

[J. Ferment. Technol., Vol. 46, No. 5, p. 347~355, 1968]

Saccharomycodes ludwigii の単孢子培養株について

(第 1 報) 孢子形成能ならびに相互凝集性

小原 巖・野々村 英夫・山崎 豊彦

(山梨大学工学部発酵生産学教室)

Studies on the Single-spore Cultures of
Saccharomycodes ludwigii Hansen(I) The Homozygous Sporulation and the Heterothallic
Agglutination

Yuwao Ohara, Hideo Nonomura and Toyohiko Yamazaki

(Department of Food Technology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu)

Ascospore tetrads were isolated from the yeast, *Saccharomycodes ludwigii* Hansen by micromanipulation. It was found that each of the 4 single-spores isolated from an ascus was viable, except some asci in one parental strain (I), of which 2 out of the 4 single-spore isolates lost their viability. Almost all clones obtained from the 4 parental strains (I-IV) sporulated singly during the period of F_1 to F_3 , but the amount of spores produced was generally small except heterozygous clones.

An intensive mutual agglutination was observed in certain combinations of the crossing of the clones (F_1) derived from the parental strain I and/or II. Some clones of the strain I did not agglutinate with any other clones at the stage of F_1 , but they segregated to have their opposite types of agglutination by further single-spore isolation, i.e. F_2 . The crossing between vegetative cells with agglutination types opposing each other resulted in production of a few heterozygous hybrids, (not agglutinative) but highly sporiferous. The results suggested that these mutually agglutinative reactions in *S. ludwigii* might be a heterothallic character of the clones. These reaction may possibly be comparable with the mating types, concealed mating types of [unbalanced homothallic strains and sexual agglutination in *Saccharomyces*.

In the meanwhile, a self-agglutination was observed in the clones of the other parents (III and IV).

緒 言

Saccharomycodes ludwigii は子嚢孢子 (以下単に孢子とする) が 2 個ずつ対立しており, その対立孢子が接合 (conjugate) したのち発芽増殖し再び子嚢を形成するようになる¹⁾. Winge ら²⁾ は, この対立孢子を単孢子培養した結果, それらは 2 組の対立遺伝子を持つ半数体であり対立孢子の接合によってのみ二倍体化する異型接

合型 (heterozygous) であるとした。また Hjort³⁾ は孢子の発芽形式や単孢子培養株の孢子形成能などについて検討した結果、その単孢子培養株には単孢子の発芽増殖の際、自己二倍体化 (intra-cellular self-diploidization) して孢子を形成する同型接合型クローン (homozygous clones) の存在を報告している。

著者らは *Sd. ludwigii* に同定された2菌株⁴⁾の超音波または熱処理法により得た単孢子培養株の未接合クローンが孢子を造ることを発見したが、これらの方法では既に接合した孢子が混入する恐れがあるため顕微解剖器を使用し、単孢子培養を行ない Winge ら¹⁾ および Hjort³⁾ の説を追試するとともに、Hjort³⁾ は *Sd. ludwigii* と *Sd. ludwigii* var. *bisporus* との間には交雑 (hybridization) が認められなかったとしているが、著者らの供試クローンには親株を異にする特定のクローン間でも相互に凝集し、接合像 (copulation figure) とみられる細胞を造り一種の交雑に類する異型接合的性質のあることがわかった。さらにクローンによっては F₁ で相互に凝集しないものもあり、このようなクローン間での相互凝集性は *Saccharomyces* 属の接合型 (heterothallic mating types) あるいは不平衡ホモトリック系統の潜在接合型⁵⁾, Wickerham⁶⁾ の凝集反応 (sexual agglutination) などと関連する酵母の性的反応と考えられ、なお未解決の問題を残しているが、とりあえず今までの実験結果を報告する。

供試菌株および使用培地

1. 供試菌株 親株として使用した *Sd. ludwigii* の4株 (Table 1) のうち、2株 (I, II) はブドウ酒醗より分離同定されたもの⁴⁾ のうち典型的に4孢子子嚢を多数形成するものであり、他の2株 (III, IV) は菌株保存機関 (OUT, IFO) より分譲されたものである。

Table 1. Parent strains of *Saccharomyces ludwigii* Hansen used.

(Medium: Malt extract. Storage temp. 4°C. Transfer interval: 3 months)

Strain No.	Remarks*
I	O-17 Ohara <i>et al.</i> , 1962 } These had been isolated from Japanese O-81 Ohara <i>et al.</i> , 1964 } grape musts with a synthetic medium.**
II	
III	OUT-6282←AHU-3175 (F. Hemmi 453), was received in 1967.
IV	IFO-1043←OUT-6274←YCC (H. J. Phaff) C-114, was received in 1967.

* OUT: Faculty of Engineering, Osaka Univ., IFO: Institute for Fermentation, Osaka. AHU: Faculty of Agri., Hokkaido Univ., YCC: Yeast cultures collection, Dept. of Food Tech. Univ. of California. The arrow shows how a culture had derived from.

** Modified Wickerham's synthetic agar medium containing 1g/l L-lysine-HCl as the sole source of nitrogen⁴⁾.

2. 使用培地 麦芽汁および麦芽寒天は菌株の保存と増殖を目的とする場合に使用し、孢子形成用としては McClary ら⁷⁾ の培地を改変したもの (Table 2), Fowell 培地⁸⁾ および Lodder ら⁹⁾ の培地8種 (Table 5) 合計10種類を使用した。

実験方法

1. 孢子形成率の測定 麦芽寒天斜面培地に30℃3日間、前培養した供試菌をできるだけ過不足のないよう1白金耳量とり、各種孢子形成用培地に接種し、25℃7日間培養した。適当量の水 (蒸留水または N/10 KOH) により、菌体を洗い出したものをスライドグラスにとり、顕微鏡 (400倍) の一視

Table 2. Preparation of potassium acetate agar (KAA) and sodium acetate agar (NAA) media*.

	KAA	NAA
Na-acetate (anhydrous)	—g	8.2g
K-acetate	9.8	—
Glucose	10.0	10.0
Yeast extract (Difco)	2.5	2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7	0.7
KCl	1.9	1.9
Dist. water (ml)	1,000	1,000
Agar	20	20

* After McClary *et al.* except glucose concentration, MgSO₄·7H₂O, and KCl.

野に約100~150個の細胞が見える程度に希釈し、細胞1000個中の子囊数を2回計測し、その平均を求め、小数点以下は四捨五入し孢子形成率(%)を算出したが1%以下の場合は評語をもって表わした。

2. 単胞子の分離法 De Fonbrune 型の顕微解剖器を使用した。Cox ら¹⁰⁾ は *Saccharomyces* 属の単胞子分離に微小環とセロファン片を使用し、子囊を破壊する前に前培養している。しかし著者らは子囊破壊前に前培養すれば孢子壁の軟化および粘着性の増加ならびに単胞子分離以前に二倍体化する危険があるので、供試菌を KAA 培地より麦芽汁に懸濁したのちできるだけ早く単胞子を分離するようにした。すなわちカバーガラス (24×32mm) に麦芽寒天 (4%) の膜を造り、その上にセロファン片 (複写用ユニセロファン, 5×12mm を4等分に鉄を入れた) を貼りつけ、このカバーガラスを Lindegren¹¹⁾ の湿室上に逆置し麦芽汁に懸濁した供試菌の子囊を30~60分間以内に微小針を使用して破壊 (倍率400) したのち対立孢子 (S_1-S_2 , S_3-S_4) を1個ずつ分離し、そのままセロファン上で発芽増殖させた。クロンには子囊および孢子番号をつけ (例 IA_1S_1)、*Blg.* 5° の麦芽汁にとり25℃に2日間培養し、4℃に保存して3カ月ごとに植え代えた。

3. 凝集性の判定方法 あらかじめ麦芽寒天斜面培地に30℃, 3~4日間培養した供試菌2株を、それぞれ生理食塩水 (0.85%) に懸濁した (約 1×10^{10} /ml 細胞) のち、その1滴ずつをスライドグラス上で混合し、直ちに懸濁液が凝集するか否かを肉眼的に観察して凝集性の有無を判定した (Fig. 1)。なお、相互凝集性を示す代表的2クロン $IIA_{11}S_1$ と $IIA_{11}S_2$ の凝集型をそれぞれXおよびY型とし、 $IIA_{11}S_1$ と相互凝集性を示すものをY型、 $IIA_{11}S_2$ と凝集するものをX型、そのいずれとも凝集しないものをZ型とした。

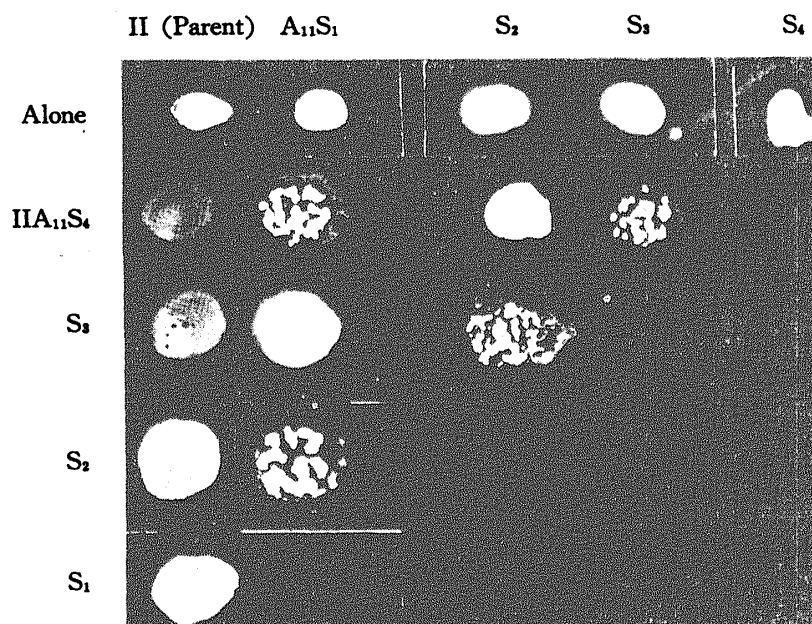


Fig. 1. Occurrence of intrasolate agglutination on a slide glass. Agglutinations occurring in mixed cell suspensions (one drop contained 1×10^{10} cells per ml) of each clones of $IIA_{11}S_1+S_4$, S_1+S_2 , S_2+S_3 , and S_3+S_4 .

4. クロンの接合試験 相互凝集性を示す (X, Y型) 代表菌株として選択した $IIA_{11}S_1$ と $IIA_{11}S_2$ を麦芽汁に30℃, 2日間振とう培養したのち、蒸留水で2回洗浄し、生理食塩水を加え菌数を初めの濃度 (約 1×10^8 /ml) とし Brock¹²⁾ の方法に従って両菌株を接合させた。その際0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ の代りに 0.85% NaCl を、また Lindegren¹¹⁾ の接合培地に0.85% NaCl を加えたものを使用した。接合後 (相互凝集を起す) 蒸留水で3回洗浄し (蒸留水中では凝集しない) 接合像 (Fig. 2) を確認した。つぎに顕微解剖器を使用して接合子と思われるものを単胞子分離の場合と同様にして分離培養し、前記と同様にしてそれらの孢子形成率を計測し相互凝集性を判定した。

実験結果および考察

1. 親株の胞子形成試験 細胞が、大きく健全な4胞子子嚢を多数、より早く形成し、しかも常時簡単に調製できる胞子形成培地を選択するため、供試親株 I～IV の各種培地における胞子形成率を比較した結果、Table 3 に示したように親株 I, II の4胞子子嚢の形成率は VA 培地においてとくに高い値を示し、還元分裂異常による不完全子嚢の形成は最も少ないが、全体としての胞子形成率は KAA 培地の方がはるかに良いので、KAA 培地を最適培地として選択した。ただし McClary ら⁷⁾の培地はブドウ糖の濃度を 1 g/l としているが 10 g/l としたときも胞子形成率および4胞子子嚢形成率共にほとんど差がなかった。しかし Table 4 に示したように菌体量は低糖濃度の場合の5～6倍に達するので KAA 培地の糖濃度は 10 g/l として使用した。なお、酵母の胞子形成に及ぼす外的条件として、前培養、温度および培地の pH などの影響が考えられるが、それらについては別に考慮しなかった。

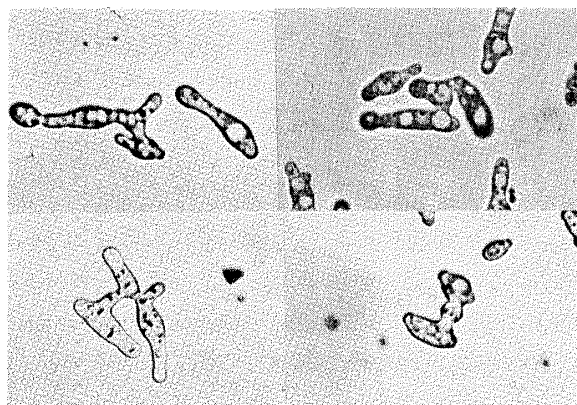


Fig. 2. Conjugation and zygote-like cells formation by a couple of the single-spore cultures (IIA₁₁S₁ + IIA₁₁S₂) in Lindegren's medium containing 0.85% of NaCl after 6 hours at 30°C.

Table 3. Sporulation of 4 parental strains on different media* used. (After 7 days at 25°C)

Parent strain	No. of asci found per 1,000 cells on**					Ratio (%) of 4-spored asci to total asci found on				
	KAA	NAA	GA	FA	VA	KAA	NAA	GA	FA	VA
I	100	37	15	33	31	67	76	65	68	93
II	575	232	420	113	221	89	77	71	87	94
III	147	R	S	0	13	80	—	—	—	63
IV	110	S	11	S	11	82	—	50	—	79

* KAA; NAA: See Table 2. GA: Gorodkova agar. FA: Fowell agar. VA: V-8 agar.

** 0: No ascus. R: Rare (one ascus per several fields). S: Scarcely one ascus per 1,000 cells.

2. 単胞子の発芽増殖 (致死因子の存在) 親株 I～IV の各10個の子嚢から Table 6 に示した合計133株の単胞子培養株 (F₁) を得た。親株 I の子嚢10個のうち5個より分離した各4個の胞子 (20個) は Winge ら¹⁾の報告しているように発芽したのち対症的に半数は増殖の途中で死滅してしまった。しかし別の5個の子嚢より分離した20個の胞子のうち2個の子嚢から得られた2個の胞子 (IA₄S₂, IA₁₄S₂) は発芽増殖しなかったが、その他の18個はすべて発芽増殖した (Table 6a)。また親株 II, III, IV の子嚢より分離した各4胞子のうち1個だけが発芽したのち増殖しないものがあったが、4個のうち対症的に2個が増殖できなかったものはない (Table 6b, c) ので、それらは致死因子 (n)

Table 4. Sporulation of parental strain I on KAA medium of different concentration of glucose. (After 7 days at 25°C)

Glucose	No. of asci found per 1,000 cells*	Ratio of 4-spored asci to total asci	Growth**
g/l		%	
1	114	79	24
10	120	75	172
50	S	—	290

* See Table 3.

** Absorbance at 480 mμ of the suspension (Mature cells on the medium were suspended in 10 ml of distilled water)

により死滅したものととは考えられない。すなわち親株 I では n 因子の存在すると思われるものが約半数あり、あとの半数は下記のごとく親株が培数体であると考えられるので F_1 での 4 分子解析の結果だけで n 因子の存否を判定することはできなかった。また II, III, IV の場合には n 因子は存在していなかったと考えられる。 n 因子欠損の原因は主として Winge ら¹⁾ のように突然変異 ($n \rightarrow N$) によるものと考えられるが、その頻度が高いことから致死因子を含まない孢子が単独に発芽し自己二倍体化したものや親株が培数体であり、二倍体の孢子を形成し、それが単独に発芽したものなどが含まれていることも考えられる。

Table 5. Sporulation of the representative 14 single spore cultures on different media used.
(After 7 days at 25°C)

Medium*	No. of cells with asci per 1,000 cells of**														No. of cultures		Percentage of cells with asci (range)
	IA ₄		IIA ₁₀				IIIA ₁₄				IVA ₈				produc- ing asci	with 10% or more asci	
	S ₁	S ₃	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄			
KAA	27	28	12	65	13	117	31	21	26	27	225	192	67	62	14	3	1.2-22.5
NAA	R	S	3	20	5	25	0	R	0	R	R	S	R	R	12	0	R- 2.5
GA	39	42	R	120	S	110	0	0	0	R	7	4	S	S	11	2	R-12.0
FA	0	3	0	10	0	8	0	0	0	0	S	S	0	0	5	0	0- 1.0
VA	25	22	6	36	5	22	7	S	5	S	8	16	10	13	14	0	S- 3.6
PP	19	8	0	32	0	34	S	20	S	S	79	53	25	35	12	0	0- 7.9
CP	0	0	S	11	0	14	0	0	0	0	R	R	0	0	5	0	0- 1.4
GB	R	8	R	33	R	38	0	0	0	0	30	8	R	S	10	0	0- 3.8

* PP: Potato plugs, CP: Carrot plugs, GB: Gypsum blocks. For other abbreviations see Table 3.

** See Table 3.

3. 単孢子培養株 (クローン) の性質

A. 孢子形成率 親株と同様に任意の 14 クローン (F_1) について孢子形成率を比較した結果、Table 5 のようにクローンおよび培地別に孢子形成率に大差のあることを知ったが、平均して KAA 培地が孢子形成能を早期に適確に判定し得る培地であることが分かった。したがって KAA 培地を使用し全クローン (F_1) について孢子形成率を求めた結果 Table 6 に示したように IVA₂₄S₃ および IVA₂₄S₄ の 2 株を除くほかいずれのクローンも 1 週間以内に孢子を形成したが、大部分のものは稀に子嚢が発見される (細胞 1000 個中 1 個ないし数個) 程度であり、多くても 5% 以下の形成率であった。すなわち I, IV の数クローンを除き親株の孢子形成率よりかなり低い値を示すことを確認した。また I, II では対立孢子のクローンについて孢子形成率を比較すると、ある程度 S₁ と S₃ が高いときは S₂ と S₄ は低いというような差異が認められるが、III, IV ではほとんどそのような差異は認められなかった。なお I および IV の単孢子培養を第 3 代目 (F_3) まで繰り返して行ない、孢子形成能を調べたが Table 7 のように大部分のクローンは単独で孢子を形成するので、供試クローンの孢子形成は親株 I では倍数性と自己二倍体化により、また II, III, IV では自己二倍体化によるものと考えられる (Table 7, 9)。

B. 相互凝集性 親株 I のクローン (F_1) には孢子形成率が低く相互凝集性を示す X, Y 型および凝集性を示さず孢子形成率の高い (低いものもある。例 IA₅S₂) Z 型があり、供試クローンの X:Y:Z は、 n 因子により凝集型が不明のものもあり供試クローン数が少ないので真の分離比は不明であるが、Table 8 のようになる。この孢子形成率の高い Z 型クローン (F_1) 2 株をさらに単孢子培養して得たクローン (F_2) について孢子形成率および凝集性について試験した結果は Table 9 のように、いずれも孢子形成率の低い X および Y 型に分離され、Z 型は出現しなかった (X:Y:Z=2:2:0)。したがって親株 I は少なくとも三倍体以上の培数体であると考えられる。ただしすべての Z 型 (とくに孢子形成率の低いもの) がこのように分離するかどうかはなお検討しなければならない。

親株 II の全クローンは相互に必ず凝集性を示し (Z 型がない)、4 分子解析の結果 X:Y=2:2 となり F_1 で形質の分離が明らかに現われているので、II は二倍体と考えられる。

Table 6a. Sporulation and agglutination types of the single-spore cultures of strain I.
(10 asci with 4 spores were dissected, 28 cultures resulted)

Clone*	Sporulation**	Type***	Clone	Sporulation	Type	Clone	Sporulation	Type	Clone	Sporulation	Type
	%			%			%			%	
I(Parent) 10		Z									
A ₁ S ₁	+	?	A ₅ S ₃	+	?	A ₈ S ₁	<1	X	A ₁₄ S ₃	—	(?)
S ₂	<1	Y	S ₄	S	Z	S ₂	S	Z	S ₄	S	X
S ₃	+	?	A ₆ S ₁	4	X	S ₃	4	X	A ₁₈ S ₁	26	Z
S ₄	<1	Y	S ₂	S	Z	S ₄	S	Z	S ₂	+	?
A ₄ S ₁	3	X	S ₃	—	(X)	A ₉ S ₁	4	X	S ₃	33	Z
S ₂	+	?	S ₄	S	Z	S ₂	S	Z	S ₄	+	?
S ₃	3	X	A ₇ S ₁	13	Z	S ₃	4	X	A ₁₉ S ₁	28	Z
S ₄	+	?	S ₂	+	?	S ₄	S	Z	S ₂	S	X
A ₅ S ₁	+	?	S ₃	32	Z	A ₁₄ S ₁	2	X	S ₃	26	Z
S ₂	S	Z	S ₄	+	?	S ₂	S	Z	S ₄	S	X

* Clones representing from 4 single spores of each ascus are prefixed by A_nS₁, S₂, S₃, and S₄. Every two pairs of the spores (S₁:S₂ and S₃:S₄) in the ascus are adherent.

** +: Germination was observed, but failing to grow. -: No germination (not viable). <1: Very few asci. For other abbreviations see Table 3.

*** X, Y: Agglutinate with IIA₁₁S₂, Y, and IIA₁₁S₁, X, respectively. Z: No agglutination. ?: Unable to assume. Assumed appropriate types are given in parenthesis.

Table 6b. Sporulation and agglutination types of the single-spore cultures of strain II.
(10 asci with 4 spores were dissected, 35 cultures resulted)

Clone*	Sporulation**	Type***	Clone	Sporulation	Type	Clone	Sporulation	Type
	%			%			%	
II (Parent) 58%		Z						
A ₁ S ₁	2	X	A ₇ S ₂	9	Y	A ₁₀ S ₃	1	X
S ₂	3	Y	S ₃	—	(X)	S ₄	12	Y
S ₃	2	X	S ₄	<1	Y	A ₁₁ S ₁	3	X
S ₄	—	(Y)	A ₈ S ₁	S	X	S ₂	R	Y
A ₂ S ₁	S	X	S ₂	12	Y	S ₃	R	X
S ₂	R	Y	S ₃	S	X	S ₄	<1	Y
S ₃	S	X	S ₄	—	(Y)	A ₁₂ S ₁	S	X
S ₄	—	(Y)	A ₉ S ₁	S	X	S ₂	8	Y
A ₆ S ₁	S	X	S ₂	S	Y	S ₃	S	X
S ₂	S	Y	S ₃	S	X	S ₄	4	Y
S ₃	—	(X)	S ₄	4	Y	A ₁₅ S ₁	R	X
S ₄	S	Y	A ₁₀ S ₁	1	X	S ₂	R	Y
A ₇ S ₁	<1	X	S ₂	7	Y	S ₃	3	X
						S ₄	S	Y

*, **, *** See Table 6a.

親株Ⅲ, Ⅳのクローンは自己凝集性があり相互凝集性を示すものか否かの判定ができなかった。

C. 接合試験 X型およびY型の代表株とした2株 (IIA₁₁S₁ と IIA₁₁S₂) を混合し2細胞の接合子とみられる単細胞培養株33株の胞子形成率と相互凝集性をみた。その結果は Table 10 のように凝集性を示さず、親株Ⅱに近い胞子形成率を示したものが4株得られた。ただし大部分はX型(20株)とY型(9株)であり、それら

Table 6c. Sporulation and agglutination types of the single-spore cultures of strain III and IV.
(20 asci with 4 spores were dissected, 70 cultures resulted.)

Clone*	Sporu- lation**	Type***	Clone	Sporu- lation	Type	Clone	Sporu- lation	Type	Clone	Sporu- lation	Type
	%			%			%			%	
III (Parent)	15	Sa				IV (Parent)	11	Sa			
A ₆ S ₁	S	Sa	A ₁₇ S ₁	S	Sa	A ₂ S ₁	5	Sa	A ₁₃ S ₁	6	Sa
S ₂	S	Sa	S ₂	S	Sa	S ₂	4	Sa	S ₂	3	Sa
S ₃	S	Sa	S ₃	R	Sa	S ₃	5	Sa	S ₃	—	?
S ₄	—	?	S ₄	S	Sa	S ₄	—	?	S ₄	4	Sa
A ₁₀ S ₁	S	Sa	A ₁₈ S ₁	S	Sa	A ₄ S ₁	24	Sa	A ₁₇ S ₁	S	Sa
S ₂	S	Sa	S ₂	<1	Sa	S ₂	5	Sa	S ₂	S	Sa
S ₃	S	Sa	S ₃	—	?	S ₃	10	Sa	S ₃	S	Sa
S ₄	S	Sa	S ₄	<1	Sa	S ₄	3	Sa	S ₄	S	Sa
A ₁₁ S ₁	S	Sa	A ₂₃ S ₁	S	Sa	A ₆ S ₁	23	Sa	A ₁₉ S ₁	6	Sa
S ₂	<1	Sa	S ₂	<1	Sa	S ₂	19	Sa	S ₂	4	Sa
S ₃	S	Sa	S ₃	4	Sa	S ₃	7	Sa	S ₃	4	Sa
S ₄	—	?	S ₄	3	Sa	S ₄	6	Sa	S ₄	—	?
A ₁₄ S ₁	3	Sa	A ₂₄ S ₁	<1	Sa	A ₁₀ S ₁	6	Sa	A ₂₁ S ₁	4	Sa
S ₂	2	Sa	S ₂	7	Sa	S ₂	4	Sa	S ₂	4	Sa
S ₃	3	Sa	S ₃	<1	Sa	S ₃	—	?	S ₃	4	Sa
S ₄	3	Sa	S ₄	—	?	S ₄	3	Sa	S ₄	—	?
A ₁₆ S ₁	<1	Sa	A ₂₅ S ₁	2	Sa	A ₁₁ S ₁	4	Sa	A ₂₄ S ₁	3	Sa
S ₂	S	Sa	S ₂	4	Sa	S ₂	5	Sa	S ₂	2	Sa
S ₃	<1	Sa	S ₃	<1	Sa	S ₃	4	Sa	S ₃	0	Sa
S ₄	S	Sa	S ₄	R	Sa	S ₄	—	?	S ₄	0	Sa

*, ** See Table 6a.

*** Sa: Self agglutination.

Table 7. Sporulation of the clones (F₁~F₃) of strain I and IV on KAA medium after 14 days at 25°C.

Parental		Generation of clone	No. of asci* dissected	No. of clones**		Sporulation (%) ***	
Culture	Sporulation**			obtained (A)	with asci (B)	B/A	Range
	%						
I	10	F ₁	10	28	28	100	S-33
IA ₄ S ₁	3	F ₂	6	11	11	100	R-7
IA ₄ S ₁ A ₁₅ S ₃	7	F ₃	5	16	16	100	R-6
IV	11	F ₁	10	34	32	94	0-24
IVA ₁₀ S ₃	4	F ₂	5	12	11	92	0-3
IVA ₁₀ S ₃ A ₄ S ₃	S	F ₃	11	19	19	100	R-17

* With 4 spores.

** F₁, F₂ and F₃ clones were established by isolating single spores from asci of each parental culture.
For F₁, see Table 6a, c.

*** See Table 3.

Table 8. Analysis of agglutination on types from random spore isolation.

Parent strain	No. of asci dissected	Number of single-spore cultures*												
		Obtained				Not viable				Total				
		agglutinating with			Sa	agglutination types								
		Y	X	Neither		(X)	(Y)	(Z)	?	X	Y	Z	Sa	?
I	10	11	2	15	—	1	0	1	10	12	2	16	—	10
II	10	18	17	0	—	2	3	0	0	20	20	0	—	0
III	10	—	—	—	36	—	—	—	4	—	—	—	36	4
IV	10	—	—	—	34	—	—	—	6	—	—	—	34	6

* Types of the cultures agglutinating with Y, X, and neither are X, Y, and Z respectively. Assumed types are given in parenthesis. (See Table 6)

Table 9. Segregation of type Z into type X and Y on the second generation (F₂) of strain I.

Parental			Generation of clone	No. of asci dissected	No. of obtained clones with each agglutination type			Sporulation (%) range*		
Culture	Sporulation	Agglutination types			X	Y	Z	X	Y	Z
I	%	Z	F ₁	10	11	2	15	S-4	<1	S-33
IA ₁₈ S ₃	33	Z	F ₂	4	6	6	0	R-S	0-R	—
IA ₁₉ S ₁	28	Z	F ₂	4	7	7	0	0	0-2	—

* See Table 3.

Table 10. Sporulation and agglutination types of the zygote-like cells obtained by conjugating a couple of the single-spore cultures (IIA₁₁S₁+IIA₁₁S₂) of strain II.
(33 copulation figures were isolated)

Culture*	Sporulation**	Type***	Culture	Sporulation	Type	Culture	Sporulation	Type	Culture	Sporulation	Type
II (Parent)	%	Z	C-7	%	X	C-16	%	Y	C-25	%	Y
IIA ₁₁ S ₁	3	X	8	4	X	17	S	Y	26	S	X
S ₂	R	Y	9	9	X	18	1	X	27	1	X
C-1	50	Z	10	S	X	19	S	X	28	S	X
2	2	X	11	S	X	20	S	X	29	40	Z
3	2	X	12	1	X	21	1	Y	30	S	X
4	1	X	13	2	X	22	9	Y	31	S	Y
5	40	Z	14	S	Y	23	S	X	32	S	X
6	S	Y	15	1	Y	24	15	X	33	50	Z

* C: Copulation figure. For other abbreviations see Table 6a.

, * See Table 6a.

は孢子形成率も概して低く、接合子とみて単細胞培養したものの多くは対立遺伝子を持つクロンの接合子ではなく、同型接合したものではなかったかと考えられる。

しかし子囊の外で孢子の接合する現象については Krassilnikow¹³⁾ および Winge ら^{2,3)} によって早くから報

告されており, また供試クローンは相互凝集性を持つので X と Y 型クローン間の接合の可能性も十分考えられる. しかしながら前記 4 株については X 型と Y 型の細胞接合で生じたものと推察される.

親株 (Z 型, 孢子形成率は高い) は数回の単孢子培養により, 孢子形成率が低く相互凝集性を持つ X および Y 型のクローンに分離され, さらに, この X と Y 型クローンは相互に凝集して接合 (conjugation) し孢子形成率の高い Z 型株 (親株と類似) になるということが供試親株 I, II について考えられる. すなわち親株 I, II のクローンが示す凝集性はビール酵母などの凝集 (flocculation) とは区別されるべき性質のものであり, *Hansenula wingei* などの性的凝集反応⁹⁾ と類似の現象と考えられるが, この点については今後なお検討しなければならない.

要 旨

1. *Saccharomycodes ludwigii* Hansen, O-17 (I), O-81 (II), OUT-6282 (III), IFO-1043 (IV) の 4 菌株を親株とし各 10 個の子嚢から顕微解剖器により F_1 :133, F_2 :49, F_3 :35 合計 217 個の単孢子培養株 (クローン) を得, これらについて孢子形成能ならびに相互凝集性を検討しつぎの結果を得た.

2. 親株 I の子嚢 5 個より分離した孢子は 4 個 (2 対) のうち 2 個 (各対 1 個ずつ) は増殖の途中で死滅したので致死因子 (n) の存在が考えられるが, 親株 II, III, IV には致死因子の存在が認められなかった.

3. 供試クローンは各々単独に子嚢を形成した. なお親株 I と IV について第 3 代目 (F_3) まで単孢子培養を繰返し行ない同様の結果を得たので, それらのクローンは主として親株の単孢子が発芽増殖の際自己二倍体化し, 同型接合型の子嚢を造ったものではないかと考えた.

4. 親株 I の供試クローンは, F_1 では孢子形成率が低く相互凝集性を示す X および Y 型と, 孢子形成率が高く (低いものもある) 相互凝集性を示さない Z 型とに分離された. さらに, 孢子形成率の高い Z 型は F_2 で孢子形成率が低く相互凝集性を示す X と Y 型に分離された.

親株 II の全供試クローンはいずれも相互凝集性を示し, F_1 の 4 分子解析の結果 $X:Y=2:2$ に分離され, 孢子形成率はいずれも親株より低い値を示した.

親株 III, IV の供試クローンは自己凝集性を示し, 孢子形成率は高低まちまちであった.

5. 栄養細胞の接合試験により接合像を示す 33 個の単細胞培養より親株と同様の孢子形成率と凝集性を示す 4 菌株が得られた.

終りに実験の一部を担当した白上安佐, 菊田勝比古の諸君ならびに供試菌株を分譲していただいた大阪大学工学部箕浦久兵衛氏, 財団法人醗酵研究所長谷川武治氏に感謝の意を表します.

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) Winge, Ö., Laustsen, O.: <i>Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.</i> , 22 , 357-380 (1939). | 8) Fowell, R. R.: <i>Nature</i> , 170 , 578 (1952). |
| 2) Winge, Ö.: <i>ibid.</i> , 24 , 223-226 (1947). | 9) Lodder, J., Kreger-van Rij, N. J. W.: <i>The yeasts, a taxonomic study</i> . p. 15. North Holland Publ., Co. Amsterdam (1952). |
| 3) Hjort, A.: <i>ibid.</i> , 25 , 239-287 (1954). | 10) Cox, B. S., Bevan, E. A.: <i>Trans. Brit. Mycol. Soc.</i> , 44 (1), 239-242 (1961). |
| 4) 小原, 野々村, 山崎: 山梨大醗酵研, No. 9, 17 (1962); No. 11, 1 (1964). | 11) Lindegren, C. C.: <i>The yeast cell, its genetics and cytology</i> . p. 9-5; 10-3. Educational Publ., Saint Louis (1949). |
| 5) Takahashi, T., Saito, H., Ikeda, Y.: <i>Genetics</i> , 43 , 249 (1958). | 12) Brock, T. D.: <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 26 , 487-497 (1961). |
| 6) Wickerham, L. J.: <i>Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.</i> , 26 , 423-443 (1956); <i>Science</i> , 128 , 1504-1505 (1958). | 13) Kudrijawzew, W. I.: <i>Die Systematik der Hefen</i> . s. 251, Akademie Verlag, Berlin (1960). |
| 7) McClary, D. O., Nuly, W. L., Miller, G. R.: <i>J. Bacteriol.</i> , 78 , 362-368 (1959). | |

(昭 43. 2. 8 受付)