

# ショウガプロトプラストの非対称細胞融合による植物体再生

大山 知泰\*・小村 国則・中尾 敬\*\*・岳田 司\*\*\*・森 憲昭\*\*\*

キーワード：ショウガ，プロトプラスト，非対称細胞融合，PCR，RAPD

Plant regeneration from ginger protoplast  
by asymmetric cell fusion

Tomohiro OHYAMA, Kuninori KOMURA, Takashi NAKAO  
Tukasa TAKEDA, Noriaki MORI

## 目 次

1. 緒言	1
2. 細胞の不活性化	2
1) ヨードアセトアミドによる細胞質の不活性化	2
2) X線照射による核の不活性化	2
3. 非対称細胞融合	3
1) ポリエチレングリコールによる非対称細胞融合	3
2) 電気刺激による非対称細胞融合	5
4. 非対称融合細胞の培養及び再分化	7
1) 初期分裂条件	7
2) カルスからの再分化条件	8
5. 再分化植物体の雑種性の確認	9
1) RAPD法によるショウガ品種の識別	9
2) RAPD法による融合処理後に得られた再分化植物体の雑種性の確認	10
6. 総合考察	11
7. 摘要	13
8. 引用文献	14
Summary	18

## 1. 緒 言

長崎県の特産作物としてショウガの栽培は古くから行われ、1975年には作付面積が816haに達し、全国でも1, 2位を占めるほどであった。その後、連作による根茎腐敗病 (*Pythium ultimum*, *P. zingiberum*) の発生により、産地の

移動とともに栽培面積の減少が著しい。このため、耐病性品種の育成を求められたが、ショウガはほとんど開花することがなく、まれに開花しても結実しないため通常の交雑育種では不可能であった。

しかし、近年の生物工学研究の進捗により交配の困難な作物の育種技術として細胞融合法が開発された。当场でも1986～'90年に取組み、ショウガプロトプラストからの植物体再分化技術の開発に成功した。さらに、最近では単純に核ゲノムを1対1の割合で融合させるのではなく、一方の細胞の核または細胞質のみを融合に供する非対称細胞融合が用いられるようになってきている<sup>2, 3, 4, 5, 10, 15</sup>。そこで、本研究は交

配育種の困難なショウガに非対象細胞融合技術を用いて耐病性の多収品種を育成することを目的として行った。

なお、本研究は農林水産省の助成による地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業「非対象細胞融合による地域特産作物の改良技術の開発」の課題のもとに1991～'95年の5ヶ年にわたり実施したものである。

## 2. 細胞の不活性化

### 1) ヨードアセトアミドによる細胞質の不活性化

#### (1) 試験方法

材料として各ショウガ品種の茎頂由来の懸濁培養カルスを用いた。これらのカルスから単離したプロトプラストをヨードアセトアミド（以下IOAと略す）を各種濃度（5 mM, 10mM, 20mM）で溶解した0.52Mマンニトール液に懸濁し、5分間、10分間及び15分間静置後、遠心分離を行い0.52Mマンニトール液によって洗浄を2回行った。不活性化の判定はIOA処理したプロトプラストを培養し、3週間後の細胞の分裂の有無によって行った。

#### (2) 結果及び考察

「有喜赤」「台湾導入」各品種の懸濁培養カルスから単離したプロトプラストの細胞質の不活性化は両品種間でわずかに差が認められたが、両品種ともヨードアセトアミド5 mMで、10分以上または10mMで5分以上の処理を行えば細胞質の不活性化が可能であった（表1）。しかし、5分間の処理ではIOAの洗浄処理を行うのに時間的にやや困難なため、5 mMの濃度で10分間処理するのが適当と考えられた。

表1 IOA処理濃度及び処理時間とプロトプラストの分裂

供試系統	有 喜 赤			台 湾 導 入		
	処 理 時 間			処 理 時 間		
	5 min	10min	20min	5 min	10min	20min
IOA						
処理濃度						
0 mM	+	+	+	+	+	+
2 Mm	+	+	+～±	+	+～±	±
5 Mm	±	-	-	±	-	-
10Mm	-	-	-	-	-	-

注) + : 分裂あり (0.2～1%) , ± : 分裂あり (0.2%以下) , - : 分裂なし

### 2) X線照射による核の不活性化

#### (1) 試験方法

材料には「有喜赤」、「台湾導入」、「大ショウガ」及び「インド」の茎頂由来の懸濁培養カルスを用いた。これらのカルスから単離したプロトプラストを0.52Mマンニトール液に懸濁

した後、60mmのプラスチックシャーレに注入し、X線を照射した。X線照射はOM-150RA（オーミック）を用い、各種線量率で行った（表2）。不活性化の判定は培養から3週間後のプロトプラストの分裂の有無で行った。また、プロトプラスト単離中の酵素液内でのX線

照射についても検討した（表3）。

表2 照射X線量と線量率

X線量 (KR)	X線量率 (R/min)
0	—
3.7	372
5.0	558
10.0	558
5.0	1,114
10.0	1,114
20.0	1,114
5.0	2,130
20.0	2,130

表3 X線の照射条件

X線処理方法	酵 素 液 中 処 理						酵素液洗 浄後処理
	314	700	1285	2427	4074	6316	1285
線量率 (R/min)							
電圧 (KVp)	60	60	60	150	100	150	60
電流 (mA)	2	2	4	4	10	10	4
線源からの距離 (cm)	20	15	15	15	15	15	15
照射時間 (分, 秒)	31.26	14.17	7.47	4.07	2.27	1.35	7.47

(2) 結果及び考察

X線量が3.7KRでは「有喜赤」、「台湾導入」の両品種とも1%以上の分裂率で無処理区との差異はほとんど認められなかった。5KRではわずかに分裂が見られたが、培養3週目に比べ、培養5週目には分裂率が低くなる傾向であった。さらに、10KR以上の線量になると完全に分裂が抑えられた。また、X線量が5KR、10KRにおいて線量率の違いによる分裂程度の差異は認められなかった（表4）。以上の結果から「有喜赤」及び「台湾導入」のX線によるプロトプラストの不活性化には10KRでよいと考えられる。なお、「インド」「茂木在来」及び「金時」においてもほぼ同様の条件で分裂が抑えられ、不活性化が可能であると考えられる。

次に、X線照射をプロトプラスト単離の酵素処理の洗浄後に行うとプロトプラストが遠心・洗浄操作中に損傷して活性が低くなった上に、X線照射により損傷が増大して融合率が低下す

ることが懸念されたので、プロトプラスト単離のための酵素処理中にX線照射を行った。その結果を表5に示した。「有喜赤」では低率ではあるが線量率314R/minで31分26秒の照射、「インド」では線量率314R/minで31分26秒の照射及び700R/minで14分17秒の照射において分裂が認められた。しかしながら、それ以上の線量率では分裂が認められず、酵素液中におけるX線照射でも不活性化は可能であった。

表4 X線照射とプロトプラストの分裂

線量 (KR)	線量率 (R/min)	有喜赤		台湾導入	
		3週間目	5週間目	3週間目	5週間目
0.0	-	++	++	++	++
3.7	372	++	++~+	++~+	+
5.0	558	+	±	±	-
10.0	558	-	-	-	-
5.0	1114	+	+	+	-
10.0	1114	-	-	-	-
20.0	1114	-	-	-	-
5.0	2130	+	-	+	-
10.0	2130	-	-	-	-
20.0	2130	-	-	-	-

注) 3週間後の分裂状況調査

++:分裂有り(1%以上)、+:分裂有り(0.1~1%)、±:分裂有り(0.1%以下)、-:分裂なし

表5 X線の照射条件と分裂

X線処理方法 線量率 (R/min)	酵素液中処理						酵素液洗浄後処理
	314	700	1285	2427	4074	6316	1285
電圧 (KVp)	60	60	60	150	100	150	60
電流 (mA)	2	2	4	4	10	10	4
線源からの距離 (cm)	20	15	15	15	15	15	15
照射時間 (分, 秒)	31.26	14.17	7.47	4.07	2.27	1.35	7.47
分裂程度 (有喜赤)	+	-	-	-	-	-	-
ク (大ショウガ)	-	-	-	-	-	-	-
ク (インド)	+	+	-	-	-	-	-

注) 3週間後の分裂状況調査

++:分裂有り(1%以上)、+:分裂有り(0.1~1%)、±:分裂有り(0.1%以下)、-:分裂なし

### 3. 非対称細胞融合

#### 1) ポリエチレングリコールによる非対称細胞融合

##### (1) 試験方法

材料には懸濁培養カルスより単離し、IOA処理したプロトプラスト「有喜赤」とX線照射したプロトプラスト「台湾導入」を用いた。両者のプロトプラストを等量で混合した密度が $5 \times 10^5$ 個/mlのプロトプラスト懸濁液0.2mlをプラスチックシャーレ上に置き、各種分子量、各種濃度のポリエチレングリコール（以下PEGと略す）を0.05mlずつ4カ所で混合し、10分後

に高pH・高Ca液10mlを注入し、10分後に洗浄した。PEG液はPEG + CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7mMでpH5.5とした。また、高pH・高Ca液はCaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 50mM + グリシン3.75g/l + グルコース7.35g/l + マンニトール0.52MでpH10.5とした。なお、PEGの分子量は濃度30%で1540, 2000, 4000及び6000をそれぞれ検討し、濃度は分子量が1540のPEGで10, 20, 30, 40及び50%を検討した。

##### (2) 結果及び考察

PEGの分子量の比較では、分子量が大きいほ

どプロトプラストの凝集が早く、パールチェーンの形成が多かった。融合率は分子量6000で特に高く、ついで1540, 2000, 4000の順であった(表6)。シングルペアの融合率は分子量1540で最も高く、1.2%であった。PEG(分子量1540)濃度は30%区で最も高く、シングルペア

の融合率も高かった。10%区では全く融合がみられず、40及び50%区ではプロトプラストの変形が認められた(表7)。

以上から、ショウガのプロトプラストのPEGによる融合には分子量1540のPEGを30%の濃度で用いるのがよいと考えられた。

表6 PEGの分子量と不活性化したプロトプラストの融合

PEGの分子量	1540	2000	4000	6000
シングルペア	++	++	++	±
パールチェーン	++	++		+++
融合率(%)	6.6	5.7	3.2	28.0
シングルペアの融合率(%)	1.2	1.0	0.4	0.3

注) +++ ←→ ±  
多 少

表7 PEGの濃度と不活性化したプロトプラストの融合

PEGの濃度(%)	10	20	30	40	50
シングルペア	+	+	++	++	++
パールチェーン	+++	+++	+++	+	++
融合率(%)	0	0.9	5.0	2.7	3.0
シングルペアの融合率(%)	0	0.1	1.2	0.8	0.1

注) +++ ←→ ±  
多 少

## 2) 電気刺激による非対称細胞融合

### (1) 試験方法

供試材料として、「有喜赤」の懸濁培養カルスより単離し、IOA処理(5 mM, 10min)したプロトプラスト及び「台湾導入」より単離し、X線照射(10KR, 1114R/min)したプロトプラストを用いた。電気融合装置はSSH-1(島津)を用い、融合時のプロトプラスト密度、パルス電圧、パルス幅、パルス回数について検討した。また、融合率を向上させるために以下の実験を行った。供試材料には「インド」及び「有喜赤」の懸濁培養カルスを用いた。これらのカルスを週一回の継代時にステンレス製メッシュ(目の大きさは1mm)を用いて裏ごし操作を行う区と裏ごし操作を行わない区を設けて、継代を行い、継代から2週間目及び6週間目にプロトプラストを単離して、「インド」のプロ

トプラストをIOA処理し、「有喜赤」のプロトプラストをX線処理した。さらに、高周波数2 MHz, 高周波電圧40 Vpp, 直流電圧600 Vpp, パルス幅100µ sec, パルス回数1回の条件で融合処理を行い、裏ごし操作2週目及び6週目の融合率を調査した。

### (2) 結果及び考察

その結果、融合時のプロトプラスト密度は、 $4 \times 10^5$ 個/ml及び $6 \times 10^5$ 個/mlが $2 \times 10^5$ 個/mlより融合率が高かった。パルス電圧では600~650Vppで融合率が最も高かった。パルス幅は、100µ secで融合率が高く、バーストも少なかった。50µ secでは融合率が低く、150µ secでは融合率が低下するとともにバーストが増加した。パルス回数は1回が最も良かった。回数を増やしても融合率は高くなり、バーストや変形するプロトプラストが増加した(表8)。

以上から、ショウガのプロトプラストの電気融合時の融合条件としてはプロトプラスト密度が4～6×10<sup>5</sup>個/ml，パルス電圧600Vpp，パルス幅100μsec，パルス回数1回が最も高い融合率が得られると考えられた。

懸濁培養カルスを継代時にステンレスメッシュ（目の大きさ1mm）を用いて裏ごし操作を行い，プロトプラストを単離し，融合処理に用いた結果は表9に示すとおりである。裏ごし操作

が2回目の区と行っていない区では融合率がそれぞれ5.8%と4.4%で顕著な差異は認められなかった。しかし，裏ごし操作が6回目と無操作区では融合率がそれぞれ6.9%と2.0%となり，顕著な差異が認められた（表9）。なお，裏ごしを行わない場合，継代回数が増えると融合率が低下した。裏ごし操作を行った区では継代回数が6回目でも逆に，融合率が向上する傾向であった。

表8 融合条件と不活性化したプロトプラストの融合

プロトプラスト密度 (個/ml)	パルス電圧 (Vpp)	パルス幅 (μsec)	パルス回数	融合度	バースト程度
2×10 <sup>5</sup>	450	100	1	±	+
	500	100	1	±	+
	550	100	1	±	++
	600	100	1	±	++
4×10 <sup>5</sup>	400	100	1	±	+
	450	100	1	±	+
	500	100	1	+	+
	550	100	1	+	++
	600	100	1	++	++
	650	100	1	+	+++
6×10 <sup>5</sup>	550	100	1	+	+
	550	150	1	+	++
	600	100	1	++	++
	600	100	2	++	++
	600	100	3	++	+++
	600	100	5	++	+++
	600	150	1	++	+++
	650	50	1	+	++
	650	100	1	++	+++
	650	150	1	+	++

注) +++ ←→ ±  
多 少

表9 懸濁培養カルスへの裏ごし操作が融合率に及ぼす効果

融 合 率 (%)		融 合 率 (%)	
裏ごし2回区	無処理区	裏ごし6回区	無処理区
5.8±1.31	4.4±0.52	6.9±2.17	2.0±0.16

注) 数値は融合率の平均（3反復）±標準偏差

## 4. 非対称融合細胞の培養及び再分化

### 1) 初期分裂条件

#### (1) 試験方法

まず、基本培地の検討を行った。IOA 処理した「有喜赤」のプロトプラストと X 線照射した「台湾導入」のプロトプラストを電気融合処理し供試材料とした。培地は MS, R2, B5 及び 1/2 MS のそれぞれの基本培地に 2, 4-D 2ppm 及びシヨ糖 14.6% を加えたものを用い、30mm のプラスチックシャーレに 3ml ずつ注入した。培養はマンニトールで浸透圧を 0.52M に調整した 0.3% ゲルライト溶液にプロトプラストを  $5 \times 10^4$  個/ml で懸濁し、上記の培地の入ったシャーレに 0.2ml 注入して、25°C、暗黒下で行った。培養開始後 3 週間目に細胞分裂状況を調査した。次に、IOA 処理した「有喜赤」及び「大ショウガ」のプロトプラスト、X 線照射した「インド」及び「長崎 2 号」のプロトプラストを供試し、「有喜赤」と「長崎 2 号」、「大ショウガ」と「インド」の組合せで電気融合を行い、培養密度を検討した。培地は MS 培地に 2, 4-D 2ppm 及びシヨ糖 14.6% を加えた培地を用い、培養は基本培地検討時の方法に準じて、種々のプロトプラスト密度 ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  及び  $1 \times 10^6$ ) で行った。さらに、IOA 処理した「インド」のプロトプラストと X 線照射した「茂木在来」のプロトプラストを電気融合し、培養開始から 1 回目の培地交換時期及び培地交換量についても検討した (表 10)。なお、培地は培養密度検討の場合と同組成の培地で、交換培地にはシヨ糖濃度を 3% に減じたものを用い、培養法は基本培地検討時と同様の培養法で行い、培養開始から 5 週間目にコロニー形成について調査した。

表 10 培地交換時期及び交換量

培地交換時期	交換量
2 週間目	1/3
2 週間目	1/2
3 週間目	1/3
3 週間目	1/2

#### (2) 結果及び考察

基本培地については MS 及び 1/2 MS において分裂が認められたが、B5 及び R2 培地では分裂は全く見られなかった (表 11)。培養密度については  $5 \times 10^4$  個/ml 及び  $1 \times 10^5$  個/ml では分裂が認められなかった。 $2 \times 10^5$  個/ml または  $1 \times 10^6$  個/ml では分裂率が低く、途中で分裂を停止する傾向であった。 $4 \times 10^5$  個/ml 及び  $6 \times 10^5$  個/ml で培養すると他の培養密度に比べ、分裂率が高く培養から 45 日後にはコロニーを形成した (表 12)。

表 11 基本培地の種類と融合細胞の分裂

基本培地	融合細胞の分裂
MS	±
B5	—
R2	—
1/2 MS	±

注) ++: 分裂有り (1% 以上)  
 +: 分裂有り (0.1~1%)  
 ±: 分裂有り (0.1% 以下)  
 -: 分裂なし

表 12 培養密度と融合細胞の分裂

培養密度 (個/ml)	3 週間後の分裂率 (%)	45 日後の分裂率 (%)
$5 \times 10^4$	0	0
$1 \times 10^5$	0	0
$2 \times 10^5$	0.1	0.1
$4 \times 10^5$	0.5	0.2
$6 \times 10^5$	0.6	0.3
$8 \times 10^5$	0.4	0.1
$1 \times 10^6$	0.1	0.1

培地の交換時期及び交換量について検討したところ、3 週目に 1/3 量の培地を交換した区が最もコロニー形成が優れていた。

培地を 1/2 量交換した区は、交換時期に関わらずコロニー形成が劣る傾向であった (表 13)。

表13 培地交換時期及び交換量がコロニー形成に及ぼす影響

培地交換時期	交換量	コロニー形成率(%)
2週目	1/2	0.11±0
3週目	1/3	0.03±0.01
2週目	1/2	0.22±0.05
3週目	1/3	0.04±0.04

注) 
$$\text{コロニー形成率} = \frac{\text{5週目のコロニー数}}{\text{プロトプラスト数}} \times 100$$

## 2) カルスからの再分化条件

### (1) 試験方法

非対称細胞融合処理後に得られたカルスからの再分化植物体を得るための条件について検討した。「インド」、「茂木在来」及び「有喜赤」の懸濁培養カルス由来プロトプラストを種々の

組合せ（表14）で電気融合処理して約60日後に得られた直径3～4mmのカルスを供試して、MS培地にシヨ糖3%、NAA及びBAPを種々の濃度で組合せて添加した液体培地で一定期間振とう培養した後、MS培地にシヨ糖3%、BAP 1mg/ℓ及びゲルライトを0.2%を加えた固形培地に移植し、1カ月後にグリーンスポット形成率及び不定芽形成率について調査した（表15）。

表14 融合組合せ

インド（IOA処理）×茂木在来（X線照射）
インド（IOA処理）×有喜赤（X線照射）
茂木在来（IOA処理）×インド（X線照射）

表15 液体振とう培養時の振とう期間、ホルモン濃度の組合せ

振とう期間	NAA濃度 (mg/ℓ)	BAP濃度 (mg/ℓ)
1週間	0	0.1
	0	1
	0.1	0.1
	0.1	1
2週間	0	0.1
	0	1
	0.1	0.1
	0.1	1
3週間	0	0.1
	0	1
	0.1	0.1
	0.1	1
無処理	—	—

### (2) 結果及び考察

融合処理後に得られたカルスから再分化植物体を得るため液体振とう培養による再分化処理の効果及びその場合の培地中のホルモン濃度について検討した。BAPを1mg/ℓとしたときの不定芽形成率は2週間及び3週間の振とう処理区では60%以上で高く、NAAを加えた区またはBAP濃度が0.1mg/ℓの区では不定芽形成率が劣った。また、振とう処理をしないで、カルスを直接再分化培地に移植すると不定芽形成率は15%で、いずれの振とう培養区よりも低か

った（表16）。以上の結果から、再分化効率を向上させるためには振とう培養により再分化前処理を行うのがよいと考えられる。

次に、融合処理後に得られたカルスから不定芽を誘導する場合の培地中の硝酸アンモニウム濃度を検討したが、結果は表17に示した通りで、グリーンスポットの形成に関しては硝酸アンモニウム濃度が0%の場合にのみ認められ、その形成率は25%であった。また、不定芽形成率は硝酸アンモニウムを加えないときが最も高く、45%であった。以上のように培地中の硝酸



アンモニウム無添加区でグリーンスポットの形成が容易となり、不定芽形成も良好となった。

表16 液体振とう培養時の振とう期間及びホルモン濃度と不定芽形成との関係

振とう期間	NAA濃度 (mg/ℓ)	BAP濃度 (mg/ℓ)	不定芽形成率 (%)
1週間	0	0.1	25
	0	1	42
	0.1	0.1	25
	0.1	1	31
2週間	0	0.1	45
	0	1	65
	0.1	0.1	43
	0.1	1	40
3週間	0	0.1	46
	0	1	63
	0.1	0.1	40
	0.1	1	60
無処理	-	-	15

表17 培地中のNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>濃度とカルスからのグリーンスポット形成及び不定芽形成との関係

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 濃度	グリーンスポット形成率 (%)	不定芽形成率 (%)
1	0	25
1/2	0	35
1/3	0	20
0	25	45

注) 培養60日後に調査

## 5. 再分化植物体の雑種性の確認

### 1) RAPD法によるショウガ品種の識別

#### (1) 試験方法

融合処理後に得られた再分化植物体の雑種性を検討するため、まず、融合処理に用いた品種間で判別可能なプライマーの検索を行った。

供試材料には「インド」、「有喜赤」、「茂木在来」及び「金時」の植物体の成葉を用いた。

DNAの抽出はCTAB法<sup>1)</sup>により行った。PCR反応液組成は鋳型DNA 20 ng, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Taqポリメラーゼ 0.2 unit, プライマー 0.2 μM, 2 mM dNTPとして、反応液量を10

μlとした。PCR反応は94℃で1分間前処理した後、94℃を1分間、40℃を2分間、72℃を3分間を1サイクルとして45サイクル繰り返し、72℃で7分間保温して終了した。反応はDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)で行った。反応終了後、PCR産物を1×TAEバッファー〔0.4 mM Tris-酢酸 (pH 8.0), 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)〕を用い、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い (50V, 約70分), エチジウムブロマイドで染色して紫外線照射下でバンドを検出した。

供試プライマーは市販の10塩基 (オペロン)

及び12塩基（ニッポンジーン）のプライマー68種類と68種類の中から2種類ずつ選んだ40組合せを用いた。

(2) 結果及び考察

各ショウガ品種からのDNAの抽出はCTAB法を用いるとカルス及び展開葉のいずれからも可能であった。また、抽出したDNAはPCRによるDNA増幅に用いることが可能であった。しかし、抽出材料に成葉や継代が遅れたカルスを用いると多糖類と思われる不純物が混入し、まれにDNA増幅が困難な場合があり、注意を要した。DNAのPCRによる増幅は前処理を94℃、で1分間行った後、94℃を1分間、40℃を2分間、72℃を3分間を1サイクルとして45サイクル繰り返し、72℃で7分間保温して終了したが、供試したいずれのショウガ品種のDNAも増幅が可能であった。

プライマーはオペロン及びニッポンジーンか

ら市販されているものを用いたが、用いた68種類のプライマーとそれらの中から2種類ずつ選んで組合せた40組合せの場合でDNAが増幅され、バンドが認められた。

以上のプライマーまたはそれらの組合せで得られたバンドパターンの中でプライマーのOPA-10及びF-89を用いた場合、「インド」と「有喜赤」、「茂木在来」及び「金時」との間で多型が認められた。さらに、A-05を用いた場合に「金時」と「インド」、「有喜赤」及び「茂木在来」間で多型が認められた（表18）。なお、これらのバンドパターンは植物体、カルスとプロトプラストからの再分化植物体でも同様であった。また、同様の鋳型DNAで再度PCRを行い、バンドを比較した場合、あるいは同様のDNA抽出材料でDNA抽出し直してそれを鋳型に用いた場合でもバンドパターンは変化せず、再現性が高かった。

表18 多型が認められたプライマー塩基配列

プライマー名	塩 基 配 列
OPA-10	5' -GTGATCGCAG-3'
A-05	5' -AGCAGCGCCTCA-3'
F-89	5' -GGTGTCTTGCGC-3'

2) RAPD法による融合処理後に得られた再分化植物体の雑種性の確認

(1) 試験方法

融合処理後に得られた再分化植物体が雑種性を有しているかどうか確認するため、RAPD法を用いて検討した。供試材料は「インド」（IOA処理）と「有喜赤」（X線処理）を融合処理した後に得られた再分化植物体を用いた。DNAは再分化植物体の展開葉からCTAB法により抽出した。プライマーは1)で品種間に差異が認められたものを用いた。PCRは1)の方法に準じて行い、1.5%アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分離し、エチジウムブロマイドで染色して紫外線照射下でバンドを検出した。その結果、融合処理後に得られた再分化植物体の展開葉より抽出し

たDNAを鋳型としてPCRを行い、バンドパターンを比較した。

(2) 結果及び考察

「インド」（IOA処理）と「有喜赤」（X線照射）とを融合処理して得られた再分化植物体からOPA-10で「インド」型を示し、F-89で「有喜赤」型を示す個体が2個体得られ、これら2個体は雑種性を有すると考えられた（写真5, 6）。

## 6. 総合考察

### 1) 細胞質または核の不活性化

I O A 処理によるショウガプロトプラストの細胞質の不活性化は 5 mM 濃度の I O A 溶液でプロトプラストを 10 分間浸漬処理することで可能であった。ただし、同一品種であっても誘導されたカルスの継代時期や状態等により単離されるプロトプラストの活性が異なってくるので、材料により I O A の処理時間が異なる。したがって、融合に供試する前に条件を確認するための予備実験が必要である。また、品種によっても若干処理条件が異なってくるので注意が必要である。

X 線照射によるショウガプロトプラストの核の不活性化は線量率に関わらず、照射する線量が 10 K R であれば可能であった。ただし、I O A 処理と同様に同一品種であってもカルスの継代時期等により X 線照射条件が異なる場合があるので、融合に供試する前に X 線照射条件を確認しておかなければならない。また、X 線照射をプロトプラストを単離した酵素液の洗浄後に行うと遠心分離回数が増加するためにプロトプラストが損傷を受け、活性が低下し融合率低下を招くと考えられる。そこで、遠心分離回数を減らすためプロトプラスト単離のための酵素処理中に X 線照射を行った。遠心分離回数が減ったことによるプロトプラストの活性の低下が抑制されたかどうかは判然としなかったが、不活性化は可能であり、かつ操作数が減らせるので酵素液中での X 線照射は有効と考えられる。

ショウガのプロトプラストの細胞質または核の不活性化が可能であったが、ここで得られた条件は誘導から期間が経っておらず、継代を行ってから 2 ~ 3 日経たカルスから単離したプロトプラストを用いた場合に適用できるものと思われる。なお、本稿のデータには示していないが、誘導から 6 か月以上の期間が経過し、継代後 5 日以上活性の低下したカルスから単離したプロトプラストは本実験で得られた条件より

も緩い条件で処理しても不活性化が可能であった。

### 2) 細胞融合

P E G による融合と電気刺激による融合では P E G は融合率が高いものの、融合操作の煩雑さ、融合後の培養の困難さの点で電気刺激による細胞融合に劣ったため、電気刺激によって細胞融合を行った。

電気刺激による細胞融合は操作が簡便で処理後の培養も比較的容易であったが、融合率が低く、P E G の 1 / 10 程度であり、融合率の向上を図る必要があった。電気融合で高い融合率を得るためには、まず活性の高いプロトプラストを得ることが必要であり、活性の高いプロトプラストを得るには分裂能が高いカルスが必要となる。大槻ら<sup>12)</sup> はイネのプロトプラストを効率的に単離するためにカルスの継代時にステンレスメッシュを用いてカルスを碎き分裂能の高いカルスを維持している。また、木村<sup>9)</sup> は大槻らの方法をショウガのプロトプラストに応用し、有効であったと報告している。本研究でもカルスの継代時に大槻らの方法でカルスを碎き、そのカルスを材料として活性の高いプロトプラストが得られた。その結果として細胞融合時に高い融合率を得ることが可能であった。また、カルスを誘導後、継代回数が多くなるほどカルスを碎く操作によってカルスの活性を高く保っておかなければ融合率の低下を招くと考えられる(表 9)。

### 3) 非対称融合細胞の培養及びカルスからの再分化

プロトプラストを培養する場合、浸透圧の下げ方が問題となる。本実験では培養時の培地交換量及び交換時期について検討した。コロニー形成時の培地交換時期及び交換量の検討では 3 週間後に 1 / 3 量を交換した区が最もコロニー形成が良好であり、コロニーが形成されるまで

は培地交換によって浸透圧を下げるのは避けたほうがよいと考えられる（表13）。

カルスからの再分化培地についてはホルモンはBAPを1mg/ℓ添加した培地が最も不定芽の形成が優れていた。木村<sup>8,9)</sup>はショウガの植物体再分化には長期間を要するとしてカルスを再分化培地に移植する前に前培養を行っているが、なお再分化に要する時間を短縮する必要があると述べている。そこで、本実験では再分化の短縮化及び再分化率向上のため、液体培地による振とう培養を行った。その結果、再分化までの日数は短縮できなかったものの、不定芽形成率は2週間振とうを行うことで65%となり（表16）、振とう培養による再分化前処理は有効であると考えられる。

本実験ではプロトプラスト培養培地としてMS、R2、B5及び1/2MS培地を用い、MSで最も良い結果が得られた（表11）。さらに、カルスからの再分化でも予備実験でMSが最も良好な結果が得られたため、プロトプラスト培養から植物体再分化まで全培養期間を通し、基本培地としてMSを用いた。

木村<sup>9)</sup>は基本培地としてショウガプロトプラストの培養にはMS、形成したコロニーからのカルス誘導にはR2及びN6、再分化にはB5の各培地が良かったとしており、本実験で用いた培地とはカルス誘導及び再分化培地で異なる結果となった。したがって、再分化系を確実なものとするためにはさらに検討を要すると思われる。

ところで、再分化植物体の中には葉がよじれるなどの奇形が認められる個体が観察され、培養変異が起こっていると考えられる。本実験では非対称細胞融合によって新品種を育成することを最終的な目的としているが、このような培養変異個体も積極的に利用する必要がある。

#### 4) 再分化植物体の雑種性の検討

近年様々な動植物でDNA断片長多型やDNAフィンガープリンティング法<sup>6,7)</sup>が品種識別や系統識別などに用いられるようになってきた。また、さらに最近ではRAPD法<sup>11,13,14)</sup>が個体識別、品種識別、集団の遺伝的構成の解

析、病害抵抗性等に連鎖したマーカーの検索など様々な用途に利用されている。この方法は鋳型DNAを増幅するPCR反応及び増幅されたPCR産物をアガロース電気泳動によりバンドを分離し、多型を検出するという大きく分けて2つのステップから成り立っている。少量の鋳型DNAを元にDNAを増幅して多型を検出するため少量のDNAサンプルで済み、煩雑な操作や危険なアイソトープを取り扱う必要もないので比較的容易に行うことができる。また、異なるプライマーを用いることで多くの異なる増幅産物が得られる。そこで、本研究ではRAPD法をショウガの品種識別及び非対象細胞融合後に得られた再分化植物体の雑種性確認に適用した（写真4-1, 4-2）。

DNAの抽出にはCTAB法を用いたが、カルス、成葉及び塊茎のいずれの組織からもDNAの抽出が可能であった。しかし、特にカルス及び根茎を材料に用いた場合は多糖類と思われる不純物が混入することが多く、抽出溶液を希釈してPCRに供試しないと増幅されない、再現性に劣る等の弊害が認められた。

ショウガのDNA増幅条件はMoriら<sup>11)</sup>の条件を参考にし、変更を加えた。プライマーは68種類の市販のプライマーとそれらの中から2種類ずつ選んで組合せた40種類の組合せを用いた。一部のプライマー及び2種類のプライマーの組合せでは増幅が不安定で再現性に乏しい場合もあったが、鋳型DNAを再度抽出したり、同じ鋳型DNAでもPCRを再度行ってみると増幅されることがあり、すべてのプライマー及び組合せでバンドが検出された。これらの内、3種類のプライマーで品種間に差異が認められた。RAPD法を品種識別等に適用する場合、バンドパターンの再現性が問題となるが、これらのバンドパターンは再現性も高かった。このようにRAPD法がショウガの品種識別にも応用できることが判明した。

本実験では非対称細胞融合の融合親として「インド」、「有喜赤」及び「茂木在来」を用いた。今回用いたプライマーの場合、「インド」にのみ認められるバンドがOPA-10及びF-89でそれぞれ一つずつ検出された。これらをマー

カーとして雑種性の判定に用い、「インド」(IOA処理)と「有喜赤」(X線照射)とを融合処理して得られた再分化植物体からOPA-10で「インド」型を示し、F-89で「有喜赤」型を示す個体が2個体得られ、これら2個体について雑種の可能性を示唆した(写真5, 6)。しかしながら、今回用いたプライマーでは融合親の両方にそれぞれ特異的なバンドを見いだすことができていないため、融合親の両方のバンドを合わせ持つといった形で雑種性を示すことはできなかった。また、判別に用いることができるマーカーも2種類と少ないため、今

後さらに融合親が識別可能なプライマーを検索するとともに、サザンハイブリダイゼーション法など他の判別手法を用いて検討する必要がある。また、細胞質を比較するため細胞質ゲノムの識別法も検討しなければならない。

以上のように、ショウガのプロトプラストを非対称細胞融合処理して再分化植物体を得た。本実験で得られた再分化植物体の雑種性についてはまだ問題を残すが、非対称細胞融合方法は今後ショウガの品種改良の一手法として利用することができるであろう。

## 7. 摘要

1) ショウガ各品種の懸濁培養カルスから単離したプロトプラストの細胞質の不活性化は10mM濃度のヨードアセトアミドで10分間または5mM濃度で15分間処理で可能であった。また、核の不活性化はX線の10KRの照射で可能であった。

2) ショウガのPEGによる非対称細胞融合ではプロトプラスト密度を $5 \times 10^5$ 個/mlとし、分子量が1540のPEGを30%濃度で用いたときに最も高いシングルペアの融合率が得られた。電気融合の場合にはプロトプラスト密度 $4 \sim 6 \times 10^5$ 個/ml, 高周波数2Mhz, 交流電圧40Vpp, パルス電圧100 $\mu$ sec, パルス回数1回の条件が最も適していた。融合率ではPEGによる融合が電気融合よりも優れていたが、培養が困難であった。

3) 融合処理後のプロトプラストの培養にはMS培地または1/2MS培地にショ糖14.6%, 2,4-D 2ppmを加えた培地が適しており、培養密度が $4 \sim 6 \times 10^5$ 個/mlで分裂率が高かった。さらに、培養開始から3週目に1/3量の培地を培養開始時の培地からショ糖を3%に減じた培地に交換したときに最も多くのコロニーが得られた。融合処理後に得られたカルス

からの再分化培地にはMS培地にBAP 1mg/l, ショ糖3%を加えたものが適していた。さらに、培地中の硝酸アンモニウムを除くことでグリーンスポットの形成が促進され、再分化培地と同組成の液体培地でカルスを2~3週間振とう培養した後、再分化培地で培養することにより不定芽の形成率を向上させることが可能であった。

4) ショウガの全DNAはショウガの葉、根茎及びカルスのいずれからもCTAB法により抽出することができ、抽出したDNAはPCR法により増幅可能であった。抽出したDNAを用いてRAPD法により融合親に用いたショウガの品種の識別を行った。検索した市販の10塩基及び12塩基のプライマー68種類と68種類の中から2種類ずつ選んだ40組合せのうち識別可能なプライマーが2種類得られた。次に、融合処理後に得られた再分化植物体の雑種性について検討した結果、「インド」(IOA処理)と「有喜赤」(X線照射)の融合処理から得られた再分化植物体の中からプライマーのOPA-10で「インド」型を示し、F-89で「有喜赤」型を示す個体が2個体得られ、雑種性が示唆された。

## 8. 引用文献

- 1) Doyle, J.J and Doyle, J.L.: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15 (1987)
- 2) Dudits, D., E.Maroy, T.Pranznovzky, Z. Olah, J.Gyorgyey and R.Cella: Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: Regeneration of fertile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8434-8438 (1987)
- 3) Hinnisdaels, S., A.Bariller, A. Mouras, V. Sidorov, J. Del-Favero, J. Veuskens, I. Negrutiu and M.Jacobs: Highly asymmetric Intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: evidence for recombiogenic and translocation events in somatic hybrid plants after "gamma" fusion. *Theor Appl Genet*, 84: 609-614 (1991)
- 4) Imamura, J., MW. Saul and I. Potrykus: X-ray irradiation promoted asymmetric somatic hybridization and molecular analysis of the products. *Theor Appl Genet*, 74: 445-450 (1987)
- 5) Itho, K., M. iwabuti, Shimamoto: In situ hybridization with species-specific DNA probes gives evidence for asymmetric nature of Brassica hybrids obtained by X-ray fusion. *Theor Appl Genet*, 82: 356-362 (1991)
- 6) Jeffreys, A.J., V and S.L.Thein.: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73 (1985)
- 7) Jeffreys, A. J., V and S. L. Thein.: Individual-specific 'finger-prints' of human DNA. *Nature*, 316:76-79 (1985)
- 8) 木村貞夫, 岳田 司: ショウガプロトプラストからの植物体再分化に及ぼすオーキシン, サイトカイニン及び前培養培地の影響, 第29回園芸学会九州支部大会(講要), 43, (1989)
- 9) 木村貞夫: ショウガプロトプラストからの植物体再分化, 長崎総農林試研報, 18, 1-25 (1990)
- 10) Melzer, J.M. and M. A.O'Connell: Effect of radiation dose on the production of and the extent of asymmetry in tomato asymmetric somatic hybrids. *Theor Appl Genet.*, 83: 337-344 (1992)
- 11) Mori, M., K. Hosaka, Y.Umemura and C. Kaneda: Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet* 68: 167-174 (1993)
- 12) 大槻義昭, 吉田泰二, 山地チカ子, 亀島雅史: イネプロトプラストの効率的調整にかかわる懸濁培養条件、育種学雑誌、38; (別冊) 78-79 (1988)
- 13) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, A. Rafalski and S. V. Tingey.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18:6531-6535 (1990)
- 14) Welsh, J. and M.McClelland.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 19: 303-306 (1990)
- 15) Yamashita, Y., R. Terada S. Nishibayashi and S. Shimamoto: Asymmetric somatic hybrids of *Brassica*: partial transfer of *B. campestris* genome into *B. oleracea* by cell fusion. *Theor Appl Genet.* 77: 189-194 (1989)

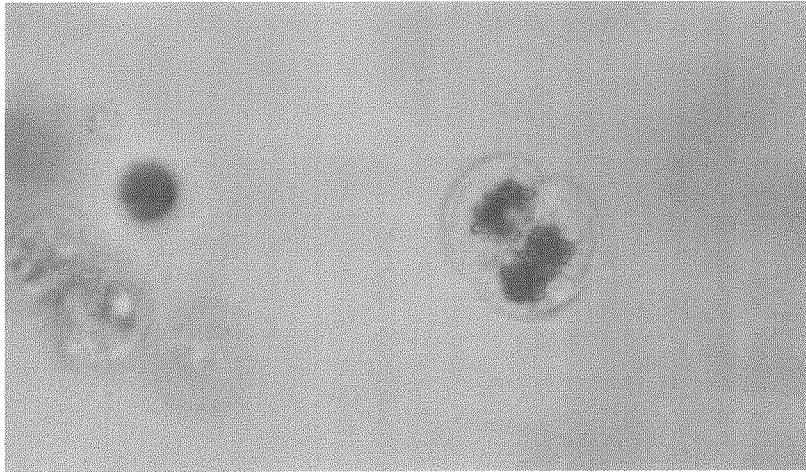


写真1：電気融合処理直後のプロトプラスト

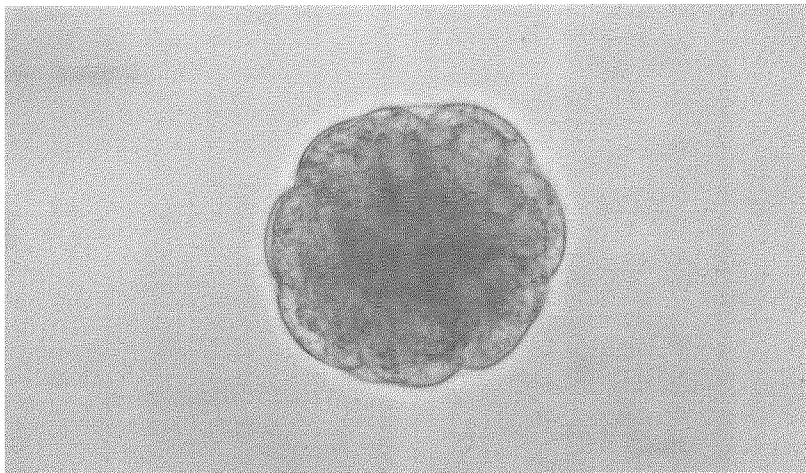


写真2：コロニー形成（培養開始から40日）



写真3：不定芽の形成





写真4-1：非対称細胞融合による再分化植物体



写真4-2：非対称細胞融合による再分化植物体



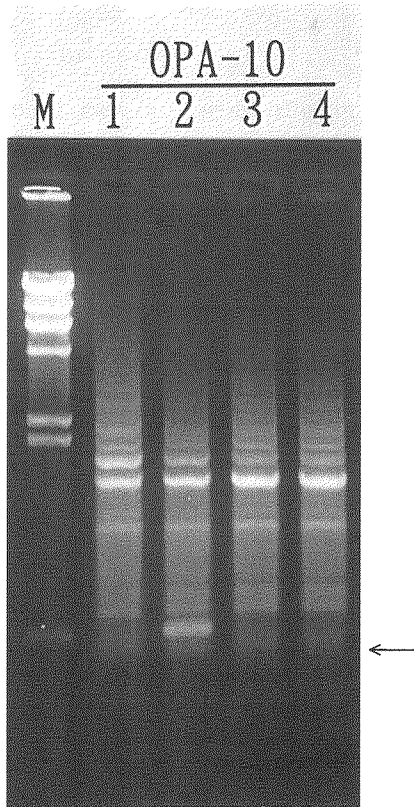


写真5 : OPA-10でのバンドパターン  
 M : マーカー (λ/Hind III)  
 1 : インド  
 2 : 有喜赤  
 3 : インド (IOA 処理) × 有喜赤 (X線処理)  
 4 : インド (IOA 処理) × 有喜赤 (X線処理)  
 → : 有喜赤に特異的なバンド

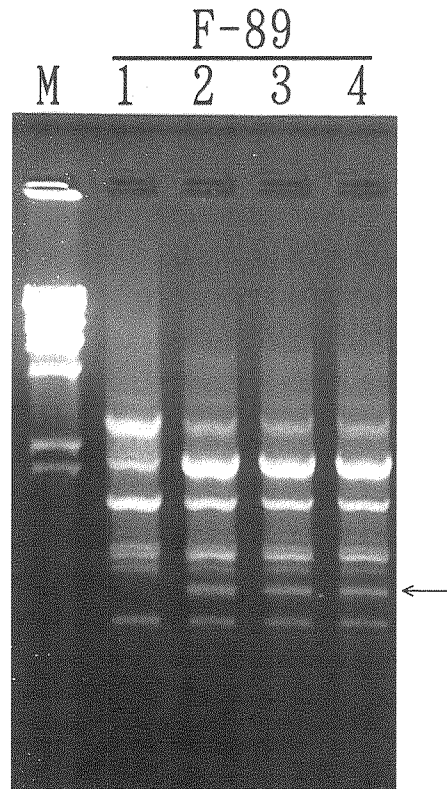


写真6 : F-89でのバンドパターン  
 M : マーカー (λ/Hind III)  
 1 : インド  
 2 : 有喜赤  
 3 : インド (IOA 処理) × 有喜赤 (X線処理)  
 4 : インド (IOA 処理) × 有喜赤 (X線処理)  
 → : 有喜赤に特異的なバンド

Plant regeneration from ginger protoplast by asymmetric cell fusion

Tomohiro OHYAMA, Kuninori KOMURA, Takashi NAKAO,  
Tukasa TAKEDA, Noriaki MORI

Summary

- 1) The cytoplasm of protoplast isolated from calli of ginger varieties was inactivated by an acetoamido iodine treatment with either 10mM concentration for 10 min or 5 mM for 15 min. The nuclei were inactivated by an exposure to 10 KR Xray.
- 2) For an asymmetric cell fusion of ginger using PEG, the highest fusion rate between single cells were at conditions of  $5 \times 10^5$  protoplasts per ml and a 30% concentration of PEG with a molecular weight of 1540. For an electric fusion, optimized conditions were  $4 \sim 6 \times 10^5$  protoplasts per ml, a 2MHz high frequency wave, an AC 40Vpp and one cycle of 100  $\mu$  sec pulse volts. PEG was superior in fusion rate to an electric fusion, but was difficult to culture.
- 3) Protoplasts after a fusion treatment were cultured best on MS medium or a half strength of MS medium supplemented with 14.6% sucrose and 2 ppm 2,4-D. The cultured density of  $4 \sim 6 \times 10^5$  protoplasts per ml gave the highest cell division rate. The largest number of colonies was obtained by replacing one third of the medium with that of reduced sucrose content to 3% three weeks after beginning of the culture. Regeneration from the calli after a fusion treatment was optimized with the MS medium supplemented with 1mg/l BAP and 3% sucrose. By removing ammonium nitrate from the medium, green spots were formed promptly. Higher shoot formation frequencies were obtained by culturing the calli first in liquid medium with shaking for two or three weeks, then on solid regeneration medium, both with the same composition.
- 4) Total DNA of ginger was isolated from leaf, rhizome or callus tissues by CTAB method, which was able to be amplified by PCR. Two primers from each of commercially available, 68 10-mer and 68 12-mer primers were arbitrarily chosen and tested for RAPD analysis. Two of 40 primer sets surveyed were useful to discriminate ginger cultivars that were used for cell fusion. Using these two primer sets, two regenerations from the fusion between India (IOA treated) and Uki-aka (X-ray exposed) were identified as hybrids because these exhibited an India-specific band with the primer OPA-10 and Uki-aka-specific band with F-89.