エリンギ、ヒラタケおよびヒマラヤヒラタケの5種について、不和合性因子の遺伝的構成を連鎖分析によって調べた。このなかでエリンギのB因子は4.19cM離れた α および β から成ると報告している。今回得られた結果は、この値に近似するものである。一方、A因子については組み換え型は検出されず、エリンギのA不和合性因子はヒラタケ⁸⁾ あるいは他のヒラタケ属⁷⁾ と同様に、極めて近接した遺伝子座によって構成されていると推察される。

引用文献

- 1) Raper, J. R.: Genetics of sexuality in higher fungi. The Ronald Press Co. New York, 1966
- 2) Casselton, L. A. and Kues, U.: Mating-type gene in homobasidiomycetes. In: The Mycota, Vol. I. Growth, differentiation and development. (ed By Wessels, J. G. H., Meinhardt, F.) , pp. 307-321. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994
- 3) Frankel, C. and Ellingboe, A. H.: New mutations and a 7-chromosome linkage map of *Shizophyllum commune*. *Genetics* **85**, 417-426 (1977)
- 4) Ratanatragoldacha, S., Mihara, H., Mori, N. and Kitamoto, Y.: Production of A and B incompatibility factor recombinants of *Lentinula edodes* by sexual reproduction. *Mushroom Sci. & Biotech.* **9**, 181-186 (2001)
- 5) 武丸恒雄: 菌類の遺伝学的研究 9. シイタケの交配系. 菌蕈研報. **1**, 61-68 (1961)
- 6) Koltin, Y., Stamberg, J., and Lemke, P. A.: Genetic structure and evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriol. Rev.* **36**, 156-171 (1972)
- 7) Ratanatragoldacha, S., Ishii, K., Mori, N. and Kitamoto, Y.: Linkage analysis of incompatibility factor constitutions in various *Pleurotus* mushrooms. *Mushroom Sci. & Biotech.* **9**, 121-125 (1994)
- 8) Eugenio, C. P. and Anderson, N. A.: The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*. **60**, 627-634 (1968)

(2003年11月26日受理)