

Genetische Untersuchungen an dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita*

I. Eine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Fruchtkörperbildung und monokaryotischem Fruchten und ihre Bedeutung für Züchtung und Morphogenese

KARL ESSER, MARTA SEMERDŽIEVA* und ULF STAHL

Lehrstuhl für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität Bochum (BRD)

Investigations on the Genetics of the Basidiomycete *Agrocybe aegerita*

I. A Correlation between the Time of Fruiting Body Production and Monokaryotic Fruiting and its Importance for Breeding and Morphogenesis

Summary. The wood-inhabiting Basidiomycete *Agrocybe aegerita* (Agaricaceae) can be easily grown under laboratory conditions. Its complete life cycle requires about 6 weeks, while dikaryons are able to form fruiting bodies within 3 weeks. Since the basidiospores ($10 \times 6 \mu\text{m}$) can be isolated by hand, this organism is very well suited for genetic studies either by single strand or tetrad analysis. Thus we were able to work out the formal genetics of *A. aegerita*, the mating relations of which are controlled by the tetrapolar mechanism of homogenic incompatibility.

Within the monokaryotic offspring of a dikaryon isolated from nature we found a considerable variation in the time of fruiting in compatible matings, some failed to fruit even after 42 d. In order to quantify this criterion, we have developed for monokaryotic strains the parameter "fruiting potency", in which the only variable is the time required for fruiting body production in the resulting dikaryotic stocks.

Similar variability has been found for the ability of monokaryons to show monokaryotic fruiting. Three types of this qualitative criterion have been identified: non-fruiters, non-fruiters with fruiting body initials, and monokaryotic fruiters. The latter produce small fruiting bodies, the basidia of which predominantly carry only two spores.

Since *Agrocybe aegerita* belongs to the edible mushrooms, we have attempted to improve fruiting body production in order to obtain material for use in commercial production. As a selected example for concerted breeding we have used the criterion of fruiting potency starting from a single fruiting body. We were able to show that by selection and recombination within a small inbreeding population, in only four generations the fruiting potency could be markedly enhanced. In a parallel set of experiments as a control, we also showed that the opposite effect, a decrease in fruiting potency, could be achieved in only three generations. It became evident that *A. aegerita* is very well suited to applied research with respect to breeding for commercial use. In evaluating these data we have found a statistically significant correlation between fruiting potency and monokaryotic fruiting. The implications of the latter for the general understanding of genetic control of morphogenesis becomes evident.

Einleitung

Der holzabbauende Pilz *Agrocybe aegerita*, der zur Gruppe der Weißfäulepilze gehört, wurde bisher in nennenswertem Umfang nicht genetisch bearbeitet. Aus einer älteren Arbeit (Vandendries, 1934) ist lediglich bekannt, daß sein Fortpflanzungsverhalten durch den tetrapolaren Mechanismus der homogenen Inkompatibilität gesteuert wird. *A. aegerita* ist ein Speisepilz und läßt sich relativ leicht unter Laborbedingungen kultivieren und zur Fruchtkörperbildung bringen.

A. aegerita (Brig. ex Fr.) Sing. (Syn. *Pholiota cylindracea*) — südlicher Schüppling oder Ackerling — gehört zu den Blätter- oder Lamellenpilzen (Agaricaceae) und kann auf Holzabfällen kultiviert werden (Ginterová, 1972). Sein Entwicklungs-Zyklus ist in 6–8 Wochen abge-

schlossen. Ein Dikaryon fruchtet unter optimalen Bedingungen nach 21–28 d. Die fleischigen Fruchtkörper erreichen einen Hutdurchmesser von 5–10 cm. Sie können hinsichtlich Aroma und Geschmack durchaus mit dem Kulturchampignon konkurrieren. Die Basidiosporen sind relativ groß ($10 \times 6 \mu\text{m}$) und lassen sich mit der Hand unter einem Präpariermikroskop isolieren. Sie keimen mit einer Frequenz von etwa 90%. Dieser Pilz bietet daher für den Genetiker die unschätzbare Möglichkeit der Tetradenanalyse (Einzelheiten bei Esser und Kuenen, 1965). Oidiosporen oder andere vegetative Fortpflanzungszellen werden nicht gebildet.

Daher lag der Gedanke nahe zu prüfen, ob es möglich ist, diesen Pilz für genetische Experimente zu verwenden, um auf diese Weise die Basis für eine züchterische Bearbeitung zu schaffen. Wie im folgenden am Merkmal „Zeitpunkt der Fruchtkörperbildung“ gezeigt wird, ließ sich dieses Versuchskonzept verwirklichen. Damit haben wir Ausgangsmaterial für eine praktische Nutzung von *A. aegerita* gewonnen. Im Verlauf der Versuche konnten wir feststel-

* Derzeitige Adresse: Mikrobiol. Institut der Tschechosl. Akademie der Wissenschaften, Budějovická 1083, Prag 4 — Krč. (ČSSR).

len, daß auch Monokaryen unter bestimmten Bedingungen fruktifizieren. Daraus ergab sich ein neuer Aspekt für die Kooperation von allen Erbfaktoren, die an der Morphogenese der Fruchtkörper beteiligt sind.

Material und Methoden

Ausgangsmaterial: Von einem frischen Fruchtkörper wurde mit Hilfe der Explantatmethode aus dem Plektenchym des Stiels eine Kultur angelegt. Der Fruchtkörper wurde im Oktober 1971 auf einer Pappel in Hurbanova (CSSR) gefunden und uns dankenswerterweise von Herrn E. Futo überlassen. Die Myzelkultur erwies sich als ein Dikaryon, das unter Laborbedingungen auf Agarmedium fruktifizierte. Aus einem dieser Fruchtkörper erhielten wir nach Aussaat von Einzelsporen 31 monokaryotische Myzelien, die wir als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen verwendeten.

Als **Nährmedium** diente ein Malz-Mais-Agar. In 1 l Maismehl-Extrakt werden 30 g Maltzin (Diamalt, München) gelöst und für Agar-Kulturen dem Gemisch 20 g Agar zugesetzt. Der Maismehl-Extrakt wird gewonnen, indem man 250 g Maismehl in 10 l Leitungswasser suspendiert und über Nacht bei 60 °C hält. Danach wird der Überstand dekantiert und der Bodensatz verworfen. Der pH-Wert der Nährlösung wird, falls notwendig, mit 10%iger KOH auf 5,5 eingestellt.

Alle **Kulturen** wurden zunächst 14 d bei 25 °C und zur Auslösung der Fruchtkörperbildung dann weitere 28 d in einem mit Neonröhren beleuchteten Brutraum, dessen relative Luftfeuchtigkeit 70% betrug, bei 18 °C gehalten.

Isolierung der Basidiosporen erfolgte unter dem Präpariermikroskop (Vergrößerung 160×) auf 3% Malz-Mais-Agar (Dünnschicht). Sporenaussaat und Anzucht der Monokaryen (10–14 d) führten wir in mit Agar-Medium gefüllten Petrischalen (Ø 9 cm) durch.

Incompatibilitätsteste zur Ermittlung des Kreuzungstyps wurden ebenfalls in Petrischalen ausgeführt, in deren Mitte in einem Abstand von 0,5 mm Tester und der zu testende Stamm geimpft wurden. Die Auswertung war nach 10–14 d möglich.

Stammkulturen wurden in Schrägagarröhrchen bei 4 °C gehalten. Sie können unter diesen Bedingungen bis zu 12 Monaten aufbewahrt werden.

Der **Korrelationskoeffizient** zwischen Fruchtungsintensität und monokaryotischem Fruchtchen wurde auf Grund von 219 Einzelbeobachtungen ermittelt und anhand der t-Verteilung auf Signifikanz gegen Null getestet (Sachs, 1969).

Versuchsergebnisse

1. Bestimmung der Kreuzungstypen

Zwar ist, wie oben erwähnt, in der Literatur beschrieben, daß das Fortpflanzungsverhalten unseres Versuchsobjektes durch einen tetrapolaren Incompatibilitätsmechanismus kontrolliert wird. Da aber nach unserem Wissen bisher mit diesem Pilz nicht genetisch gearbeitet wurde, liegen keine Kreuzungstypen vor, die als Referenz für eine Klassifizierung der Monokaryen verwendet werden können. Wir haben daher die 31 Monokaryen in allen möglichen Kombinationen miteinander gekreuzt. Dabei erhielten wir eindeutig vier Kreuzungstypen, die nach dem Schema des tetrapolaren Mechanismus miteinander reagierten (Einzelheiten zur tetrapolaren Incompatibilität bei Raper, 1966; Esser und Kuenen, 1967).

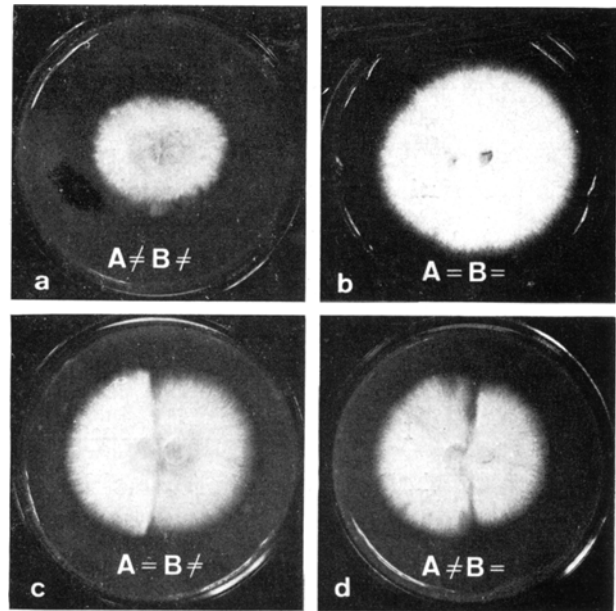


Abb. 1. Habitus der vier möglichen Kombinationen zwischen den Monokaryen von *Agrocybe aegerita* mit gleichen bzw. verschiedenen Incompatibilitätsfaktoren. Alter der Kulturen 12 d. Gleichheitszeichen (=) hinter einem Faktor bedeutet gleiche Faktoren, Ungleichheitszeichen (≠) verschiedene Faktoren, z. B. $A = B \neq$ bedeutet entweder Kombination $A_1B_1 \times A_1B_2$ oder $A_2B_1 \times A_2B_2$.

Sie wurden nach der üblichen Nomenklatur mit verschiedenen A und B Faktoren bezeichnet. Unsere Monokaryen, die als Tester für weitere Generationen dienen, lassen sich demnach unterteilen in $8A_1B_1$, $6A_2B_2$, $6A_1B_2$ und $11A_2B_1$ Stämme. In Abb. 1 geben wir einen Überblick über den Habitus der möglichen Kombinationen zwischen den vier Kreuzungstypen.

Die Bestimmung von vier Kreuzungstypen innerhalb der monokaryotischen Myzelien konnte durch die Analyse von 23 Tetraden bestätigt werden.

Diese Versuche erlauben folgende Aussagen, die zum Teil durch Abb. 1 belegt werden:

1. Nach Kreuzungen zwischen verschiedenen Kreuzungstypen gibt es keine Beeinträchtigung des Wachstums, wie dies bei *Schizophyllum commune*, dem genetisch am intensivsten bearbeiteten Objekt, in den Kombinationen $A = B \neq$ der Fall ist (Raper, 1966).

2. Dikaryotische Schnallenmyzelien entstehen nur aus Kreuzungen von Monokaryen mit beiden ungleichen Incompatibilitätsfaktoren ($A \neq B \neq$), d. h. nach Kreuzung der Monokaryen $A_1B_1 \times A_2B_2$ bzw. $A_1B_2 \times A_2B_1$.

3. In Kombinationen mit einem gleichen und einem verschiedenen Incompatibilitätsfaktor ($A = B \neq$ bzw. $A \neq B =$), d. h. nach Kreuzung von Monokaryen $A_1B_2 \times A_1B_1$ und $A_2B_1 \times A_2B_2$ bzw. $A_1B_1 \times A_2B_1$ und $A_1B_2 \times A_2B_2$, findet man häufig

zwischen den beiden Partnern eine Trennungszone, die in der einschlägigen Literatur als Barrage bezeichnet wird. In der Barragezone kommt es zwar zur Anastomosenbildung und auch teilweise zur Anlage unvollständiger Schnallen, wie es in ähnlicher Weise für *Schizophyllum commune* (Raper, 1966) und *Coprinus lagopus* (Anderson, 1971) bekannt ist. Funktionsfähige Dikaryen entstehen nicht.

4. In Kombinationen mit gleichen Incompatibilitätsfaktoren ($A = B =$) treten solche Wuchsanomalien nicht auf.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei dem von uns verwendeten Stamm von *Agrocybe aegerita* das Fortpflanzungsverhalten durch „tetrapolare Incompatibilität“ bestimmt wird und daß mit Hilfe des Kriteriums der Bildung von dikaryotischen Schnallenmyzelien eine eindeutige Klassifizierung der vier Kreuzungstypen möglich ist.

II. Bestimmung der Fruchtungspotenz

Bei der Feststellung des Kreuzungstyps der einzelnen Monokaryen war aufgefallen, daß die aus den verschiedenen Kombinationen mit $A \neq B \neq$ erhaltenen Dikaryen in unterschiedlichem Maße fruktifizierten, und zwar sowohl hinsichtlich der Zeit der Fruchtkörperbildung (28–42 d) bzw. in einigen Fällen gar nicht, als auch hinsichtlich von Zahl (1–10) und Größe der Pilzhüte (\varnothing 2–30 mm).

Da die Außenbedingungen stets konstant waren, muß man annehmen, daß die Monokaryen eine unterschiedliche, genetisch determinierte Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung besitzen. Daraus folgt weiter, daß die Kerne unseres Ausgangsstammes heterogen für das Merkmal Fruchtkörperbildung sind.

Dieser Befund überrascht nicht, denn wie wir an anderer Stelle ausführlich diskutiert haben (Esser, 1971), wird durch homogenische Incompatibilität die Fremdzucht (outbreeding) gefördert. Wir haben hier also einen experimentellen Beweis, daß die durch morphologische Diözie bei Diplonten bewirkte Heterozygotie in haploiden Dikaryen durch Incompatibilität phänotypiert wird.

Um einen Ansatzpunkt für eine quantitative Bearbeitung des Merkmals Fruchtkörperbildung zu haben, war es daher zunächst notwendig, die „Fruchtungspotenz“ der einzelnen Monokaryen quantitativ zu erfassen. Wir haben dies für den Parameter „Zeitpunkt Fruchtkörperbildung“ durchgeführt.

Die Fruchtungspotenz für die beiden anderen Parameter, Zahl und Größe der Fruchtkörper, kann in Petrischalen nicht eindeutig ermittelt werden, denn in diesen Anzuchtgefäßen entstehen kleinere Fruchtkörper als in der Natur oder in den bei der kommerziellen Pilzkultur üblichen Holzkästen. Ähnliches trifft auch für die Zahl der Fruchtkörper zu. Aus ökonomischen Gründen haben wir auf umfangreichere und zeitraubende Vergleichsversuche zwischen Petrischalen und Holzkisten verzichtet und uns im folgenden auf den Parameter Zeit beschränkt, der, wie Kontrollversuche zeigten, sich auch auf andere Kulturgefäße übertragen läßt.

In unsere Auswertungen wurden nur Fruchtkörper einbezogen, deren Hutdurchmesser zur gegebenen Zeit (28 und 42 d) mindestens 5 mm war. Pilzhüte von *A. aegerita*

werden in Petrischalenkulturen durchschnittlich 10 bis 20 mm groß, können aber auch bis 30 mm heranwachsen oder aber klein bleiben (unter 5 mm) und vertrocknen.

Für die Bestimmung der Fruchtungspotenz haben wir von den 31 Monokaryen willkürlich 16 Stämme ausgewählt, und zwar von jedem Kreuzungstyp 4 Monokaryen. Jedes Monokaryon haben wir mit den vier mit ihm kompatiblen Stämmen gekreuzt (z. B. Monokaryon Nr. 12, Kreuzungstyp A_1B_1 mit dem Monokaryon Nr. 9, 13, 18 und 11, Kreuzungstyp A_2B_2) und die Fruchtkörperbildung im Dikaryon nach folgenden Kriterien klassifiziert:

1. Frühe Fruchtkörperbildung (Index 0,25): Fruchtkörper entstehen innerhalb von 28 d.
2. Späte Fruchtkörperbildung (Index 0,125): Fruchtkörperbildung erfolgt zwischen 29 und 42 d.
3. Keine Fruchtkörperbildung (Index 0,0): Fruktifikation bleibt aus.

Vorversuche ergaben, daß, wenn ein Dikaryon innerhalb von 42 d nicht fruktifiziert, es auch später keine Fruchtkörper mehr bildet. Eine längere Kultivierung erwies sich daher als überflüssig.

Alle Kreuzungen wurden in je zwei Platten durchgeführt, und bis auf wenige Ausnahmen verhielten sich Dikaryen ein und derselben Kreuzung stets gleich. Auch eine Wiederholung der Serie führte zu vergleichbaren Werten.

Die Fruchtungspotenz eines Monokaryons ergibt sich durch Addition der aus den vier Einzelkreuzungen ermittelten Indices, wie aus folgendem Beispiel ersichtlich ist:

Monokaryon Nr. 12 (A_1B_1) fruktifiziert mit den Partnern (A_2B_2)

mit Nr. 9 früh Index 0,25
mit Nr. 13 früh Index 0,25
mit Nr. 18 spät Index 0,125
mit Nr. 11 nicht Index 0,0

Das Monokaryon Nr. 12 hat eine Fruchtungspotenz von 0,625.

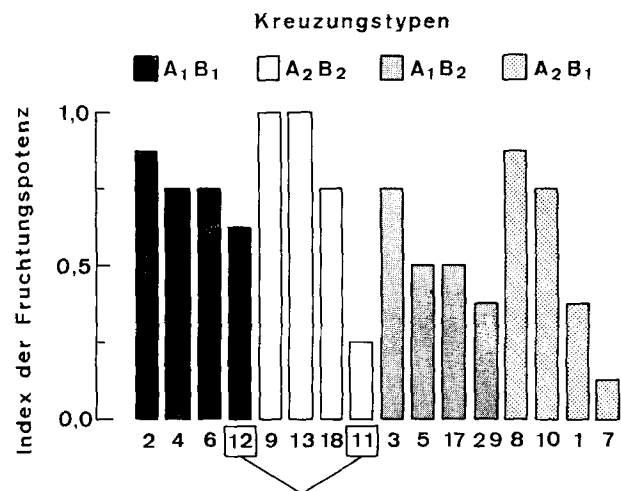


Abb. 2. Fruchtungspotenz von 16 Monokaryen mit unterschiedlichem Kreuzungstyp. Die mit Isolationsnummern versehenen Monokaryen sind nach Kreuzungstypen gruppiert

Im optimalen Falle kann demnach eine Fruchtungspotenz von 1,00 erreicht werden. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in Abb. 2 zusammengefaßt.

Aus Abb. 2 kann man entnehmen, daß die *Fruchtungspotenz der Monokaryen offenbar vom Kreuzungstyp unabhängig* ist und daß *jedes Monokaryon eine charakteristische Fruchtungspotenz für den Parameter Zeit* besitzt. Innerhalb jedes Kreuzungstyps sind nämlich gute und schlechte Fruchtkörperbildner vorhanden.

Die Tatsache, daß die Fruchtungspotenz jedes Monokaryons genetisch bedingt ist, konnte durch einen weiteren Versuch bestätigt werden. Wenn wir für die Tests ein anderes Nährmedium, in unserem Falle Biermaische-Agar, benutzten, verzögerte sich zwar die Fruchtkörperbildung insgesamt, aber die relativen Relationen der einzelnen Fruchtungspotenzen untereinander waren die gleichen.

III. Monokaryotisches Fruchten

Bei einigen Holobasidiomyceten hat man beobachtet, daß auch von Monokaryen, trotz Vorliegen von Inkompatibilität, vereinzelt Fruchtkörper gebildet werden können. Allerdings sind diese Fruchtkörper meistens wesentlich kleiner als die der Dikaryen und unterscheiden sich meist auch deutlich von diesen im Habitus.

So ergab eine genetische Analyse bei *Polyporus ciliatus* (Esser und Stahl, 1973, dort auch weitere Literatur), daß es sich bei den monokaryotischen Fruchtern um stabile Haplonten handelt, deren Basidiosporen offenbar ohne vorangehenden Sexualakt (Karyogamie und Meiose) vegetativ entstehen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß das monokaryotische Fruchten durch eine Reihe von Genen bestimmt wird, die teils für die Auslösung des Phänomens und teils für den Habitus der Fruchtkörper verantwortlich sind. Diese Gene sind nicht mit den Inkompatibilitätsfaktoren *A* und *B* identisch und wahrscheinlich auch nicht mit diesen gekoppelt (Stahl und Esser, unveröff.).

Die Tatsache, daß man das monokaryotische Fruchten bisher nur am Rande behandelt hat, mag wohl daran liegen, daß die Genetiker bestrebt sind, mit einigen Standardobjekten zu arbeiten, deren mittlerweile „fast reine Linien“ von Labor zu Labor weitergereicht werden. Jedenfalls haben wir bisher in den meisten, aus der Natur isolierten Stämmen monokaryotische Fruchter entdecken können (Esser, Stahl u. Semerdžieva, unveröff.).

Im Rahmen dieser Untersuchungen mit *A. aegerita* haben wir im Verlauf der Vorversuche (s. Einleitung) insgesamt 49 Monokaryen von dem Ursprungsmyzel isoliert und fanden unter diesen 45% monokaryotische Fruchter, die sich zwar in der Größe, doch nicht im Habitus von dikaryotischen Fruchtern unterschieden (Abb. 3 a, b). In den nur etwa 3 bis 8 mm großen Pilzhüten der Monokaryen findet man Hymenien, deren Basidien meist nur zwei Sporen tragen (Abb. 3, d). Darüber hinaus gibt es außer den nichtfruchtenden Monokaryen (39%) noch eine dritte Kategorie von Myzelien (16%), auf denen zwar Fruchtkörperanlagen entstehen, die aber nicht zur Reife gelangen und demnach natürlich auch keine Basidiosporen bilden (Abb. 3, c).

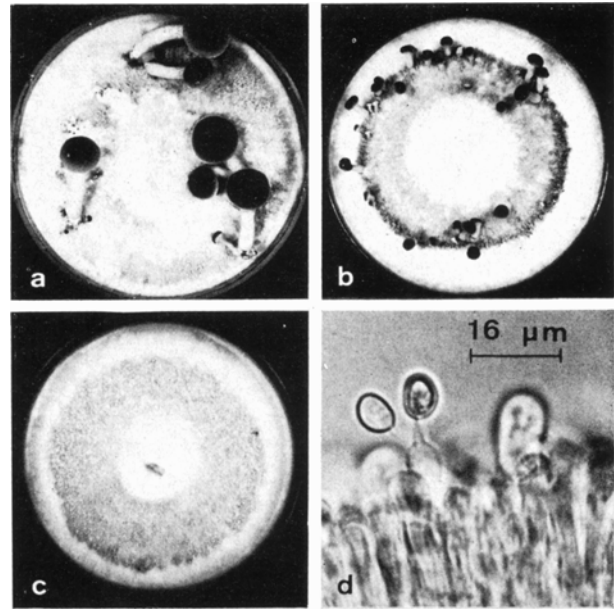


Abb. 3. *Agrocybe aegerita*.

- Dikaryon mit Fruchtkörpern;
- Monokaryon mit Fruchtkörpern;
- Monokaryon mit Fruchtkörperanlagen;
- Hymenium eines monokaryotischen Fruchtkörpers mit zweisporiger Basidie

Obwohl die genetische Analyse der monokaryotischen Fruchter von *A. aegerita* noch nicht abgeschlossen ist, steht auch bei diesem Objekt fest, daß die für das monokaryotische Fruchten verantwortlichen Gene nicht mit den Inkompatibilitätsfaktoren identisch und wahrscheinlich auch nicht gekoppelt sind. Da das *monokaryotische Fruchten eindeutig durch Erbfaktoren bestimmt* ist, haben wir dieses Phänomen neben der Fruchtungspotenz als einen weiteren *Parameter* bei den im nächsten Kapitel dargestellten Versuchen einer *züchterischen Veränderung der Fruktifikationszeit* mit einbezogen.

IV. Züchtung auf hohe und niedrige Fruchtungspotenz für den Parameter Zeit

Die bisherigen Versuche haben ergeben, daß unser dikaryotischer Ausgangsstamm in hohem Maße heterogen ist. Dies trifft nicht nur für den „Parameter Zeit“ der Fruchtungspotenz der Monokaryen zu, sondern auch für ihre Fähigkeit zu monokaryotischem Fruchten. Es erschien daher von Interesse, zu prüfen, ob es möglich ist, durch selektive Kreuzungen die Fruchtungspotenz zu verändern, und ob ein Zusammenhang zwischen der nur im Dikaryon meßbaren Fruchtungspotenz der Monokaryen und dem monokaryotischen Fruchten besteht. Um den exemplarischen Charakter dieser Untersuchungen zu betonen, haben wir versucht, die Fruchtungspotenz sowohl im „positiven“ als auch im „negativen“ Sinne zu verändern.

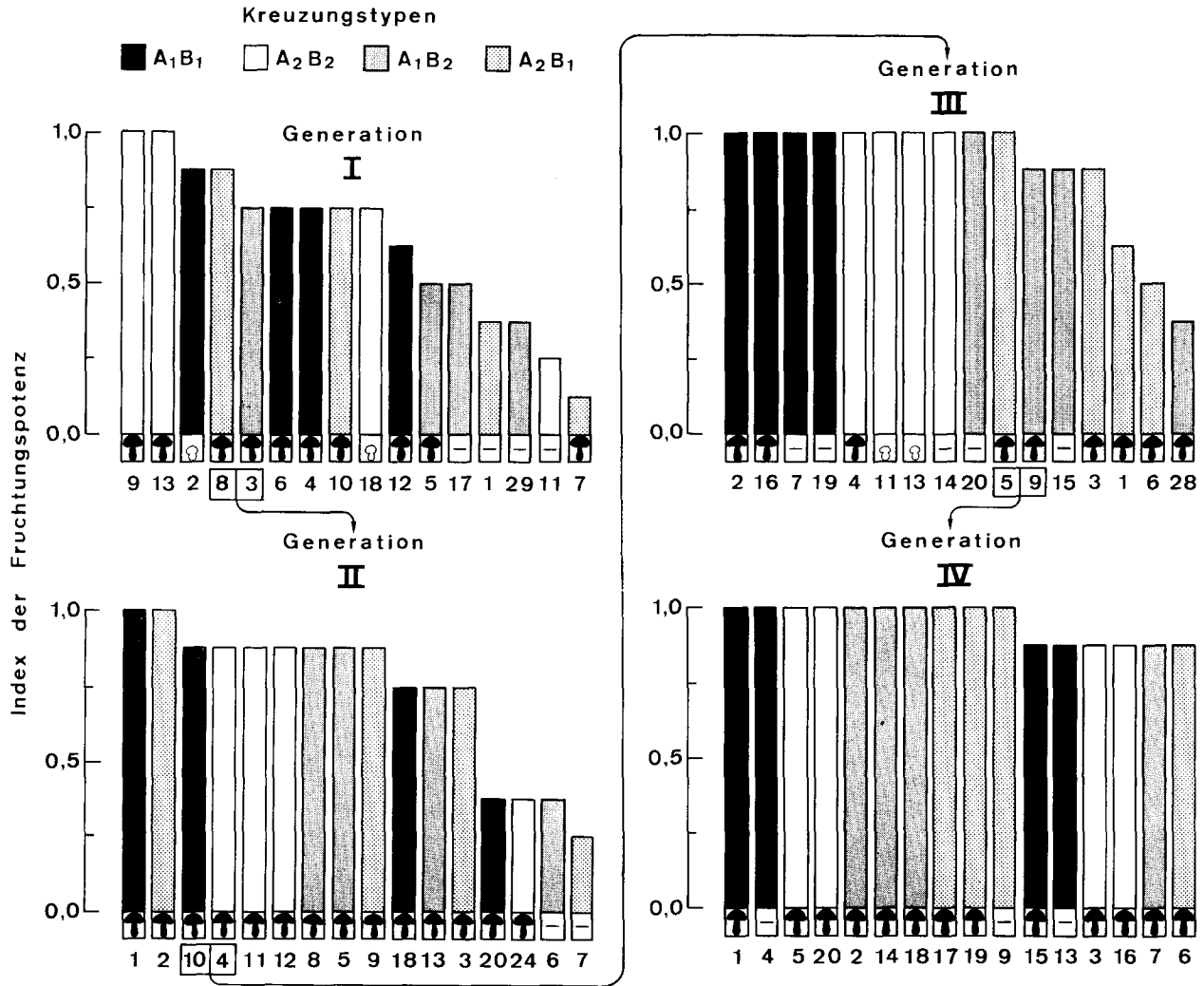


Abb. 4. Fruchtpotenz von Monokaryen nach selektiver Kreuzung über vier Generationen. Angabe der Indices der Fruchtpotenz wie in Abb. 2. Unterhalb der Isolationsnummern ist vermerkt, wie sich die einzelnen Monokaryen verhalten, d. h. ob sie monokaryotische Fruchter sind (♂) oder nicht (♀), resp. Fruchtkörperanlagen bilden (8). Die für die Produktion der nächsten Kreuzung verwendeten Monokaryen sind jeweils innerhalb der unter dem Diagramm befindlichen Nummern der Monokaryen umrandet

Tabelle 1. Fruchtkörperbildung von Dikaryen aus vier aufeinanderfolgenden Generationen. Das Zahlenmaterial wurde aus der in Abb. 4 dargestellten Versuchsreihe gewonnen. In jeder Generation wurden 32 Dikaryen getestet

Generation	Fruchtkörperbildung von Dikaryen in %			
	nach 21–28 d	nach 29–42 d	Σ	steril
I	50	28	78	22
II	63	22	84	16
III	81	13	94	6
IV	91	9	100	0

1. *Hohe Fruchtpotenz.* Im oberen Diagramm der Abb. 4 sind als Ausgangsmaterial die 16 Monokaryen aus der Abb. 2 in der Reihenfolge der Indices ihrer Fruchtpotenz dargestellt. Zusätzlich haben

wir vermerkt, ob diese Stämme monokaryotische Fruchter sind oder nicht. Aus dieser I. Generation wurden zwei Monokaryen mit hoher Fruchtpotenz gewählt, die gleichzeitig auch als Monokaryen fruchteten (Nr. 8 und Nr. 3). Sie wurden miteinander gekreuzt und aus ihrer Nachkommenschaft 23 Monokaryen isoliert. Von diesen haben wir wiederum 16 (je vier für jeden Kreuzungstyp) herausgesucht und ihre Fruchtpotenz aus den Dikaryen sowie ihre Fähigkeit zu monokaryotischem Fruchten ermittelt. In analoger Weise wurden durch Selektion und Kreuzung von Stämmen mit hoher Fruchtpotenz, die gleichzeitig monokaryotische Fruchter sind, noch zwei weitere Generationen angezogen und getestet.

Gleichzeitig wurden für jede der vier Generationen die Werte für die relative Fruchtkörperbildung berechnet (Tab. 1).

Beim Betrachten von Abb. 4 fällt auf, daß wir von den einzelnen Generationen nicht die besten Fruchter für die Weiterzucht verwendet haben. Dies liegt einerseits daran, daß deren Kreuzungstypen nicht immer kompatibel waren (z. B. die Monokaryen Nr. 9 und 13 aus der Generation I). Andererseits haben wir, um Zeit zu sparen, schon nach 6 Wochen die Stämme für die Weiterzucht bestimmt. Die vollständige Auswertung einer Generation und deren endgültige Klassifizierung hätte dies nämlich erst nach 3 Monaten gestattet.

Aus den Daten der Tab. 1 und der Abb. 4 kann man entnehmen:

1. Die beim Ausgangsmaterial (Generation I) in 78% aller Kreuzungen festgestellte Fruchtkörperbildung hat in der Generation IV den Wert von 100% erreicht. Noch drastischer ist der Anstieg, wenn man nur die zeitliche Komponente der Fruchtkörperbildung betrachtet. Frühes Fruchten (innerhalb 28 d) steigt von der I. zur IV. Generation von 50 auf 90%.

2. Die gleiche Zunahme kann man auch aus der graphischen Darstellung der Fruchtungspotenz der Monokaryen entnehmen, ungeachtet der Tatsache, daß aus den oben angeführten Gründen nicht Monokaryen mit maximaler Fruchtungspotenz gekreuzt wurden.

3. Die Zahl der monokaryotischen Fruchter hat ebenfalls von der I. Generation bis zur IV. Generation, zugenommen, nämlich von 62 auf 81%. Monokaryen, die nur Fruchtkörperanlagen bilden, traten in der IV. Generation nicht mehr auf.

Die genetische Stabilität der Fruchtungspotenz der einzelnen Monokaryen bestätigten sowohl Rückkreuzungen mit einigen Testkulturen der Ausgangsgeneration als auch Zwischenkreuzungen mit Monokaryen aus anderen Kreuzungen derselben Generation.

So z. B. fruchtete das Monokaryon Nr. 1 der Generation II (Index 1,0) früh mit dem Monokaryon Nr. 9 der Generation I (Index 1,0), aber nicht mit Nr. 11 der Generation I (Index 0,25), s. Abb. 3. Ähnlich verhielt sich ein Monokaryon mit hoher Fruchtungspotenz mit kompatiblen Partnern aus anderen Versuchsreihen derselben Generation.

Kontrollversuche in Erlenmeyerkolben bestätigten ebenfalls die in Petrischalenkulturen ermittelten Fruchtungspotenzen der Monokaryen. Auch unter diesen für die Fruchtkörperbildung günstigeren Kulturbedingungen fruktifizierten nicht innerhalb von 28 Tagen Dikaryen, bei denen die Fruchtungspotenzen der kompatiblen Monokaryen kleiner als 0,5 waren (z. B. in der Generation III der Kreuzung 4 × 13, s. Abb. 5, fruchteten weder 5 × 11 noch 8 × 13 etc.). Hingegen fruchteten innerhalb von 24 Tagen Dikaryen, deren Monokaryen hohe Fruchtungspotenzen hatten (z. B. in der Generation III der Kreuzung 10 × 4, s. Abb. 4, 2 × 4, 4 × 16 etc.).

2. *Niedrige Fruchtungspotenz.* Gewissermaßen als Kontrolle, um zu zeigen, daß man bei unserem offenbar sehr heterogenen Ausgangsmaterial durch Selektion und Rekombination schon nach wenigen Generationen ein bestimmtes Züchtungsziel erreichen kann, haben wir versucht, in einer weiteren Versuchsreihe Monokaryen mit niedriger Fruchtungspotenz herzustellen. Als Ausgangsmaterial dienten wiederum die 16 Stämme der Generation I (s. Abb. 4).

Allerdings konnten wir für diese Versuche nicht Monokaryen mit einer Fruchtungspotenz unter 0,5 nehmen (z. B. Nr. 29 × Nr. 7), da diese trotz kompatibler Kreuzungstypen nicht miteinander fruktifizieren. Wir sind daher von zwei guten Fruchtern ausgegangen (Nr. 9 × Nr. 4), die in der Nachkommenschaft ein breites Spektrum verschiedener Fruchtungspotenzen lieferten (Abb. 5, Generation II). Unter diesen Monokaryen haben wir dann einen guten Fruchter (Nr. 4) mit einem schlechten Fruchter (Nr. 13) gekreuzt und deren Nachkommenschaft wie oben beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 und Tab. 2 zusammengefaßt.

Aus Abb. 5 und Tab. 2 kann man entnehmen:

1. Aus der graphischen Darstellung der Fruchtungspotenzen geht deutlich hervor, daß die Monokaryen aus der Kreuzung zwischen dem schlechten

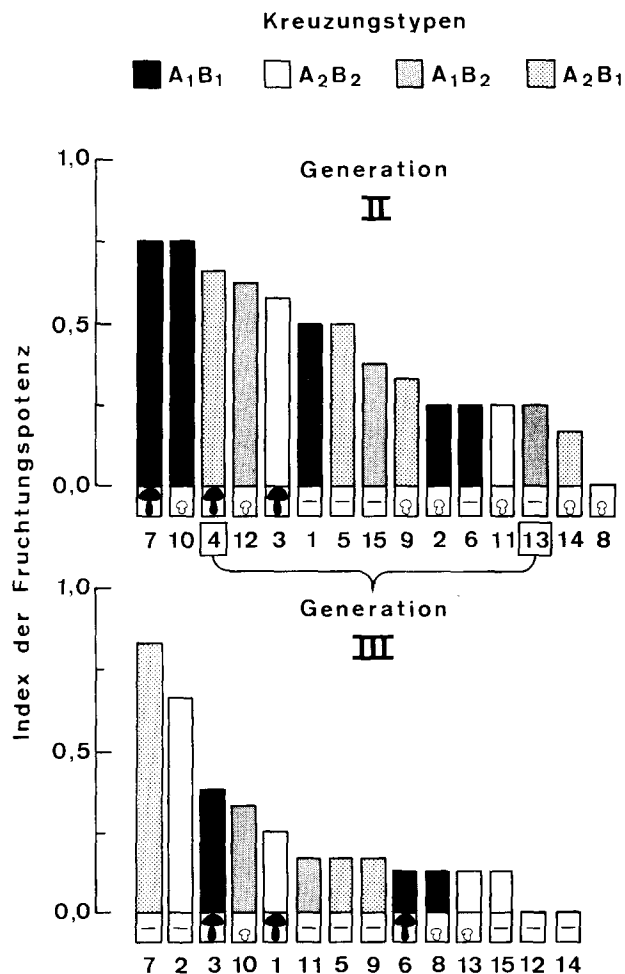


Abb. 5. Fruchtungspotenz von Monokaryen aus zwei Generationen. Darstellungsweise wie in Abb. 4. Die Eltern der Generation II waren die Monokaryen Nr. 9 und Nr. 4 der als Ausgangsmaterial benutzten Generation I (s. Abb. 2 und 4). Die Monokaryen Nr. 8 in Generation II und Nr. 12 und 14 in Generation III zeigten in keiner Kombination Fruchtkörperbildung

Tabelle 2. Fruchtkörperbildung von Dikaryen zweier aufeinanderfolgender Generationen. Das Zahlenmaterial wurde aus der in Abb. 5 dargestellten Versuchsreihe gewonnen. In jeder Nachkommenschaft wurden 24 Kreuzungen getestet

Generation	Fruchtkörperbildung von Dikaryen in %			steril
	nach 21–28 d	nach 29–42 d	Σ	
II	13	58	71	29
III	8	32	40	60

und guten Fruchter in Generation III einen extremen Abfall der Fruchtungspotenz zeigen. Dies kommt vor allen Dingen durch die beiden Stämme Nr. 12 und Nr. 14 zum Ausdruck, die nicht mehr zur Fruchtkörperbildung befähigt sind.

2. Diese Befunde finden ihre Bestätigung auch in den Werten für die relative Fruchtkörperbildung der Dikaryen. Die Anzahl steriler Dikaryen stieg von 29 auf 60%. Eine gegenläufige Tendenz zeigte sich in der Fertilität der Dikaryen. Die frühe Fruchtkörperbildung fiel von 13 auf 8%, die gesamte Fertilität von 71 auf 40% ab.

3. Parallel zur Abnahme der Fruchtungspotenz wird auch die Anzahl der monokaryotischen Fruchter geringer, denn in Generation III ist sie von 62% (Generation I) auf 19% gefallen. Der Anteil der Nichtfruchter ist dagegen von 25% auf 50% gestiegen, während der Anteil der Fruchtkörperanlagen bildenden Monokaryen mit 13 bzw. 18% nahezu konstant blieb.

3. *Statistische Auswertung der Kreuzungsergebnisse.* Die in den beiden vorangehenden Abschnitten dargestellten Versuchsergebnisse lassen schon bei oberflächlicher Betrachtung vermuten, daß offenbar eine *Korrelation zwischen der im Dikaryon nachweisbaren Fruchtungspotenz der Monokaryen und ihrer Fähigkeit zu monokaryotischem Fruchten* besteht.

Wir haben daher die Daten aus allen Versuchsserien zusammengefaßt (219 Monokaryen mit bekannter Fruchtungspotenz und monokaryotischem Fruchten) und den Korrelationskoeffizienten ermittelt. Dieser beträgt 0,82. Wenn man berücksichtigt, daß einerseits ein relativ geringes Zahlenmaterial zur Verfügung stand und andererseits die Fruchtungspotenz der Monokaryen nur anhand von drei Zeitabschnitten des Fruchtens im Dikaryon bestimmt wurde, liegt tatsächlich eine derartige *Korrelation zwischen Fruchtungspotenz und monokaryotischem Fruchten* vor.

Diese Auffassung wird noch bestätigt durch eine Überprüfung des Korrelationskoeffizienten durch den t-Test. Bei einem Wert von $t = 3,79$ und 7 Freiheitsgraden ergibt sich ein P-Wert zwischen 0,01 und 0,001. Die Nullhypothese kann demnach mit einer Sicherheit von mehr als 99% abgelehnt werden. Der Korrelationskoeffizient von 0,82 kann daher als signifikant angesehen werden.

Eine Korrelation zwischen Kreuzungstyp einerseits und Fruchtungspotenz bzw. monokaryotischem Fruchten andererseits war nicht statistisch abzusichern.

Zusammenfassend kann man sagen: *Durch Selektion und Rekombination* ist es möglich, *schon nach wenigen Generationen sowohl die Fruchtungspotenz für den Parameter Zeit als auch die mit ihr korrelierte Fähigkeit zu monokaryotischem Fruchten* je nach den Versuchsbedingungen *zu steigern oder zu senken*.

Diskussion

Durch *Inzucht eines aus der Natur isolierten Dikaryons von *Agrocybe aegerita** ist es möglich, *den zeitlichen Ablauf der Fruchtkörperbildung innerhalb weniger Generationen gezielt zu verändern*. Die Wahl eines sowohl negativen als auch positiven Züchtungszieles macht die genetische Fixierung evident. *Mit dem Anstieg der schon in den Monokaryen determinierten Fähigkeit, im Dikaryon zu fruchten (Fruchtungspotenz), ist die Bereitschaft zum monokaryotischen Fruchten korreliert*.

Bei der Fruchtkörperbildung wie bei allen anderen, nur im dikaryotischen Entwicklungszyklus eines Pilzes zur Ausprägung gelangenden quantitativen Merkmalen besteht die Schwierigkeit, ein Maß zu finden, nach welchem schon die Monokaryen klassifiziert werden können. Wird dies vernachlässigt, so ist es nicht möglich, schon die Monokaryen für ein bestimmtes Züchtungsziel im Dikaryon auszuwählen.

Raper und Krongelb (1958) führten bei der Bewertung fruchtender Myzelien von *Schizophyllum commune* den Koeffizienten der Fruchtungskompetenz ein. Dieser ist wohl von dem Potential der beteiligten Monokaryen abhängig, sagt aber nichts über ihr quantitatives Zusammenspiel bei der Ausprägung des Merkmals aus.

Wenn man dagegen sämtliche Monokaryen einer Nachkommenschaft untereinander kreuzt und die dikaryotischen Myzelien nach dem Zeitpunkt der Fruchtung bewertet, so kann daraus der Index der Fruchtungspotenz jedes Monokaryons errechnet werden (s. Ergebnisse). Er wird um so genauer sein, je mehr Kreuzungen der Berechnung zugrundegelegt werden. Bei Selektion nach Fruchtungspotenz kann, wie anhand der Ergebnisse gezeigt wird, eine Voraussage auf das entstehende Dikaryon und dessen Nachkommenschaft gemacht werden.

Nach grundsätzlich derselben Art und Weise kann auch bei anderen quantitativen Merkmalen, die nur im Dikaryon ausgebildet werden (z. B. Anzahl, Größe, Gewicht der Fruchtkörper), auf die dazugehörige Potenz der beteiligten Monokaryen geschlossen werden. Der Vorteil für die Züchtung liegt darin, daß bei Erstellung eines Produktionsstammes mit gewünschten Eigenschaften auf seine definierten Komponenten zurückgegriffen werden kann. Die züchterische Planung kann dadurch sehr vereinfacht werden. Es darf auch nicht außer acht gelassen werden, daß nur dann, wenn beide Genome des Dikaryons eine hohe Potenz für ein bestimmtes Merkmal haben, eine geringe Chance für einen Leistungsabfall durch Mutation besteht, da diese vom nicht mutierten Genom komplementiert werden kann.

Die Tatsache, daß die Fruchtkörperbildung von *A. aegerita* offenbar von sehr vielen Genen gesteuert wird, war zu erwarten, da die meisten quantitativen Merkmale eine polygene Grundlage haben. Die Maximierung eines solchen Merkmales wird daher nur durch kombinierte Anwendung der Parameter Mutation, Rekombination, Selektion und optimale Kulturbedingungen möglich sein. Solch eine konzertierte Züchtung (Esser, 1973) setzt voraus, daß der betreffende Organismus genetisch bearbeitet werden kann, was eine genaue Kenntnis des Entwicklungszyklus und der beteiligten Fortpflanzungssysteme erfordert. Bei manchen Pilzen sind diese nur ungenau bekannt oder sie zählen zu den Fungi imperfecti. Dies scheinen auch die Gründe zu sein, warum man bei der Herstellung ertragreicher Stämme für bestimmte Produkte (z. B. Antibiotika, Steroide, Speisepilze usw.) bisher den Parameter Rekombination meist außer acht gelassen hat. Natürlich führt vorübergehend auch Mutation und Selektion zum Erfolg, doch sind diese Stämme nicht stabil, was früher oder später zu einem Leistungsabfall führt. Ein gutes Beispiel dafür sind Riesenfruchtformen beim Champignon, die aber keine Sporen mehr besitzen (Fritsche, 1972).

Dies soll nicht heißen, daß immer alle Parameter anzuwenden sind, sondern es muß je nach Individualität des zu bearbeitenden Organismus entschieden werden, welche zielführend sind. Bei *A. aegerita* war es nicht nötig, Mutation auszulösen, da das aus der Natur isolierte Myzel hochgradig heterogen ist. Um die Fruchtpotenz zu verändern, brauchte daher nur Rekombination und Selektion angewendet zu werden; optimale bzw. annähernd optimale Kulturbedingungen im Labormaßstab wurden in Vorversuchen ermittelt.

Bei *A. aegerita* war es möglich, nur durch Umkombination des im Reservoir eines Naturisolates vorhandenen genetischen Materials, das in beiden Kernen eines Dikaryons oder als heterogene Kernpopulation verteilt ist, dieses in eine optimale Kombination zu bringen.

Daß dies auch für andere Merkmale möglich ist, zeigten Connolly und Simchen (1973), die das Wachstum von *Schizophyllum commune* auf eine Umgebungstemperatur von 20 bzw. 30 °C optimierten.

Im Gegensatz dazu züchteten Wang und Anderson (1972) bei *Pleurotus sapidus* mehr Fruchtkörper in kürzerer Zeit durch Kreuzung von Isolaten aus verschiedenen Lokalitäten. Es wird also hier durch Fremdzucht (outbreeding) ein Merkmal verbessert, während im vorliegenden Falle durch Inzucht (inbreeding) dasselbe erreicht wird.

Wahrscheinlich könnten auch, wie bei höheren Pflanzen üblich, „positive Mutationen“ künstlich ausgelöst oder, aus Wildstämmen isoliert, durch Rekombination in schon vorhandene Kulturformen eingebaut werden. Solange aber Inzucht als einfachster Weg zum Erfolg führt, sollte dies die Methode der Wahl sein. Sie hat den Vorteil, daß nicht mit gene-

tisch fremdem Material gearbeitet werden muß, das eventuell mit dem zu kreuzenden unverträglich sein könnte (Esser und Blaich, 1973).

Eine wesentliche Vereinfachung der Selektion von Monokaryen, die im resultierenden Dikaryon gut fruchten sollen, bringt die festgestellte Korrelation zwischen monokaryotischem Fruchten und dem Index der Fruchtpotenz. Je höher letzterer wird, um so wahrscheinlicher wird die Ausbildung von monokaryotischen Fruchtkörpern. Wird diese Erkenntnis in eine züchterische Planung einbezogen, so kann schon im monokaryotischen Entwicklungszyklus einer Population des Pilzes abgeschätzt werden, ob die Fruchtkörperbildung im Dikaryon dem gewünschten Züchtungsziel entsprechen wird.

Obwohl Untersuchungen über das monokaryotische Fruchten ergeben haben (Esser und Stahl, 1973), daß die Wirkung der „monokaryotischen Gene“ im Dikaryon phänotypisch nicht mehr erkennbar ist, sind sie dennoch physiologisch mit den im Dikaryon agierenden Erbfaktoren korreliert und verstärken die Fruchtpotenz. Es scheint, als ob für die beiden alternativen Wege der Fruchtkörpermorphogenese teilweise dieselben Gengruppen verantwortlich sind. Nur von den Inkompatibilitätsfaktoren ist es abhängig, welcher Weg eingeschlagen wird. Sobald in einem gemeinsamen Cytoplasma verschiedene A und B Inkompatibilitätsfaktoren vorhanden sind, wird das monokaryotische Fruchten supprimiert, das dikaryotische aber stimuliert. Wie die für die dikaryotische Fruchtkörperbildung verantwortlichen Erbfaktoren, die regulierenden Inkompatibilitätsfaktoren, die strukturbestimmenden Gene (Einzelheiten bei Raper, 1966) und die im Monokaryon allein wirkenden Gene miteinander verzahnt sind, dafür bestehen bisher nur Arbeitshypothesen. Ein gleichzeitiges Verfolgen beider oben aufgezeigter Wege durch detaillierte genetische Analysen erscheint daher sowohl für die praktische als auch für die theoretische Züchtungsforschung erfolgversprechend.

Zusammenfassung

Der holzzerstörende Pilz *Agrocybe aegerita* (Agaricaceae) kann leicht unter Laborbedingungen angezogen und zur Fruchtkörperbildung gebracht werden. Sein Fortpflanzungsverhalten wird durch den tetrapolaren Mechanismus der homogenischen Inkompatibilität kontrolliert und sein vollständiger Entwicklungszyklus dauert etwa 6 Wochen. Dagegen können dikaryotische Myzelien schon nach 3 Wochen Fruchtkörper bilden. Da es möglich ist, die Basidiosporen ($10 \times 6 \mu\text{m}$) mit der Hand zu isolieren, eignet sich dieser Pilz sehr gut für genetische Untersuchungen, die sowohl als Zufallsanalyse als auch mit Hilfe der Tetradenanalyse durchgeführt werden können. Wir waren daher in der Lage, die Formalgenetik dieses Pilzes auszuarbeiten.

Innerhalb der monokaryotischen Nachkommenschaft eines Dikaryons, das aus der Natur isoliert wurde, fanden wir eine beträchtliche Variabilität hinsichtlich der Fruchtkörperbildung nach Kreuzung dieser Stämme. Neben relativ frühen Fruchtern (< 28 d) kam es in einigen Kombinationen selbst nach 42 d nicht zur Fruktifikation trotz verträglicher Inkompatibilitätsfaktoren. Um dieses Phänomen zu quantifizieren, haben wir für die Monokaryen den Parameter „Fruchtungspotenz“ entwickelt, in den als einzige Variable der Zeitpunkt der Fruchtkörperbildung nach Herstellung eines Dikaryons eingeht.

Eine ähnliche Variabilität wurde für das sogenannte monokaryotische Fruchten (die Fähigkeit von Monokaryen, auch ohne kompatiblen Kreuzungspartner zu fruktifizieren) entdeckt. Drei Typen dieses qualitativen Merkmals wurden identifiziert: Monokaryotische Fruchter, Nicht-Fruchter und Nicht-Fruchter mit Fruchtkörperanlagen. Die ersteren bilden zwar normal aussehende Fruchtkörper, die jedoch wesentlich kleiner sind als die an Dikaryen entstehenden und meist nur Basidien mit zwei Sporen haben.

Da *Agrocybe aegerita* zu den Speisepilzen gehört, haben wir versucht, ihre Fruchtkörperproduktion zu verbessern, um auf diese Weise ein Material für eine praktische Nutzung zu erhalten. Als Beispiel für eine konzentrierte Züchtung wurde das Kriterium der Fruchtungspotenz ausgewählt. Ausgehend von einem aus der Natur isolierten Fruchtkörper war es möglich, in nur 4 Generationen durch Selektion und Rekombination in einer Inzuchtpopulation die Fruchtungspotenz merklich zu steigern.

In einer parallelen Versuchsreihe haben wir — gewissermaßen als Kontrolle — gezeigt, daß es unter Anwendung der gleichen Methodik möglich ist, auch das konträre Züchtungsziel zu erreichen, nämlich eine Abnahme der Fruchtungspotenz.

Es ist damit klar geworden, daß *A. aegerita* als ein geeignetes Objekt für züchterische Versuche angesehen werden kann. Darüber hinaus haben wir jedoch bei der Auswertung dieser Versuche eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Fruchtungspotenz und monokaryotischem Fruchten entdeckt. Die Bedeutung dieser Erscheinung für ein Verständnis der genetischen Kontrolle der Frucht-

körpermorphogenese und damit für die Grundlagenforschung liegt auf der Hand.

Der Aufenthalt von M. Semerdžieva wurde durch ein Stipendium der Heinrich-Hertz-Stiftung, Düsseldorf, ermöglicht. Die Experimente wurden durch Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Landesamtes für Forschung unterstützt. Wir danken diesen Institutionen. Unser Dank gilt auch den technischen Mitarbeitern unseres Lehrstuhls, insbesondere Frau M. Kuglmeier, für ihre Hilfe.

Literatur

- Anderson, G. E.: The life history and genetics of *Coprinus lagopus*: a practical introduction to biochemical genetics. Oldmixon, Westonsuper-Mare, Somerset/England: Harris Biol. Suppl. Ltd. 1971.
- Connolly, V., Simchen, G.: Two-environment selection with inbreeding in *Schizophyllum commune*. Genet. Res. Camb. **22**, 25—36 (1973).
- Esser, K.: Application and importance of fungal genetics for industrial research. Proceedings of the Symposium: Radiation and Radioisotopes for Industrial Microorganisms, pp. 83—91. Vienna: Internat. Atomic Energy Agency 1971.
- Esser, K.: Aspekte genetischer Grundlagenforschung an Pilzen und ihre Bedeutung für die Praxis. Z. Pilzkunde **39**, 145—164 (1973).
- Esser, K., Blaich, R.: Heterogenetic incompatibility in plants and animals. Adv. Genetics **17**, 107—152 (1973).
- Esser, K., Kuenen, R.: Genetik der Pilze, 501 p. Berlin/Heidelberg/New York: Springer 1967.
- Esser, K., Stahl, U.: Monokaryotic fruiting in the Basidiomycete *Polyporus ciliatus* and its suppression by incompatibility factors. Nature **244**, 304—305 (1973).
- Fritsche, G.: Beispiel der Wirkung der Einsporkulturauslese als züchterische Methode beim Kulturchampignon. Theor. Appl. Genet. **42**, 62—64 (1972).
- Ginterová, A.: Möglichkeiten einer industriellen Züchtung und Nutzung holzerstörender Pilze (tschechisch). Mykol. zpravod., Brno **16**, 70—74 (1972).
- Raper, J. R.: Genetics of sexuality in higher fungi, 283 p. New York: Ronald Press 1966.
- Raper, J. R., Krongelb, G. S.: Genetic and environmental aspects of fruiting in *Schizophyllum commune* Fr. Mycologia **50**, 707—740 (1958).
- Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden (II. Aufl.), 677 p. Berlin/Heidelberg/New York: Springer 1969.
- Vandendries, R.: Les polarités sexuelles dans le genre *Pholiota*. Bull. Soc. mycol. France **50**, 270—277 (1934).
- Wang, S. S., Anderson, N. A.: A genetic analysis of sporocarp production in *Pleurotus sapidus*. Mycologia **64**, 521—528 (1972).

Eingegangen am 1. Februar 1974

Angenommen durch R. Hagemann

Professor Dr. Karl Esser
Dr. Marta Semerdžieva
Dipl. Ing. Ulf Stahl
Lehrstuhl für Allgemeine Botanik
der Ruhr-Universität Bochum
Postfach 2148
D-463 Bochum-Querenburg (Germany/BRD)