

イネとマメ科植物の体細胞雑種の
分子的基礎解析に関する研究

1995年

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻

(弘前大学)

仲 條 民 介

1

イネとマメ科植物の体細胞雑種の

分子的基礎解析に関する研究

1995年

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(弘前大学)

仲條真介

目 次

第 1 章	序 論	1
第 2 章	体細胞雑種育成の背景	4
第 1 節	科間体細胞雑種	4
1.	イネとダイズの科間雑種	4
2.	イネとバーズフット・トレフォイルの科間雑種	5
3.	イネとアルファルファの科間雑種	5
第 2 節	属間体細胞雑種	6
1.	ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間雑種	6
2.	バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種	6
第 3 章	体細胞雑種の核 DNA の解析	11
第 1 節	緒 言	11
第 2 節	材料および方法	11
1.	供試材料	11
2.	核 DNA 画分の調製	13
3.	制限酵素処理および電気泳動	14
4.	DNA プロブの標識	14
5.	サザンブロット分析	14
第 3 節	結 果	15
1.	科間体細胞雑種の核 DNA の解析	15
2.	属間体細胞雑種の核 DNA の解析	16

第4節 考察	17
第4章 体細胞雑種の mtDNA の解析	27
第1節 緒言	27
第2節 材料および方法	27
1. 供試材料	27
2. mtDNA 画分の調製	29
3. 制限酵素処理および電気泳動	30
4. DNAプローブの標識	30
5. サザンブロット分析	30
第3節 結果	30
1. 科間体細胞雑種の mtDNA の解析	30
2. 属間体細胞雑種の mtDNA の解析	33
第4節 考察	34
第5章 体細胞雑種の cpDNA の解析	52
第1節 緒言	52
第2節 材料および方法	52
1. 供試材料	52
2. cpDNA 画分の調製	54
3. 制限酵素処理および電気泳動	54
4. DNAプローブの標識	54
5. サザンブロット分析	55
第3節 結果	55
1. 科間体細胞雑種の cpDNA の解析	55
2. 属間体細胞雑種の cpDNA の解析	56

第 4 節 考察	57
第 6 章 総合考察	70
摘 要	74
謝 辞	76
引用文献	77
Summary	82

植物における体細胞融合は、性的に不和合な植物間で雑種を作出する技術として研究されてきた。研究の初期の段階では、性的に不和合な植物間で新たな複倍数体の作出が期待された。しかし、属間や科間など系統学的に離れた植物種間では片親の染色体の消失が生じる (Kao 1977; Wetter 1977; Krumbiegel and Schieder 1981; Chien *et al.* 1982)。そのために遠縁の植物の細胞融合の目的は新たな複倍数体の作出から、異種からの遺伝因子の一部を導入する遺伝子移入へと移行していった (Shepard *et al.* 1983)。

薬剤耐性や雄性不稔は農業上有用な形質であるが、それらの遺伝子は細胞質内の細胞小器官（オルガネラ）である葉緑体やミトコンドリアのゲノムに存在している場合が多い。オルガネラは通常母性遺伝をする為に、オルガネラ遺伝子を交雑により導入することは通常不可能である。しかし、細胞融合は直接異種の細胞質が混じり合うため、オルガネラ遺伝子の導入が可能であると考えられる。葉緑体のストレプトマイシン耐性遺伝子 (Medgyesy 1980; Menczel *et al.* 1981)、ミトコンドリアの細胞質雄性不稔遺伝子 (CMS) (Sakai and Imamura 1990) が実際に細胞融合により他植物へ導入されている。また細胞融合により、アトラジン耐性と CMS の2種のオルガネラ形質を一つの細胞質内に取り込むことも行われた (Christey *et al.* 1991)。

細胞融合後のオルガネラの動向についての研究も盛んに行われてきた。体細胞雑種の葉緑体の分離については、両親の葉緑体のどちらか一方がランダムに選択され分離していく場合 (Scowcroft and Larkin 1981; Bonnett and Glimelius 1983; O'Connell and Hanson 1987)、および、片親の葉緑体のみが選択され残存していくノンランダムな場合 (Kumar

and Cocking 1982; Clark *et al.* 1986; Kemble *et al.* 1986; Morgan and Maliga 1987; Gleba *et al.* 1988; Smith *et al.* 1989)等の報告がある。そして、雑種植物体内の葉緑体構成は、最終的に片親由来のみの均質なものとなる。

またミトコンドリアは、葉緑体と同じ親由来のものが残る場合 (Medgyesy *et al.* 1985b)と、葉緑体とは独立して分離していく場合 (Aviv and Galun 1980; Clark *et al.* 1986; Spangenberg *et al.* 1990; Bonnett and Glimelius 1990; Honda *et al.* 1991)とがある。

そして、葉緑体DNAの組換えの報告はあまり多くはないが (Medgyesy *et al.* 1985a; Fejes *et al.* 1990)、ミトコンドリアDNAについては、しばしば組換えや再構成が生じると報告されている (Belliard *et al.* 1979; Nagy *et al.* 1981; Chetrit *et al.* 1985; Rothenberg *et al.* 1985; Kemble *et al.* 1986; Smith *et al.* 1989; Bonnett and Glimelius 1990; Honda *et al.* 1991)。また、ミトコンドリアゲノムの構成が草丈、葉色、種子稔性および雑種カルスの再分化等の植物の生理的・形態的特性に影響を与えることも報告されている (Bonnett and Glimelius 1990; Newton *et al.* 1990; Honda *et al.* 1991)。

細胞質の改良を目的とした細胞融合を行うためには、融合後の細胞のオルガネラの動向についてあらかじめ情報を得ておくことが重要である。しかし、細胞融合後のオルガネラの動向は複雑であり、融合の組合せや培養条件、材料植物の状態など様々な要因が絡んでくる。またそのオルガネラの動向に影響を与える核との関係も大きい。

弘前大学農学部育種・遺伝学研究室では、多年にわたって、イネ (*Oryza sativa* L.)と、マメ科のダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.)およびマメ科牧草2種アルファルファ (*Medicago sativa* L.)とバースフット・トレfoil (*Lotus corniculatus* L.)の科間および属間の総組合せの細胞

融合を行い比較研究を行ってきた。

本論文ではこのイネとマメ科植物の3組合せの科間およびマメ科の2組合せの属間雑種を材料に用い、オルガネラと核の動向について基礎的知見を得ることを目的として核DNA、ミトコンドリアDNA(mtDNA)および葉緑体DNA(cpDNA)の解析を詳細に行い、またその育種的価値について論議した。なお残る1組合せ、ダイズとアルファルファの細胞融合による雑種カルスはごく最近当研究室で成功したが、オルガネラと核の動向についての実験には供試し得なかった。

第2章 体細胞雑種育成の背景

第1節 科間体細胞雑種

1. イネとダイズの科間雑種

イネ (*Oryza sativa* L.) とダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の細胞融合 (Niizeki and Kita 1981; Niizeki *et al.* 1985) では、イネ系統 A-58 ならびにダイズ品種 Harosoy が用いられた。

A-58 の胚盤由来カルスから単離されたプロトプラストは、フラボノイド系色素により黒紫色を呈する。一方、Harosoy の胚軸由来カルスから単離されたプロトプラストは液胞が発達しており透明である。この細胞の特徴は融合処理直後の雑種プロトプラストの判定および雑種カルスの選抜に利用された。また、ポリエチレングリコール (PEG) 法により作出された融合細胞は、ココナッツミルクを除き、ゼアチンの代わりにベンジルアデニン (BA) を添加した Kao and Michayluk (1975) の KM8p 培地中で培養され、維持された。

カルス形成後、A-58 系統の黒紫色のフラボノイド系色素とダイズカルスの柔らかい性質を併せもつものが雑種として選抜された。雑種カルスは、2mg/l の 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) を添加した MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) で継代された。その後、継代を重ねるに従い、カルスの黒紫色は急速に消失して、褐色となった。この現象は雑種カルス細胞内でイネ染色体が消失したことによると推測された。このイネ染色体の消失は、核にコードされるパーオキシダーゼやエステラーゼのアイソザイム分析や核型分析によっても確認された。

褐色の雑種カルスを数回継代した後、緑色と白色のカルスが分離した。葉緑体にコードされる、リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCo) の大サブユニットの解析の結果、緑色カルスはダイズの cpDNA

を持ち、白色カルスはイネとダイズのcpDNAをキメラで有することが明らかにされた (Fig.1A, Table 1)。

2. イネとバースフット・トレフォイルの科間雑種

イネとバースフット・トレフォイル (*Lotus corniculatus* L.) の細胞融合 (Niizeki *et.al.*, 1992a) ではイネ系統A-58とバースフット・トレフォイル品種Vikingが用いられた。

イネのプロトプラストと、15mM iodoacetamide (IOA) 処理により細胞分裂を不活化したバースフット・トレフォイルのプロトプラストは、PEG法により融合され、アガロースビーズ法を用いてKM8p液体培地中でナース培養された。ナース細胞としてバースフット・トレフォイルのカルス細胞が用いられた。この培地中では、イネおよびバースフット・トレフォイルのプロトプラストは単独で分裂することができないため、分裂により形成されたコロニーは雑種プロトプラスト由来として選抜された。そのコロニーはA-58が有するフラボノイド系色素の発現により黒紫色を呈した。

コロニーは4mg/l 1-naphthaleneacetic acid (NAA) および2.5mg/l kinetinを添加したMS寒天培地へ移植された。継代された雑種カルスで、バースフット・トレフォイルの染色体よりも明らかに小さいイネの染色体が一部確認された。これらのカルスから植物体が再生し、順化後、鉢上げされた (Fig.1A, Table 1)。

3. イネとアルファルファの科間雑種

イネとアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の科間細胞融合 (Niizeki *et.al.*, 1992b) では、イネ系統A-58ならびにアルファルファ品種DuPuitが用いられた。この場合はイネとダイズの細胞融合と同じ方法で雑種カル

スを選抜した。継代培養によって、フラボノイド系色素は急速に消失し、褐色のカルスとなったが、そのカルスから緑色と黄色のカルスが分離した。しかし、植物体再生には至らなかった(Fig.1A, Table 1)。

第2節 属間体細胞雑種

1. ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間雑種

ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間細胞融合(Niizeki *et al.*, 1990)では、前述のダイズ品種Harosoyとバーズフット・トレフォイル品種Vikingが用いられた。

バーズフット・トレフォイルのプロトプラストは10mM IOAによって、細胞分裂が不活化された。ダイズのプロトプラストは24-30kRのX線照射により染色体切断などが誘発され、核の不活化がなされた。PEG法による融合処理後のプロトプラスト培養は、イネとバーズフット・トレフォイルの場合と同じ方法で行い、雑種カルスが得られた。初期の雑種カルスの核型観察の結果、バーズフット・トレフォイルの染色体がほとんどであったが、バーズフット・トレフォイルより明らかに小さいダイズ由来の染色体が数本残存しているものが6系統確認された。また、パーオキシダーゼアイソザイム分析では、調査した雑種カルス17系統のうち2系統が雑種性を示したが、この2系統の核内にダイズのパーオキシダーゼアイソザイム遺伝子の座乗する染色体が残存していた事によるものと推測された。

さらに、イネとバーズフット・トレフォイルの場合と同様に、この組合わせの雑種カルスからも植物体が再分化した(Fig.1B, Table 1.)。

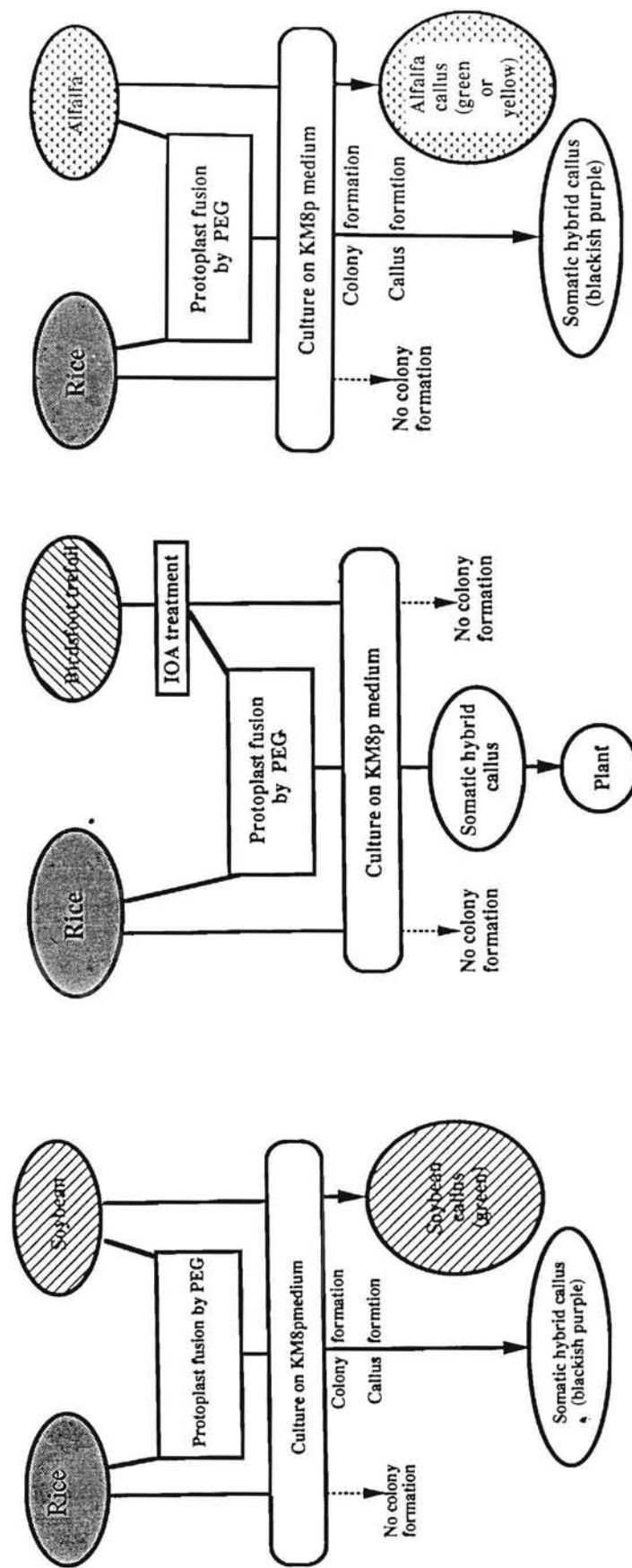
2. バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種

バーズフット・トレフォイルと、アルファルファの属間細胞融合

(Niizeki *et al.* 1989)では、前述のバースフット・トレフォイル品種 Vikingならびにアルファルファの品種 DuPuit, Rambler, Rangelander, Vernalが用いられた。

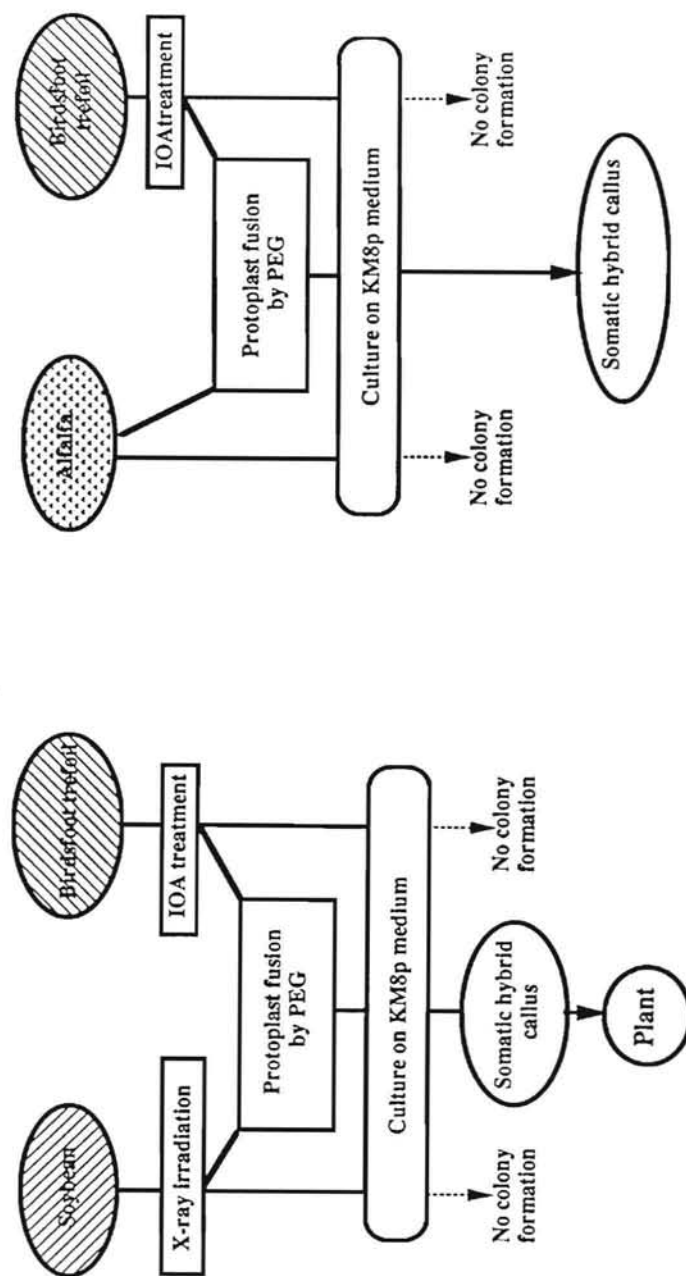
バースフット・トレフォイルのプロトプラストは融合前に5mM IOA処理を行い分裂が不活化された。また、KM8p培地上でのアルファルファのプロトプラスト分裂能や、プロトプラスト分裂後のコロニー形成能は、品種や同じ品種内でも個体毎の遺伝子型によって差が存在する(Niizeki and Saito 1987)。この融合組合せの場合、アルファルファプロトプラストは、前述の4品種内で、分裂はするがコロニー形成しない遺伝子型の個体のカルスを用いることによって、雑種カルスの選抜をすることができる。

P E G法により得られた融合細胞はKM8p培地で培養された。得られたカルス128系統のうち2系統のみが緑褐色で柔らかい雑種の性状を示したが、残りは全てバースフット・トレフォイルのカルスと同じ固く暗緑色の性状を示した。これは5mM IOA濃度ではバースフット・トレフォイル単独のカルス形成の抑制が不完全であったか、共存培養による影響で、カルス形成能を得たためと推察された。緑褐色で柔らかいカルスはパーオキシダーゼアイソザイム分析で雑種性を示し両親の染色体の共存が確認されたが、顕微鏡観察ではアルファルファの染色体が消失する傾向であった(Fig.1B, Table 1)。



A. Interfamilial combinations

Fig. 1. A and B. Protoplast fusions and selection systems of interfamilial and intergeneric combinations of somatic hybrids between gramineous and leguminous species. In the case of fusion between alfalfa and birdsfoot trefoil, the alfalfa protoplasts were isolated from the cell line which was able to regenerate the plantlet from the hypocotyle-derived callus, but not able to regenerate the colony from the protoplast.



B. Intergeneric combinations

Fig. 1. (continued)

Table 1. Interfamilial and intergeneric somatic hybridization among gramineous and leguminous species

Combination	No. of dish used for culture	No. of dish with formed colony	No. of callus formed	No. of hybrid callus (Method of identification of hybridity)	Organ formation
Interfamilial hybridization					
Rice+Soybean	3	3	54	4 (Large subunit of RuBisCO)	—
Rice+Birdsfoot trefoil	19*	—	—	—	—
	16	5	30	2 (Karyotype)	plant
	30**	3	20	20 (Karyotype)	plant
Rice+Alfalfa	41	6	154	2 (mtDNA)	—
Intergeneric hybridization					
Soybean+Birdsfoot trefoil	14***	6	160	8 (Karyotype, Isozyme)	plant
Birdsfoot trefoil+Alfalfa	10****	4	128	2 (Karyotype, Isozyme)	—
Soybean+Alfalfa	11	—	—	—	—

* Fusion between IOA (30mM) - treated rice protoplasts and X-irradiated (more than 9 kR) soybean protoplasts.

** Fusion between IOA (15mM) - treated birdsfoot trefoil protoplasts and rice protoplasts. Rice protoplast alone could not form colonies in KM8p medium.

*** Fusion between IOA (10mM)-treated birdsfoot trefoil protoplasts and X-irradiated (24-30 kR) soybean protoplasts.

**** Fusion between IOA (5mM) - treated birdsfoot trefoil protoplasts and alfalfa protoplasts. Alfalfa protoplast alone could not form colonies in KM8p medium.

All other hybrid calli were selected by flavonoid pigment of rice, strain A-58, as a marker.

第3章 体細胞雑種の核DNAの解析

第1節 緒言

イネとマメ科3植物の科間および属間の5組合せの体細胞雑種の雑種性はこれまでカルスの性状、RuBisCo分析、核型分析およびアイソザイム分析により確認されてきた(Fig.1、Table 1)。しかし、その核DNAについての解析はされていなかった。本研究ではサザンブロット分析により5組合せ中4組合せの体細胞雑種の核DNA解析を行った。サザンブロット分析のために用いたプローブはイネの17S、5.8Sおよび25SリボゾームRNA遺伝子(rDNA)ならびにスペーサー部位を含む *pRR217* (Takaiwa *et al.* 1985) である。rDNAのスペーサー部位の塩基配列は植物種間での相同性はないので、サザンブロット分析により異種植物とその雑種を識別することが可能である。

この解析により、体細胞雑種の核DNAの構成についての情報を得ることが本章の目的である。

第2節 材料および方法

1. 供試材料

1). イネとダイズの科間雑種

イネとダイズのプロトプラスト融合により作出された褐色の雑種カルスH1, H2, H3およびH4の4系統、およびその褐色カルス系統H3から継代の過程で分離した緑色カルス系統(G)と白色カルス系統(W)の全6系統から、核およびcpDNAの混合標品を調製して、分析に供試した。また、融合に用

いた両親として、プロトプラストを単離したイネ系統A-58のサスペンションカルスおよびダイズの胚軸由来カルスから調製した核DNAおよびcpDNAの混合標品を分析に供試した。

2). イネとバーズフット・トレフォイルの科間雑種

イネとバーズフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出された4系統の雑種カルス(H1, H2, H3, およびH4)、ならびに融合に用いた両親として、イネ系統A-58のサスペンションカルスおよびバーズフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから調製した核DNAおよびcpDNAの混合標品を分析に供試した。

3). ダイズとバーズフット・トレフォイルの属間雑種

ダイズとバーズフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出された雑種カルス4系統(H1, H2, H3 およびH4)、ならびに融合に用いた両親として、ダイズの品種Harosoyとバーズフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから核DNAおよびcpDNAの混合標品を調製し分析に供試した。

4). バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種

バーズフット・トレフォイルとアルファルファのプロトプラスト融合により作出された雑種カルス1系統と、融合に用いた両親として、バーズフット・トレフォイルの品種Vikingとアルファルファの品種Rangelanderの胚軸由来カルスから全DNAを調製し分析に供試した。

2. 核DNA画分の調製

両親カルスおよび雑種カルスの核DNA画分は、改良したMilligan(1989)の方法により調製した。2-3gのカルスを、4-6倍量の氷冷したcold isolation buffer(1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1% 2-mercaptoethanol)中で磨碎して一重のミラクロスで濾過した後に、濾液を4℃, 3000×gで10分間遠心した。上澄みに1/10量の10% CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide)を加えて60℃で15分間処理した。その後、等量のクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)と混和し、室温で1500×gで10分間遠心した。水層に2/3倍量の氷冷したイソプロパノールを加えて、-20℃, 30分間処理した後に、3000×gで10分間遠心して、得られた沈殿をTE緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解し、核DNAとcpDNAの混合標品とした。

また、全DNAの調製はVaradarajan and Prakash(1991)の方法によった。2-3gのカルスを液体窒素で凍結させて乳鉢で粉末状に磨碎した。140μlの2-mercaptoethanolと1mlの10% SDSを加えたisolation buffer(100mM Tris-HCl pH7.4, 50mM EDTA pH8.0, 500mM NaCl)を加えて65℃で15分間保温した後に、340μlの5M potassium acetateを加えて混和し、-20℃で15分間冷却した。その後25000×gで20分間遠心して、上澄みに350μlの氷冷したisopropanolを7ml加えて静かに混和して-20℃で30分間冷却した。20000×gで20分間遠心して生じた沈殿をTE-1緩衝液(50mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH8.0)に溶解し、25000×gで1分間遠心した後に、TE緩衝液(50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA)に溶解した。

3. 制限酵素処理および電気泳動

1-2 μ gの核DNAおよびcpDNAの混合標品あるいは全DNAに5-20ユニットの制限酵素を加えて37°Cで3時間から終夜処理した。DNAの制限酵素消化物はTPE緩衝液中の0.8%アガロースゲルで16V、15時間の泳動を行った。

4. DNAプローブの標識

イネの17S、5.8Sおよび25SリボソームRNA遺伝子とその間のスペーサー領域を含むDNA断片 *pRR217* を核プローブとして用いた。DNAプローブの標識にはECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム(Amersham)を用いた。10 μ lのTE溶液に溶解した0.1 μ gのDNAを5分間煮沸後、氷浴上で5分間急冷して熱変性した後、キット内の標識試薬とグルタルアルデヒド溶液をそれぞれ等量ずつ加えてよく混和し、37°Cで10分間保温して標識を行った。

5. サザンブロット分析

アガロースゲル中で分画されたDNA断片を変性溶液(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)中で20分間、中和溶液(0.5M Tris, 0.5M NaOH pH 7.5)中で30分間処理した。その後、ゲルをトランスファー台にのせて20×SSC(3M NaCl, 0.3M sodium citrate)によるサザンブロッキングを一晩行った。DNAは、0.4M NaOHによりナイロンメンブラン(Hybond-N⁺, Amersham)上に固定された。アルカリ固定後のメンブランを0.5% ブロッキング試薬(Amersham)および0.5M NaClを加えたゴールドハイブリダイゼーション緩衝液(Amersham)中で42°C、30分以上保温した後、プローブDNAを加えて終夜ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブランを42°Cの一次洗浄緩衝液(6M urea, 0.4% sodium dodecylsulfate, 0.5×SSC)中で20分間、さらに室温の二次洗浄緩衝液(2×SSC)中で5分間、

それぞれ2回ずつ洗浄した後、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング検出システム(Amersham)を用いてシグナルの検出を行った。システム中の検出試薬1および2を等量混和したものをメンブランに1分間かけて発光させた後、X線フィルムに感光させた。

第3節 結果

1. 科間体細胞雑種の核DNAの解析

1) イネとダイズの科間雑種

褐色の雑種カルス4系統(H1, H2, H3およびH4)と、緑色カルス系統Gと白色カルス系統W、ならびに両親のカルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を *Bam*HI で処理し、*pRR217* をプローブとしたサザンブロット分析を行った。その結果、イネでは3本の断片(9.0kb, 5.2kbおよび3.9kb)、ダイズでは7本の断片(8.4kb, 7.2kb, 7.0kb, 5.0kb, 3.6kb, 3.2kbおよび2.6kb)の断片がみられた。雑種カルス6系統中5系統はダイズ由来の断片を7本もっていたが、G系統ではダイズの7本の断片中5.0kbが欠失していた(Fig.2, Table 2)。

2) イネとバースフット・トレフォイルの科間雑種

雑種カルス4系統と両親のカルスから調製した核DNAとcpDNAの混合標品を *Bam*HI 或いは *Eco*RI で処理し、*pRR217* をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、*Bam*HI で処理した場合、イネには3本の断片(9.2kb, 4.9kbおよび3.7kb)がみられ、バースフット・トレフォイルには4本の断片(11.5kb, 8.8kb, 6.4kbおよび2.9kb)がみられた。また *Eco*RI で処理した場合には、イネでは9.0kbの断片が1本みられた。バースフット・トレフォイルでは4.0kbと3.7kbの2本の断片がみられた。雑種カルス

4系統は、全てバースフット・トレフォイルと同一のパターンを示した (Fig.3, Table 3)。

2. 属間体細胞雑種の核DNAの解析

1) ダイズとバースフット・トレフォイルの属間雑種

雑種カルス4系統 (H1, H2, H3およびH4)ならびに両親のカルス系統から調製した核DNAとcpDNAの混合標品を供試した。 *Bam*HIで処理し、 *pRR217*をプローブとしたサザンブロット分析を行った結果、ダイズでは7本 (7.4kb, 6.6kb, 6.3kb, 5.0kb, 3.7kb, 2.55kbおよび0.4kb)の断片がみられ、バースフット・トレフォイルでは6本 (11.0kb, 9.5kb, 8.0kb, 7.1kb, 2.65kbおよび0.45kb)の断片がみられた。雑種カルス4系統は全てバースフット・トレフォイルと同一の断片パターンを示した (Fig.4, Table 4)。

2) バースフット・トレフォイルとアルファルファの属間雑種

雑種カルス (H)と両親のカルス系統から調製した全DNAを *Bam*HIで処理し、 *pRR217*をプローブとしたサザンブロット分析を行った。その結果、バースフット・トレフォイルでは9本 (10.1kb, 9.0kb, 7.4kb, 7.2kb, 6.5kb, 6.0kb, 4.0kb, 2.7kbおよび0.4kb)の断片がみられ、アルファルファでは9本 (11.0kb, 9.4kb, 8.0kb, 7.8kb, 6.8kb, 6.6kb, 4.0kb, 2.9kbおよび0.4kb)の断片がみられた。雑種カルスは、バースフット・トレフォイル由来の9本の断片中、6.5kb断片が欠失していた。更にアルファルファ由来と考えられる6.8kb断片がみられた (Fig.5, Table 5)。

第4節 考察

イネとマメ科の科間及びマメ科の属間の5組合せの体細胞雑種の核内において、いずれか一方の染色体が消失する傾向にあることが、アイソザイム分析 (Niizeki *et al.* 1985) や核型分析 (Niizeki and Saito 1989; Niizeki *et al.* 1990, 1992a,b) で明らかにされてきた。本研究では、核DNAのサザンブロット分析による解析を行った。その結果、イネとダイズの雑種カルスG系統、およびバースフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルスでDNA断片の欠失が確認された。さらにバースフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルスでは、両親由来の断片の混在も見られた。しかし、その他の3組合せの雑種カルス系統の断片パターンは、それぞれの核内で染色体が残される側の親と同一であった。これは、3組合せの体細胞雑種において片親の染色体が完全に消失したか、或いは、残っていたとしてもrDNA遺伝子の座乗する染色体が消失したことを示唆する。このように体細胞雑種の核内において片親の染色体が消失する現象はよく知られている (Kao 1977; Wetter 1977; Krumbiegel and Schieder 1981; Chien *et al.* 1982)。

一方、Parokonny *et al.* (1992) は *Nicotiana plumbaginifolia* と *N. sylvestris* の非対称細胞融合雑種において、どちらか一方の親の全DNAをビオチン標識によりプローブとし、他方の親の全DNAをブロックングDNAとして、ゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (GISH) を行った。その結果、両親のゲノム間で染色体同士での転座を起こしていることを明らかにした。

イネとダイズの雑種カルスG系統では、ダイズ由来の7本の断片のうち1本の断片が欠失していた。これは、rDNAの座乗する染色体の一部が切断して生じたものと考えられる。更に、バースフット・トレフォイルとア

ルファルファの雑種カルス系統では、バースフット・トレフォイル由来断片の欠失と同時にアルファルファ由来と考えられる断片も見られた。従って、これらの染色体部位において、転座が生じている可能性がある。今後はGISH法等を用いて、体細胞雑種の両親ゲノム間の染色体転座の可能性を調査することが望まれる。

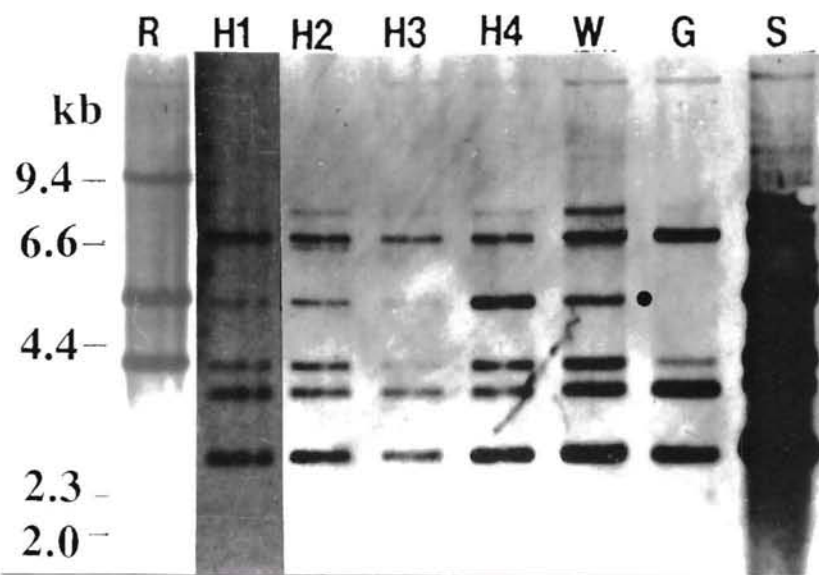


Fig. 2. Southern blot of DNAs of four somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3 and H4) and hybrid white(W) and green(G) cell lines between rice and soybean, and their parental rice (R) and soybean (S) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with rDNA as *pRR217*. Dot indicates the deletion of soybean fragment.

Table 2. Restriction fragment length polymorphisms of nuclear DNAs in somatic hybrid cell lines (H1,H2,H3 and H4) and white (W) and green (G) hybrid cell lines between rice and soybean, and their parental rice (R) and soybean (S) cell lines probed with *pRR217*

Hybridized fragments*	Cell lines							
	R	H1	H2	H3	H4	W	G	S
<i>Bam</i> HI								
9.0	+							
8.4		+	+	+	+	+	+	+
7.2		+	+	+	+	+	+	+
7.0		+	+	+	+	+	+	+
5.2	+							
5.0		+	+	+	+	+		+
3.9	+							
3.6		+	+	+	+	+	+	+
3.2		+	+	+	+	+	+	+
2.6		+	+	+	+	+	+	+

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

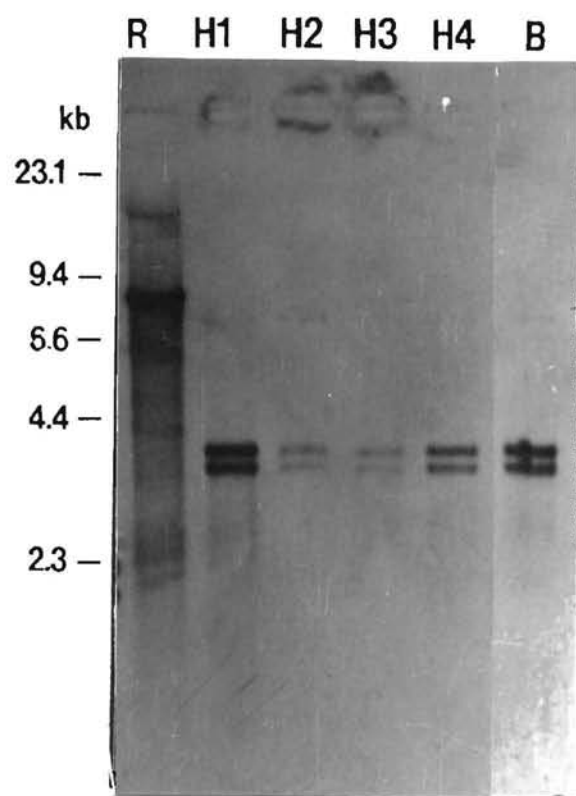


Fig. 3. Southern blot of DNAs of four somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3 and H4) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice(R) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Eco*RI and hybridized with rDNA as *pRR217*. The banding patterns of four hybrid cell lines were identical with that of birdsfoot trefoil.

Table 3. Restriction fragment length polymorphisms of nuclear DNAs in somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3 and H4) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice (R) and birdsfoot trefoil (B) cell lines probed with *pRR217*

Hybridized fragments*	Cell lines					
	R	H1	H2	H3	H4	B
<i>Bam</i> HI						
11.5		+	+	+	+	+
9.2	+					
8.8		+	+	+	+	+
6.4		+	+	+	+	+
4.9	+					
3.7	+					
2.9		+	+	+	+	+
<i>Eco</i> RI						
9.0	+					
4.0		+	+	+	+	+
3.7		+	+	+	+	+

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

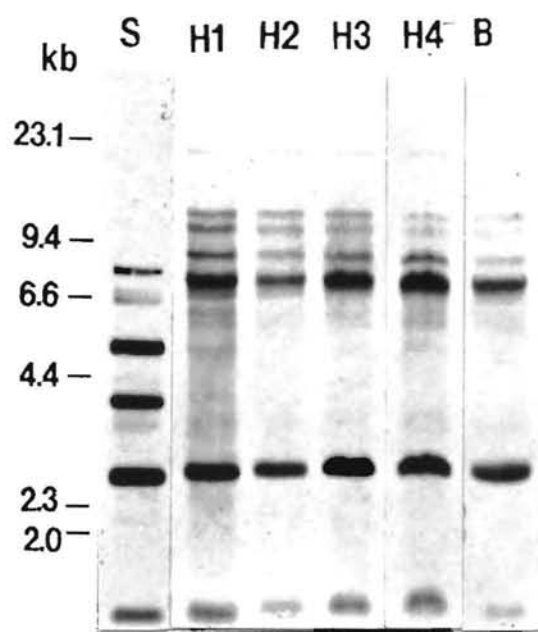


Fig. 4. Southern blot of DNAs of four somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3 and H4) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean(S) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. Nuclear- and cpDNA mixtures of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with rDNA as *pRR217* . The banding patterns of four hybrid cell lines were identical with that of birdsfoot trefoil.

Table 4. Restriction fragment length polymorphisms of nuclear DNAs in somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3 and H4) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean (S) and birdsfoot trefoil (B) cell lines probed with *pRR217*

Hybridized fragments*	Cell lines				
	S	H1	H2	H3	H4 B
<i>Bam</i> HI					
11.0		+	+	+	+
9.5		+	+	+	+
8.0		+	+	+	+
7.4					
7.1	+	+	+	+	+
6.6					
6.3	+				
5.0	+				
3.7	+				
2.65		+	+	+	+
2.55	+				
0.45		+	+	+	+
0.4	+				

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

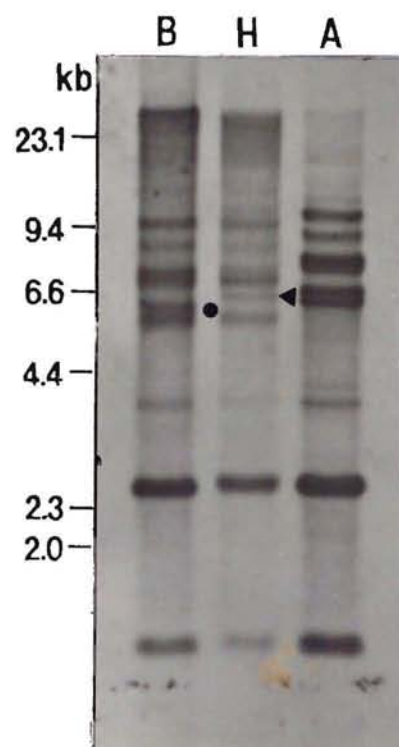


Fig. 5. Southern blot of DNAs of a somatic hybrid cell line(H) between birdsfoot trefoil and alfalfa, and its parental birdsfoot trefoil (B) and alfalfa(A) cell lines. Total DNAs of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with rDNA as *pRR217*. Deletion of birdsfoot trefoil fragment and co-migrated fragment with that of alfalfa are indicated by dot and arrowhead, respectively.

Table 5. Restriction fragment length polymorphism of nuclear DNAs in a somatic hybrid cell line (H) between birdsfoot trefoil and alfalfa, and their parental birdsfoot trefoil (B) and alfalfa (A) probed with *pRR217*

Hybridized fragments*	Cell lines		
	B	H	A
<i>Bam</i> HI			
11.0			+
10.1	+	+	
9.4			+
9.0	+	+	
8.0			+
7.8			+
7.4	+	+	
7.2	+	+	
6.8		+	+
6.6			+
6.5	+		
6.0	+	+	
4.0	+	+	+
2.9			+
2.7	+	+	
0.4	+	+	+

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.