

第4章 体細胞雑種のmtDNAの解析

第1節 緒言

ミトコンドリアはエネルギー合成に重要な役割を持つオルガネラであり、自己のDNAを持っている。mtDNAには、タンパク質合成に必要なリボソームRNAやtRNAの他、酸化リン酸化や電子伝達系を触媒する酵素複合体の遺伝子などがコードされている。多くの高等植物において、ミトコンドリアは母性遺伝するため、有性交雑によって異種のmtDNAは混じり合うことはない。しかし、体細胞雑種においてはmtDNAの組換えが生じることが知られている(Belliard *et al.* 1979; Nagy *et al.* 1981; Chetrit *et al.* 1985; Rothenberg *et al.* 1985; Kemble *et al.* 1986; Morgan and Maliga 1987; Ozias-Akins *et al.* 1987; Honda and Hirai 1990)。

本章では、3種のミトコンドリア遺伝子クローンをプローブとしてサザンブロット分析を行い、イネとマメ科植物の科間およびマメ科植物の属間の5組合せの体細胞雑種のmtDNAに組換えなどの改変が生じているかを調査した。

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体細胞雑種

イネとダイズのプロトプラスト融合により作出された雑種カルスは、H1, H2, H3およびH4の4系統の褐色カルスと、その褐色カルス系統H3から継代の過程で分離した緑色および白色のカルス系統であるGとWの6系統からmtDNA画分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、およびダイズの品種Harosoyの胚軸由来カルスから調製したmtDNA画分を分析した。

2). イネとバースフット・トレフォイルの科間体細胞雑種

イネとバースフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出されたH1, H2, H3, H4, H5およびH6の雑種カルス6系統、ならびに融合に用いた両親の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バースフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから調製したmtDNA画分を分析した。

3). イネとアルファルファの科間体細胞雑種

イネ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(H)と、そのカルスから継代の過程で分離した緑色(G)および黄色(Y)の3系統ならびに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とアルファルファの品種DuPuitの胚軸由来カルスから調製したmtDNA画分を分析した。

4). ダイズとバースフット・トレフォイルの属間体細胞雑種

ダイズとバースフット・トレフォイルのプロトプラスト融合により作出されたH1, H2, H3, H4, H5, H6, H7およびH8の雑種カルス8系統、および融合に用いた両親のプロトプラストを単離したダイズ品種Harosoyの胚軸由来カルスとバースフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスから調製したmtDNA画分を分析した。

5). バーズフット・トレフォイルとアルファルファの属間体細胞雑種

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(H)と、融合に用いた両親のプロトプラストを単離したバーズフット・トレフォイルの品種Vikingの胚軸由来カルスおよびアルファルファの品種Rangelanderの胚軸由来カルスから抽出した全DNAを分析に供試した。

2. mtDNA画分の調製

両親カルスおよび雑種カルスのmtDNA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、濾液を4°C, 3000×gで10分間遠心した。生じた沈澱を、cold isolation bufferで懸濁して4°C, 3000×gで再び10分間遠心してミトコンドリア沈澱物を得た。この沈澱を10mlのcold isolation bufferで再懸濁し、1mlの10% CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide)を加えて、60°C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, 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°Cで30分間処理した後、3000×gで10分間遠心して得られたmtDNAの沈澱をTE緩衝液(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)に溶解した。

バーズフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルスの場合には全DNAを解析に用いた。この全DNAの調製法については第3章に詳述した。

3. 制限酵素処理および電気泳動

1-2 μ gのmtDNA画分に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時間の電気泳動を行った。

4. DNAプローブの標識

両親と雑種カルス^sのmtDNA解析のためのプローブとして3種類のミトコンドリア遺伝子、F₁ATP合成酵素サブユニット α 遺伝子 *atpA*、シトクロム酸化酵素サブユニット1遺伝子 *cox1*および26SリボソームRNA遺伝子 *rrn26*を用いた。プローブDNAの標識法は第3章に詳述した。

5. サザンプロット分析

サザンプロットハイブリダイゼーション法については、第3章に詳述した方法と同じである。

第3節 結果

1. 科間体細胞雑種のmtDNA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)とそのカルスから分離した緑色カルスG系統と白色カルスW系統のmtDNA画分のサザンプロット分析の結果、雑種カルスの断片パターンは各系統ともにダイズ型を示したが、一部でダイズと同サイズの断片の欠失やイネと同サイズの断片が見られた。BamHIで消化して *rrn26*をハイブリダイズさせたプロットのH1, H2, H4およびw系統で7.0kb, H2およびG系統で3.5kbのダイズ断片が欠失していた。また、同プロットで両親にはない新たな断片がみられた系統は、主要なDNA断片だけでもH1系統に9.4kbと8.0kb, H1, H3およびH4系統に

7.2kb, H2系統に6.6kbがあり、9.4kb以上の断片については非常に複雑であったため解析が困難であった。さらにイネと同位置にハイブリダイズする7.6kbのDNA断片がG系統でみられた(Fig.6, Table 6)。EcoRIで消化して*cox1*をプローブとしたプロットでは7.0kb, *SmaI*で消化して*cox1*をプローブとしたプロットでは12.8kbのイネと同位置にハイブリダイズする断片がW系統でみられた(Table 7)。

褐色の雑種カルス4系統のmtDNA画分の6制限酵素と3プローブの18組合せのサザンプロットにおいて、融合親にはない新たな断片の出現率は77.8%であった。しかし、イネと同位置にハイブリダイズするDNA断片はみられなかった。一方、W系統の18プロットにおける新たな断片の出現率は44.4%、イネと同位置にハイブリダイズする断片の出現率は11.1%であり、G系統の18プロットにおける新たな断片の出現率は38.9%、イネと同位置にハイブリダイズする断片の出現率は5.6%であった(Table 7)。

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6系統(H1, H2, H3, H4, H5およびH6)ならびに融合に用いたイネとバースフット・トレフォイルの親カルスから調製したmtDNA画分は、*BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *SmaI*, *SaII*および*PstI*の6種類の制限酵素で処理した。3種類のミトコンドリア遺伝子をコードする*atpA*, *rrn26*および*cox1*をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、雑種カルスはおおむねがバースフット・トレフォイルと同じバンドパターンを示した。しかし*atpA*と*rrn26*をプローブに用いたとき、H1系統には、両親にはない新たな断片がみられた(Fig.7, Table 8, Table 9)。特に*atpA*をプローブとして用いたときに新しいDNA断片が多く確認された(Table 9)。このことから、H1系統の*atpA*遺伝子かあるいはその周辺にDNAの変異が生じていると推定された。そこで、*atpA*を*BamHI*で切断した左側部分(以下

atpA-Lと表す)と右側部分(以下 *atpA*-Rと表す)を用いて、さらに解析した (Fig.8)。両親とH1系統のmtDNA画分を *Hind*IIIで消化し、*atpA*、*atpA*-L および *atpA*-Rのそれぞれをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。*atpA*をプローブとした場合には、イネの3.5kb断片、H1系統とバースフット・トレフォイルの7.6kb断片および10.7kb断片、ならびにH1系統に特異的な9.1kb断片がみられた。また、*atpA*-Lをプローブにした場合にも同じ断片が全て観察された。しかし、*atpA*-Rをプローブとした場合には、イネの3.5kb断片およびH1系統とバースフット・トレフォイルに共通の7.6kb断片のみが観察された。このことから、イネの3.5kb断片とバースフット・トレフォイルの7.6kb断片は *atpA* 遺伝子を完全な形で持つが、H1系統とバースフット・トレフォイルに共通な10.7kb断片と、H1系統に特異的な9.1kb断片は、*atpA*-L部分しか持たないことが明らかになった。

次に、H1系統と両親のmtDNA画分を *Bam*HIと *Hind*IIIで消化し、*atpA*をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、イネでは1.8kbと1.6kbの断片がみられた。そしてその両断片はそれぞれ *atpA*-Lと *atpA*-Rとにハイブリダイズした。H1系統とバースフット・トレフォイルでは、*atpA*をプローブとしたときに5.4kb、4.6kb、2.2kbの断片がみられ、そのうち *atpA*-Rにハイブリダイズする断片は2.2kbのみであった。このことから、H1系統とバースフット・トレフォイルに共通の7.6kb断片は、*atpA*を完全な形で持つが、H1系統とバースフット・トレフォイルに共通の10.7kb断片は *atpA*-L部分しか持たないことが推測された (Fig.9)。

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の雑種カルスのサザンプロット分析を行った。褐色の雑種カルス(H)と、そのカルスから分離した緑色(G)と黄色(Y)のカ

ルスのmtDNAサザンプロットの断片パターンは、アルファルファのそれに近いものであったが、*Hind*IIIで消化し*rrn26*をプローブとしたプロットで、G系統では6.4kbおよび1.7kb、Y系統では2.3kbの新たな断片がみられた(Fig.10, Table 10)。またG系統では、*Hind*IIIで消化し*rrn26*をプローブとしたプロットで5.3kb、*Eco*RIで消化し*rrn26*をプローブとしたプロットでは、イネと同サイズの7.1kb断片がみられた。

3制限酵素と3プローブの9組合せのプロットで、アルファルファと同サイズおよびイネと同サイズの断片がそれぞれ88%および30%出現した。また、両親にない新たな断片の出現率は63%であった(Table 11)。

2. 属間体細胞雑種のmtDNA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8系統(H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7およびH8)のサザンプロット分析を行った。雑種カルスと両親カルスのmtDNA画分を*Pst*Iで消化し、*atpA*をプローブとしたサザンプロットでは、ダイズでは12.5kb, 11.0kb, 9.6kbおよび6.1kbの断片がみられ、バースフット・トレフォイルでは19.5kb, 15.0kb, 8.0kbの断片がみられた(Fig.11, Table 12)。H2系統では、バースフット・トレフォイルの断片に加え、両親にはない8.8kbの断片がみられた。

しかし、他のサザンプロットの場合にはH2系統だけでなく、H1およびH8系統にも新たなDNA断片がみられた(Table 13)。

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

雑種カルスと両親のmtDNA画分を*Bam*HIで処理し、3ミトコンドリア遺伝子、*atpA*, *rrn26*および*cox1*をプローブとしたサザンプロット分析を行っ

た。その結果、*atpA*をプローブとしたときにはバースフット・トレfoilには3本のDNA断片(6.6kb, 4.8kbおよび1.5kb)がみられ、アルファルファでは7本の断片(10.5kb, 9.0kb, 5.6kb, 3.8kb, 2.1kb, 1.6kbおよび1.4kb)がみられた。*rrn26*をプローブとしたときには、バースフット・トレfoilには2本の断片(7.4kb, 4.9kb)がみられ、アルファルファには2本の断片(6.8kbおよび3.6kb)がみられた。*cox1*をプローブとしたときには、バースフット・トレfoilには2本の断片(6.4kbおよび2.6kb)がみられ、アルファルファには2本の断片(6.8kbおよび2.6kb)がみられた。いずれの場合にも、雑種はバースフット・トレfoilと同じ断片パターンを示した(Fig.12, Table 14)。

第4節 考察

イネとマメ科植物の科間およびマメ科植物の属間体細胞雑種カルスのmtDNAをサザンブロットにより解析した。その結果、イネとダイズ、イネとバースフット・トレfoilおよびイネとアルファルファの科間ならびにダイズとバースフット・トレfoilのマメ科の属間の4組合せの体細胞雑種カルスのmtDNAに、両親の断片の混在や欠失、新たな断片の出現等が見いだされた。従ってこれらの雑種カルスのmtDNAに、組換えや再構成が生じていることが示唆される。Kemble *et al.* (1988)は、300個体の *Brassica napus* の体細胞雑種でmtDNAの再構成が生じないことを報告している一方、体細胞雑種のmtDNAにおいては組換えや再構成が生じることが多くの研究者により報告されている(Belliard *et al.* 1979; Nagy *et al.* 1981; Chetrit *et al.* 1985; Rothenberg *et al.* 1985; Kemble *et al.* 1986; Morgan and Maliga 1987; Ozias-Akins *et al.* 1987)。Nagy *et al.* (1983)は、*Nicotiana*属のプロトプラスト培養や再分化に

よって、mtDNAの再構成が引き起こされなかったことから、細胞融合により生じるヘテロプラスミックな状態がmtDNAの再構成には必要な条件であるとしている。一方、mtDNAの再構成は細胞培養の条件のみでも生じるとの報告もある(Gengenbach *et al.*, 1981; McNay *et al.*, 1984; Kemble and Shepard 1984; Brears *et al.*, 1989; Hartmann *et al.*, 1989; Shirzadegan *et al.*, 1989)。Shirzadegan *et al.* (1989)は植物組織内に既に存在している潜在的なDNA分子(subliminal molecules)が、細胞培養の様な例外的な環境条件により増幅されるとしている。

本研究で解析した雑種カラスのmtDNAに再構成が生じた要因としては、以下の3点が挙げられる。

- 1) 両親のミトコンドリアゲノムDNA間の組換え
- 2) 片親のミトコンドリアゲノムDNA内の組換え
- 3) subliminal moleculesの増幅

イネとパースフット・トレフォイル、およびその体細胞雑種H1系統の*atpA*遺伝子近傍の解析により、H1系統に特異的な9.1kbDNA断片とパースフット・トレフォイルに存在する10.7kb断片とは*atpA*遺伝子の中央付近の*Bam*HI制限部位から左部分のみを持つことが示された(Fig.10)。従ってこのH1系統の9.1kbDNA断片は、10.7kb断片が何らかの改変を受けて生じたものと推測される。Honda and Hirai (1990)は*Nicotiana glauca*と*N. langsdorffii*の体細胞雑種のmtDNAが*atpA*遺伝子領域付近で組換えを起こしていることを示し、相同性の高い*atpA*遺伝子領域付近が普遍的な組換えの場を提供していることを示唆している。本研究における、イネとパースフット・トレフォイルの体細胞雑種H1系統に特異的な9.1kbDNA断片も、*atpA*遺伝子領域付近で両親あるいは片親のmtDNAの組換えにより作り出されたものと考えられる。

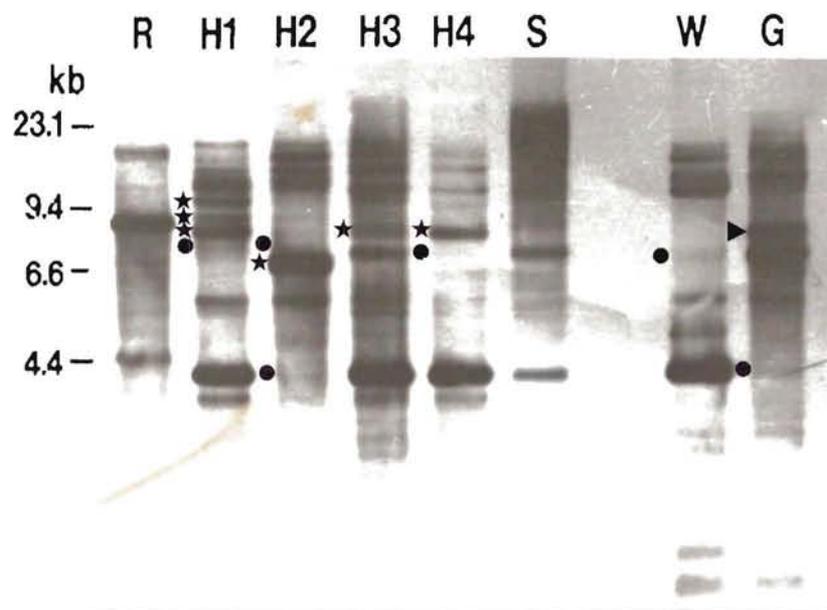


Fig. 6. Southern blot of DNAs of four somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3 and H4) and hybrid white(W) and green(G) cell lines between rice and soybean, and their parental rice (R) and soybean(S) cell lines. mtDNA fractions of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam* HI and hybridized with *rrn26*. The unique fragments, deletion of soybean fragments and co-migrated fragments with those of rice are indicated by stars, dots and arrowhead, respectively.

Table 6. Restriction fragment length polymorphisms of mtDNAs 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 *rrn26*

Hybridized fragments*	Cell lines							
	R	H1	H2	H3	H4	W	G	S
<i>Bam</i> HI								
9.4		+						
8.0		+						
7.6			+				+	
7.2		+		+	+			
7.0				+			+	
6.6						+		
4.4		+						
3.5			+	+	+	+		+

*:Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

Table 7. Identification of mtDNA fragments of Southern blotting in somatic hybrid cell lines of rice and soybean

Probe	EcoRI			BamHI			Restriction enzyme																	
	1	2	3	1	2	3	HindIII			PstI			SmaI			SalI								
Original hybrid callus	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
White callus	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Green callus	S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Original hybrid callus was brown, and white and green callus were segregated from the original hybrid callus. S and R : The same size of fragments as those of soybean and rice, respectively. N : novel fragment. 1, 2 and 3 : *atpA*, *rrn26* and *coxI*, respectively. + : Presence of fragment, - : No fragment.

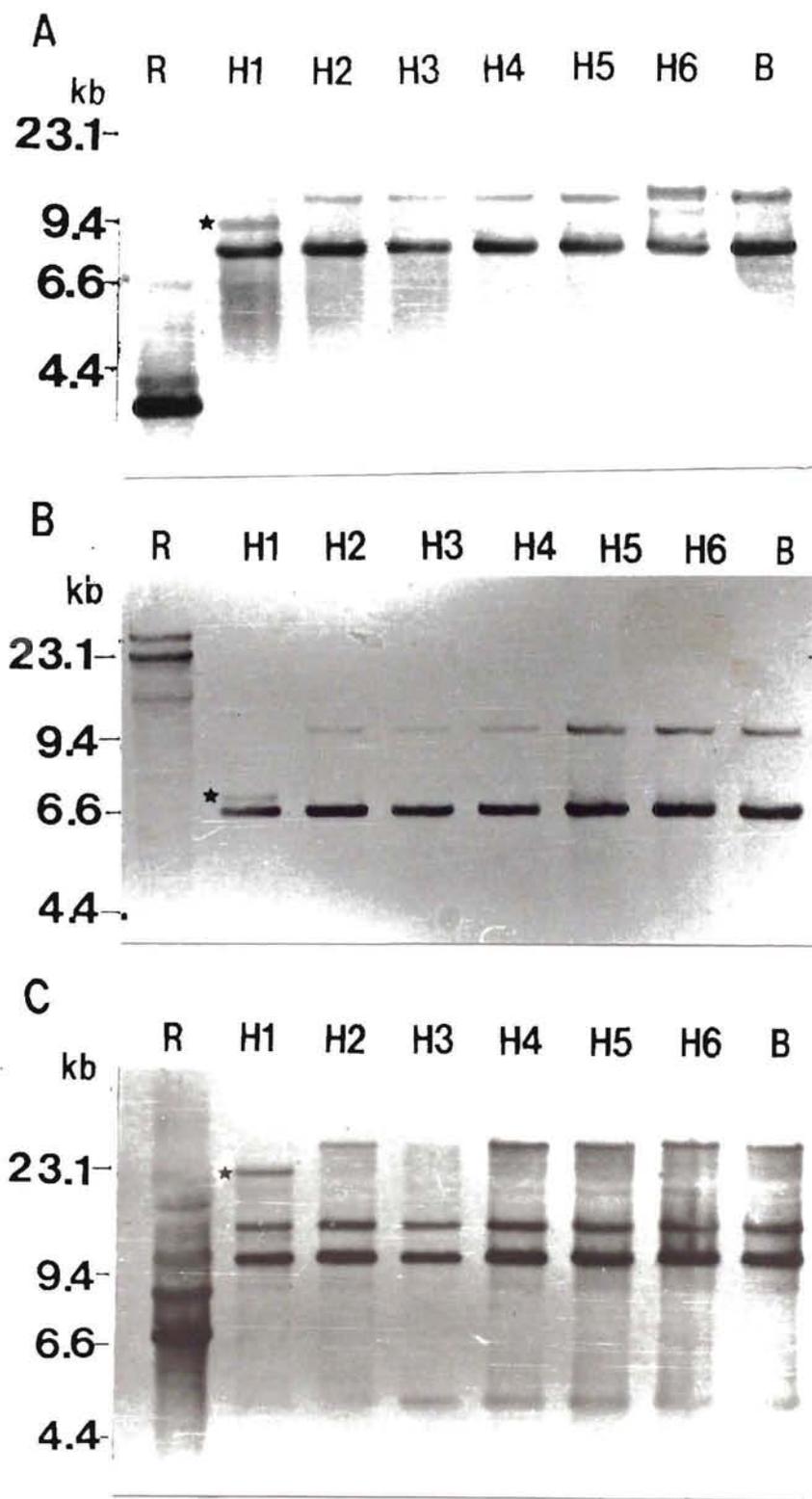


Fig. 7. Southern blot of DNAs of six somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3, H4, H5 and H6) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice(R) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. A: *HindIII* and *atpA*, B: *SmaI* and *atpA*, C: *SalI* and *atpA*. Stars indicate the unique fragments.

Table 8. Restriction fragment length polymorphisms of mtDNAs in somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3, H4, H5 and H6) between rice and birdsfoot trefoil, and their parental rice (R) and birdsfoot trefoil (B) cell lines probed with *atpA*

Hybridized fragments*	Cell lines							
	R	H1	H2	H3	H4	H5	H6	B
<i>Hind III</i>								
10.7		+	+	+	+	+	+	+
9.1		+						
7.6		+	+	+	+	+	+	+
3.5	+							
<i>Sma I</i>								
23.1	+							
19.5	+							
14.0	+							
10.5			+	+	+	+	+	+
7.2		+						
6.6		+	+	+	+	+	+	+
<i>Sal I</i>								
>23.1			+	+	+	+	+	+
23.1		+						
14.2		+	+	+	+	+	+	+
10.1	+	+	+	+	+	+	+	+
10.0								
8.4	+							
6.6	+							

*:Fragment sizes are indicated in kb.

+:Presence of fragment.

Table 9. Southern analysis of mtDNAs in somatic hybrid cell lines of rice and birdsfoot trefoil

Restriction endonucleases	Probes		
	<i>atpA</i>	<i>rrn26</i>	<i>coxI</i>
<i>EcoR</i> I	H1	ND	ND
<i>Bam</i> H I	ND	ND	ND
<i>Hind</i> III	H1	H1	ND
<i>Pst</i> I	ND	ND	ND
<i>Sma</i> I	H1	ND	ND
<i>Sal</i> I	H1	ND	ND

H1 hybrid callus cell line shows that this callus cell line has unique fragments which are different from those of parent. ND : No difference from the fragment pattern of birdsfoot trefoil. The other five callus cell lines did not show any differences from the fragment pattern of birdsfoot trefoil.

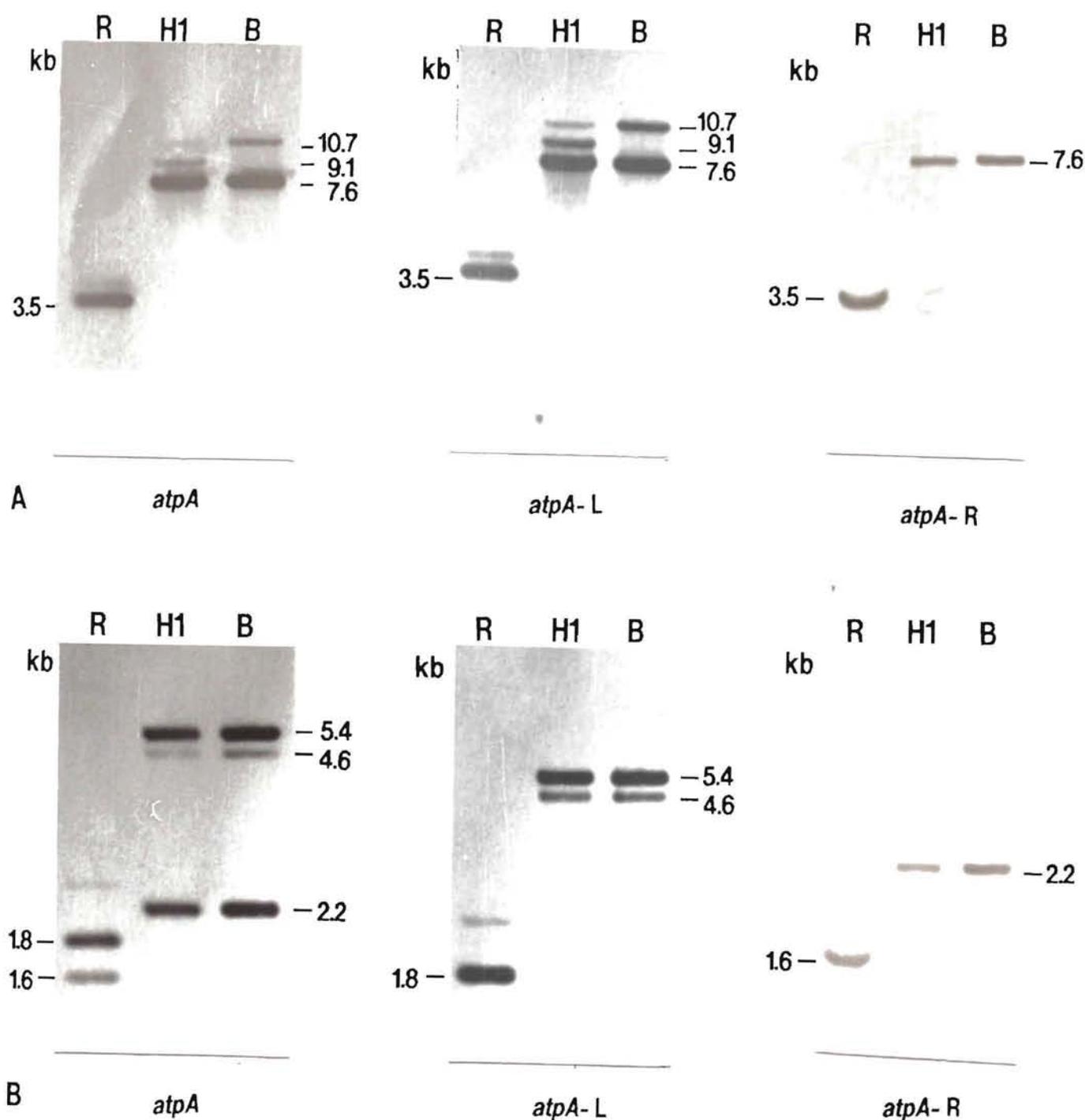


Fig. 8. Hybridization analysis of mtDNA alteration which observed in H1 somatic hybrid cell line between rice and birdsfoot trefoil, and its parental rice(R) and birdsfoot trefoil(B) cell lines . A: mtDNA fractions of H1 and parental cell lines were digested by *Hind*III and hybridized with *atpA*, left side of *atpA* (designated as *atpA-L*) and right side of *atpA* (designated as *atpA-R*). B: mtDNA fractions of H1 and parental cell lines were digested by both *Hind*III and *Bam*HI and hybridized with *atpA*, *atpA-L* and *atpA-R* .

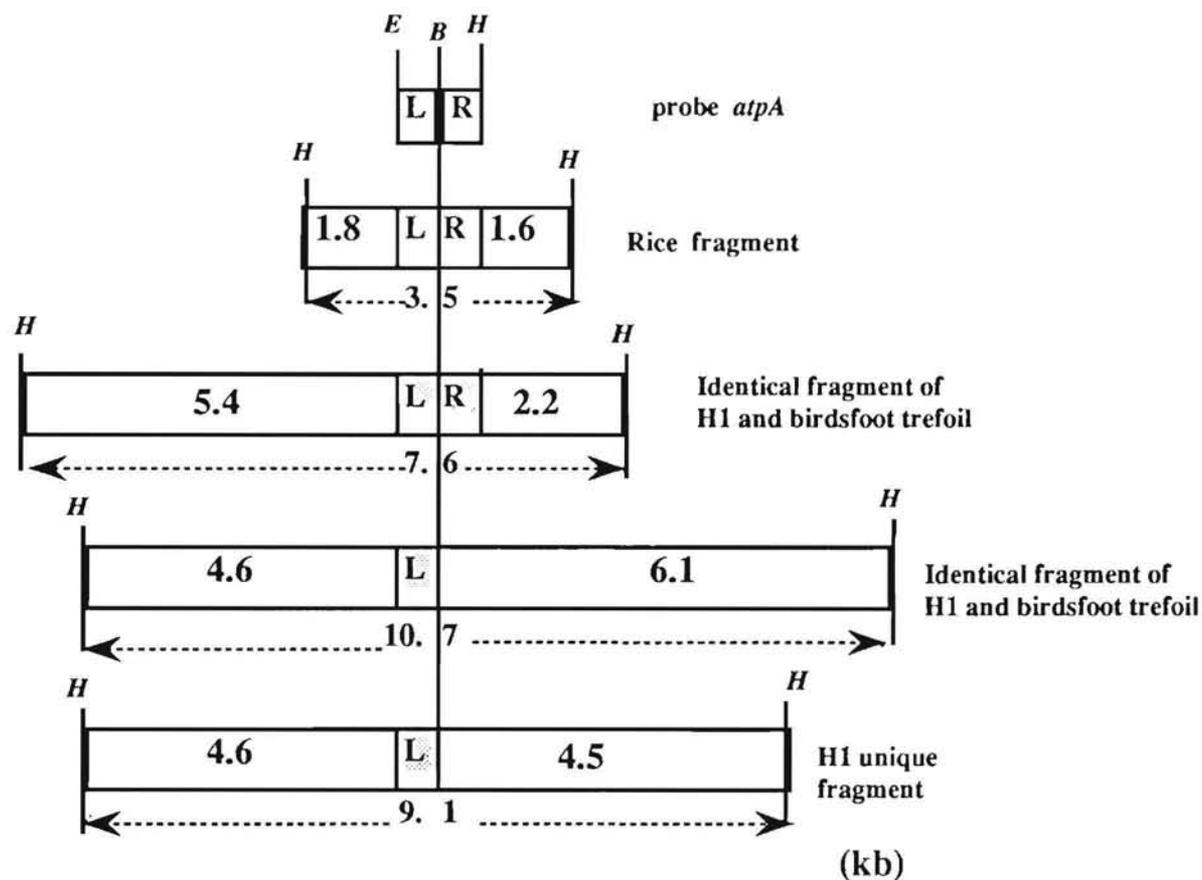


Fig. 9 Putative structure of the rice fragment, identical fragments of H1 and birdsfoot trefoil cell lines and unique fragment of H1 cell line. Both parts of *atpA* gene are included in the 3.5 kb of rice fragment and the 7.6 kb identical fragment of H1 and birdsfoot trefoil cell lines. But the 10.7 kb fragment and the 9.1 kb unique fragment have 4.6 kb fragment with only the left part of *atpA*. *E* : *EcoRI* restriction site, *B* : *BamHI* restriction site, *H* : *HindIII* restriction site.

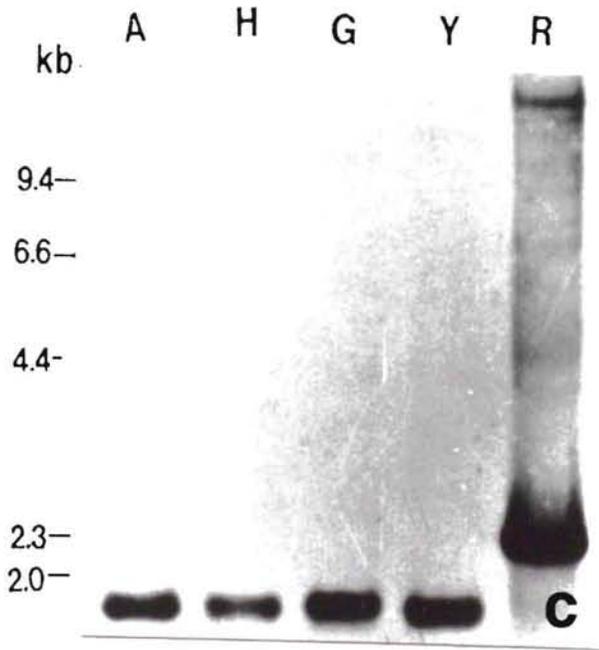
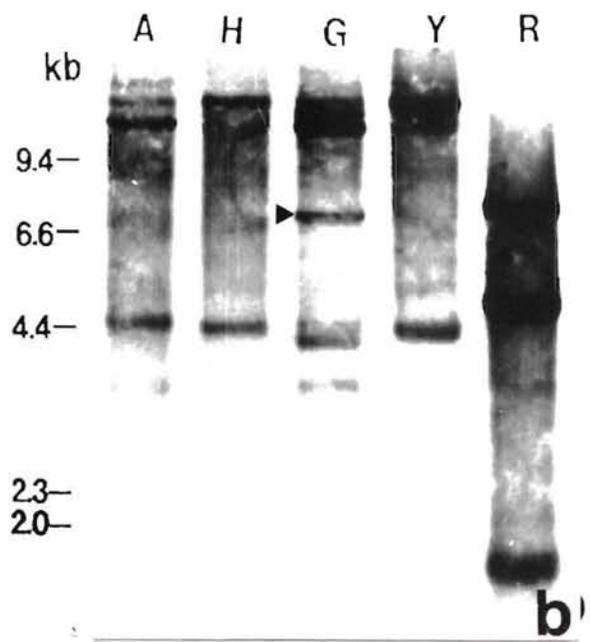
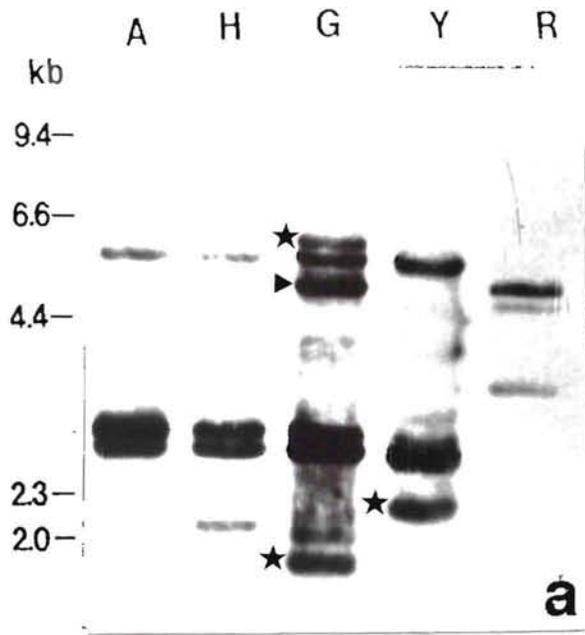


Fig. 10. Southern blots of DNAs of a somatic hybrid cell line(H) and hybrid green(G) and yellow(Y) cell lines between alfalfa and rice, and their parental alfalfa(A) and rice(R) cell lines. a and b, mtDNA fragment pattern of *HindIII* x *rrn26* and *EcoRI* x *rrn26*, respectively.

▶: The same size as rice fragment;
 ★: Novel fragment. In this case DNA in green callus was extracted from the same subcultured callus.
 c. mtDNA fragment pattern of *EcoRI* x *atpA*.

Table 10. Restriction fragment length polymorphisms of mtDNAs in a somatic hybrid cell line (H), hybrid green (G) and yellow (Y) cell lines between rice and alfalfa, and their parental and rice (R) alfalfa (A) cell lines probed with *rnm26*

Hybridized fragments*	Cell lines				
	A	H	G	Y	R
<i>Hind III</i>					
6.4			+		
5.9	+	+		+	
5.4					
5.3			+		+
5.0					+
3.7					+
3.1	+	+	+	+	
2.9	+	+		+	
2.3					
2.1	+	+	+		
1.7					

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

Table 11. Identification of mtDNA fragments of Southern blotting in somatic hybrid cell lines of alfalfa and rice

		Combinations of restriction enzymes and probes											
		<i>Pst</i> I			<i>Hind</i> III			<i>Eco</i> RI					
		<i>atpA</i>	<i>coxI</i>	<i>rrn26</i>	<i>atpA</i>	<i>coxI</i>	<i>rrn26</i>	<i>atpA</i>	<i>coxI</i>	<i>rrn26</i>	<i>atpA</i>	<i>coxI</i>	<i>rrn26</i>
Hybrid callus	A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Green callus	A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	N	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Yellow callus	A	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	N	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-

A and R : The same size of fragments as those of alfalfa and rice, respectively. N : Novel fragment.
 + : Presence of fragment. - : No fragment.

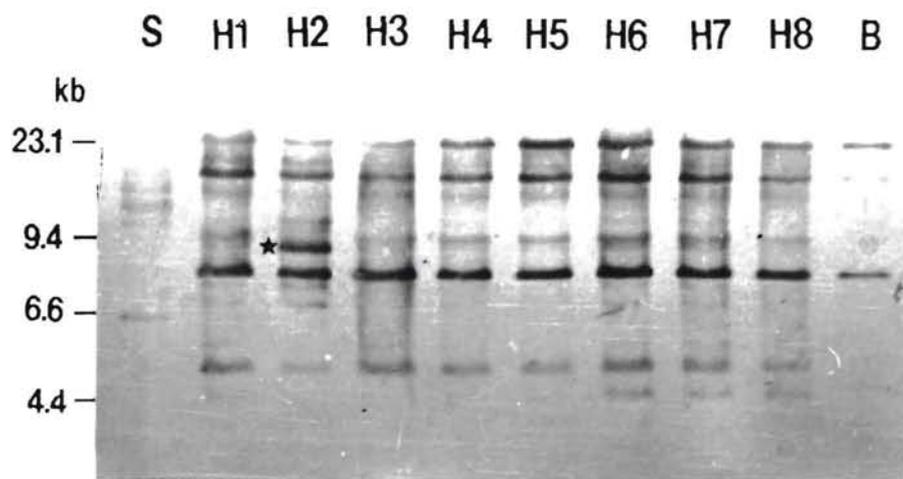


Fig. 11. Southern blot of DNAs of eight somatic hybrid cell lines(H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 and H8) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean(S) and birdsfoot trefoil(B) cell lines. mtDNA fractions were digested by *Pst* I and hybridized with *atpA*. Star indicate the unique fragment.

Table 12. Restriction fragment length polymorphisms of mtDNAs in somatic hybrid cell lines (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 and H8) between soybean and birdsfoot trefoil, and their parental soybean (S) and birdsfoot trefoil (B) cell lines probed with *atpA*

Hybridized fragments*	Cell lines									
	S	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	B
<i>Pst</i> I										
19.5		+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.0		+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5	+									
11.0	+									
9.6	+									
8.8			+							
8.0		+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.1	+									

*: Fragment sizes are indicated in kb.

+: Presence of fragment.

Table 13. Southern analysis of mtDNAs in somatic hybrid cell lines of soybean and birdsfoot trefoil

Restriction endonucleases	Probes		
	<i>atpA</i>	<i>rrn26</i>	<i>coxI</i>
<i>EcoR</i> I	H2	H2	H2
<i>Bam</i> H I	H1, H2, H8	ND	H2
<i>Hind</i> III	H2	ND	ND
<i>Pst</i> I	H2	H2	H2
<i>Sma</i> I	H2	H2	H2
<i>Sal</i> I	H2	H2	H2

H1, H2 and H8 hybrid callus cell lines show that these callus cell lines have unique fragments which are different from those of parent. ND, no difference from the fragment pattern of birdsfoot trefoil. The other five callus cell lines did not show any difference from the fragment pattern of birdsfoot trefoil.

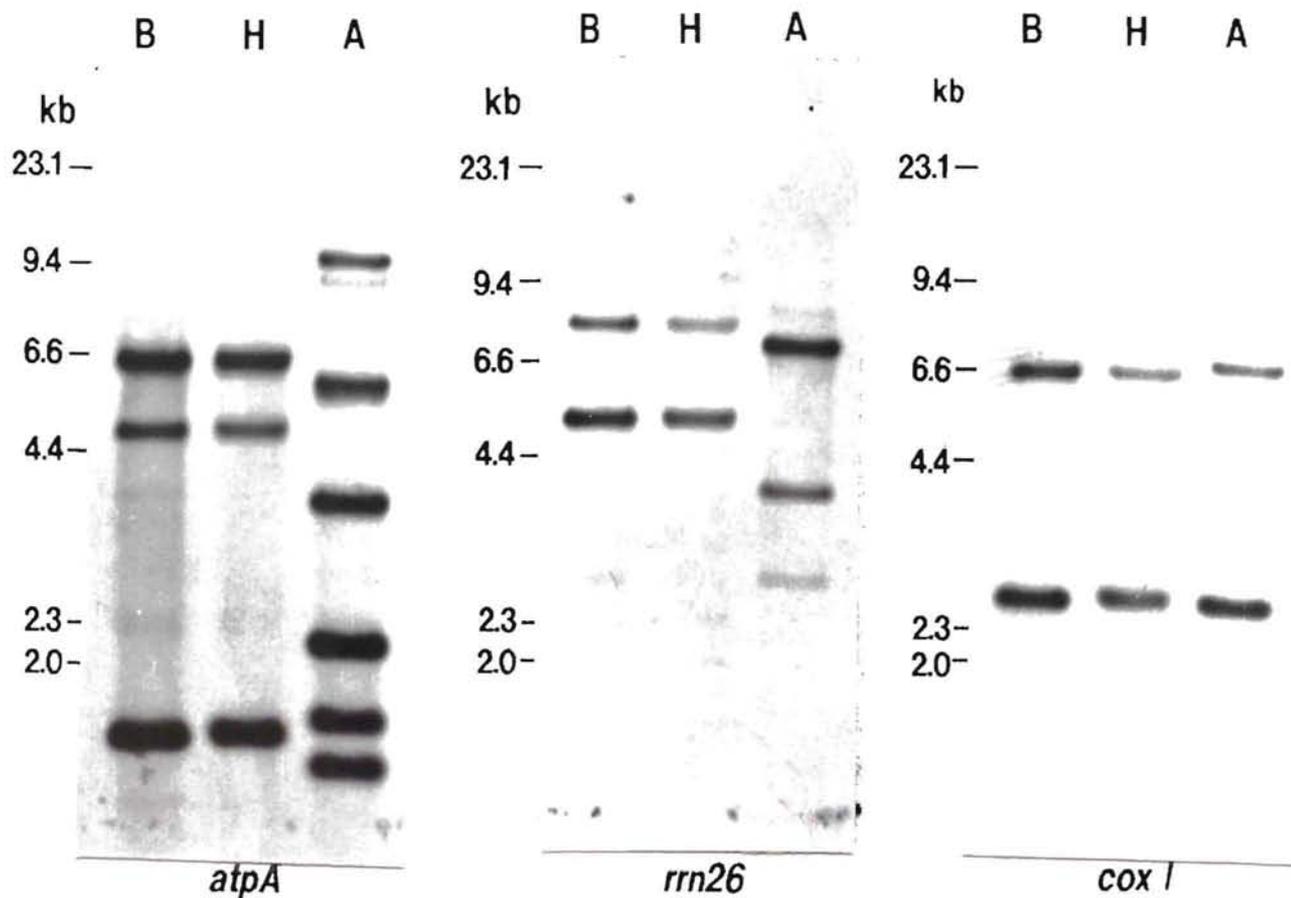


Fig. 12. Southern blots of DNAs of a somatic hybrid cell line(H) between birdsfoot trefoil and alfalfa, and its parental birdsfoot trefoil (B) and alfalfa(A) cell lines. Total DNAs of hybrid and parental cell lines were digested by *Bam*HI and hybridized with three mitochondrial gene probes (*atpA*, *rrn26* and *coxI*). The banding patterns of mtDNA of the somatic hybrid were identical with those of birdsfoot trefoil.

Table 14. Restriction fragment length polymorphisms of mtDNAs in somatic hybrid cell line(H) between birdsfoot trefoil and alfalfa and thier parental birdsfoot trefoil(H) and alfalfa(A) cell lines digested by *Bam*HI

Hybridized fragments*	Cell lines		
	B	H	A
<i>atpA</i>	10.5		+
	9.0		+
	6.6	+	+
	5.6		+
	4.8	+	+
	3.8		+
	2.1		+
	1.6		+
	1.5	+	+
	1.4		+
<i>rrn26</i>	7.4	+	+
	6.8		+
	4.9	+	+
	3.6		+
<i>coxI</i>	6.8		+
	6.4	+	+
	2.6	+	+

*:Fragment sizes are indicated in kb.
 +:Presence of fragment.