

## 19. イネいもち病菌プロトプラストの分離、再生及び融合手法の開発

農業環境技術研究所 環境生物部 微生物管理科

### 要 約

イネいもち病菌菌糸及び分生胞子を酵素処理して多数のプロトプラストを分離し、さらに精製、再生、融合方法について検討して、細胞融合実験系を確立した。

### 背景・目的

病原真菌の中には有性的交配のできないものがあり、病原性などの遺伝解析に大きな障害となっていた。このような病原真菌について細胞融合技術を用いた遺伝解析法を開発するため、プロトプラストの分離、精製、再生及び融合法を確立する。

### 内容及び特徴

- (1) 菌糸及び分生胞子の酵素処理により、多数のプロトプラストを分離できた(図1)。分生胞子プロトプラストの分離にはストレプトミセス由来のキチナーゼが必要である。
- (2) 菌糸プロトプラストは径 $6.5\mu\text{m}$ で小さく、半数以上は無核であるが、分生胞子プロトプラストは径 $11.3\mu\text{m}$ で大きく、約90%が有核であった。
- (3) 修正フィコール・コンレイ法によるプロトプラスト精製法が最も有効であった。
- (4) プロトプラストの再生には0.6Mサッカロース加用ジャガイモ煎汁寒天培地が適しており、分生胞子プロトプラストの再生率は76～98%であった。
- (5)  $1\times 10^7$ 個/ml以上の高濃度プロトプラスト懸濁液に20mM塩化カルシウム加用40%ポリエチレングリコール6000を添加すると、プロトプラストが2～4個凝集し、1個に融合する例が観察された(図2)。
- (6) 融合株の交配型と病原性との表現型で組換え型のものが22菌株中1菌株認められた。

### 活用面と留意点

イネいもち病菌の細胞融合実験系が確立された。融合率をもっと高めれば、病原性などの遺伝解析手法として利用できる。

### キーワード

細胞融合、プロトプラスト、いもち病菌

(八重樫博志)

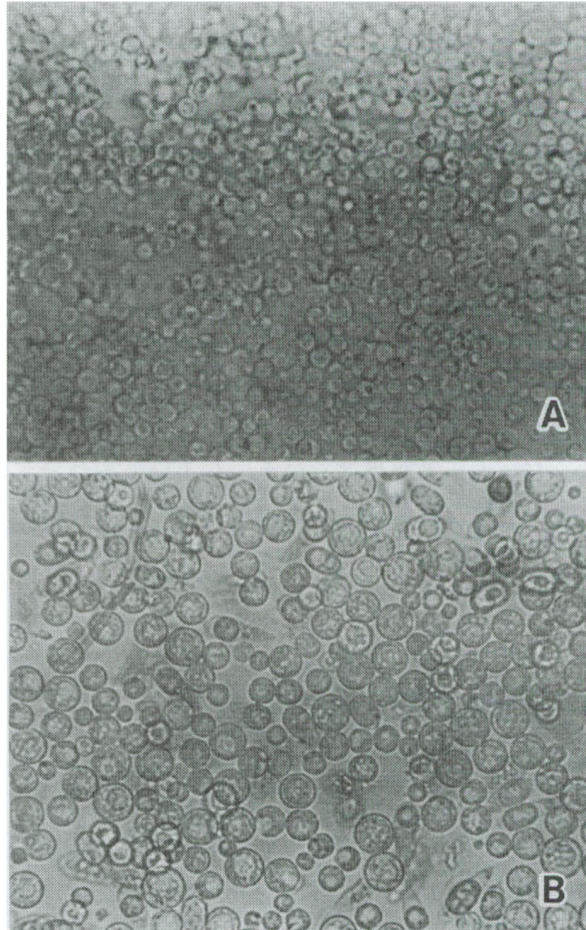


図 1 菌糸プロトプラスト (A) と  
分生孢子プロトプラスト (B)

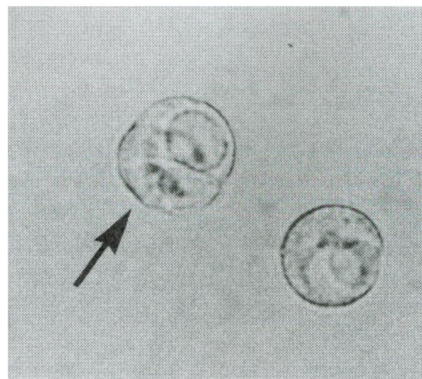


図 2 プロトプラストの融合(矢印)