

## 第6章 総合考察

イネとマメ科3植物ダイズ、バズフット・トレfoilおよびアルファアルファの間で科間および属間の細胞融合により作出された5組合せの体細胞雑種の核とオルガネラの動向を探ることを目的に核DNA、mtDNAおよびcpDNAの解析を行った。その結果、本研究では以下の4点が明らかとなった。

### 1). 科間および属間体細胞雑種の核DNA

イネとダイズの雑種カルス6系統中1系統でダイズ型DNA断片が1本欠失していた。また、バズフット・トレfoilとアルファアルファの雑種カルス1系統では、バズフット・トレfoil型断片が1本欠失していたが、アルファアルファ型断片が1本添加されていた。これは両親の染色体間で組換えが起こった可能性を示唆する。しかし、サザンブロット解析の結果、多くの場合雑種カルス系統は科間の組合せではマメ科の親の、マメ科植物の属間の組合せではバズフット・トレfoilのDNA断片パターンがみられた。

### 2). 科間および属間体細胞雑種のmtDNA

バズフット・トレfoilとアルファアルファの雑種カルス以外の4組合せの雑種カルスでは、それぞれ数系統のmtDNAに新たな断片の出現や両親型DNA断片の欠失および混在などがみられた。これにより雑種カルスのmtDNAに両親ゲノム間での組換え、あるいはゲノム内での組換えなどが生じたものと考えられる。

### 3). 科間および属間体細胞雑種のcpDNA

5組合せの全ての雑種カルス系統のcpDNAには核と同じ親のDNA断片パターンが観察された。また組換えなどの変異は見いだせなかった。なおサザンブロット分析の際に、イネの葉緑体のゲノミックDNAをプローブに

したにもかかわらず多数の断片が検出される場合があった。これは前に行ったハイブリダイゼーションのプロープが発光してしまったため、または核DNAに存在するcpDNAとの相同配列がハイブリダイズしてしまったためと考えられる。

#### 4).核DNAとオルガネラDNAの構成

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のカルス系統の核DNA、mtDNAおよびcpDNAは、科間にあつてはマメ科の親のゲノム、属間にあつてはバズフット・トレフォイルのゲノムの残存あるいは再構成が起こることが明らかになった(Table 20)。

Spangenberg *et al.* (1994)はトールフェスクとX線照射をしたイタリアンライグラスとの細胞融合において高線量の照射と低線量の照射で多様な非対称性をもつ雑种植物集団を作り、それらのmtDNAとcpDNAとをサザン分析した。同時にイタリアンライグラスの特異的の反復配列をプローブとしたドットプロットハイブリダイゼーションで、それら雑种植物の核ゲノムの非対称性の程度を確認した。その結果、ドナーであるイタリアンライグラスのプロトプラストに500Gy以上のX線照射を施した非対称性の最も高い雑种植物にはレシピエント側のトールフェスクのmtDNAとcpDNAのみが存在し、ドナーであるイタリアンライグラスのそれは確認できなかった。しかし、10Gy, 25Gy, 50Gyおよび100Gyの照射では両親のmtDNAおよびcpDNAの混在や、組換えにより生じたと考えられるmtDNAの新たな断片パターンが得られた。この結果は、照射線量が低い間はドナー染色体の消失は緩やかで両親のオルガネラの共存期間が長くなりDNAの組換えの機会に恵まれることを示唆する。

本研究の5組合せの体細胞雑種のmtDNAとcpDNAは、ともに核が残存する側の親と同じか、それに近いタイプであった。この様なオルガネラ構成



となったのは、核背景の影響が強いことを示唆するものである。しかし、mtDNAにおいてはかなり高頻度の変異がみられた。この理由としては染色体消失速度の緩やかさがあげられよう。イネとマメ科植物の融合後のコロニーや初期のカルスの観察(Niizeki and Kita 1981, Niizeki *et al.* 1985, 1992a,b)によると、継代を重ねるにしたがってイネ系統A-58のフラボノイド系色素は急速に消失していく。だが、この段階でイネ染色体の全てが消失してしまうのではない。初期の再生シュートに奇形が多くみられるが、後期のそれにもみられなくなるのは継代初期のカルスにイネ染色体が若干残っていることを示唆するものと思われる。最終的に片親の染色体だけが残存する核になってしまうとしても、それまでの期間は両親由来のオルガネラが共存しオルガネラゲノム(mtDNA)の組換えの機会は残されているのであろう。ただし、葉緑体はミトコンドリアに比較して片親のゲノムの消失速度が速く組換えの機会は少ないものと思われる。

以上本研究を通じて、イネとマメ科の科間および属間体細胞雑種においてその核については片親のもののみが残存することが多く、葉緑体に組換えは生じずに核と同じ親由来のもののみが残存することが明らかになった。しかし核においては、この研究でバースフット・トレフォイルとアルファルファの組合せにおいて、また最近当研究室でイネとダイズの雑種カルスにおいてイネのRFLPランドマーカを用いた解析で両親の染色体の組換えを示唆する結果が得られた。また、ミトコンドリアに関しては、両親ゲノム間の組換えあるいは、ゲノム内の組換えによると考えられる変異がみられた。したがって、この体細胞融合により核およびミトコンドリアに関して遠縁植物からの遺伝子の導入や改良が十分期待される。

Table 20. Southern blot analysis of nuclear DNAs, mtDNAs and cpDNAs in somatic hybrid calli between rice (R) and 3 leguminous species, soybean (S), birdsfoot trefoil (B) and alfalfa (A).

Combinations of somatic hybrid	nuclear DNA	cpDNA	mtDNA
<b>Interfamilial combination</b>			
Rice X Soybean	S+d	S	S+R+n+d
Rice X Birdsfoot trefoil	B	B	B+n
Rice X Alfalfa	-	A	A+R+n+d
<b>Intergeneric combinations</b>			
Soybean X Birdsfoot trefoil	B	B	B+n
Alfalfa X Birdsfoot trefoil	B+A+d	B	B

n : Novel fragments which did not detected in parental cell lines.

d : Deletion of the fragments which co-migrated with those of one of the parental cell lines.

- : Not examined.

## 摘 要

植物における体細胞融合は性的に不和合な植物間での雑種を作り出す。また、細胞融合によって作り出される両親の細胞質の混在状態により細胞小器官(オルガネラ)の導入やオルガネラゲノムの組換えの誘起等により細胞質の改良が期待される。弘前大学農学部育種・遺伝学研究室ではイネ(*Oryza sativa* L.)とマメ科3植物、ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)、バズフット・トレフォイル(*Lotus corniculatus* L.)およびアルファルファ(*Medicago sativa* L.)との間での総組合せの細胞融合を行い、その比較研究を行ってきた。

本研究では、細胞融合後のオルガネラの動向についての基礎的な情報を得るためにイネとダイズ、イネとバズフット・トレフォイルおよびイネとアルファルファの3科間雑種カルス、ならびにダイズとバズフット・トレフォイルおよびバズフット・トレフォイルとアルファルファの2属間雑種カルスの核DNA、ミトコンドリアDNA(mtDNA)および葉緑体DNA(cpDNA)をサザンブロットにより解析した。なお残るダイズとアルファルファの雑種カルスの育成はごく最近成功したばかりなので本研究には供試し得なかった。

その結果、核DNAについてはイネとダイズおよびバズフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルスでは継代培養によってイネおよびアルファルファの染色体が脱落するが、ダイズ型DNA断片、あるいはバズフット・トレフォイル型断片の欠失もそれぞれ1系統で観察された。またバズフット・トレフォイルとアルファルファの雑種カルス1系統ではバズフット・トレフォイル型DNA断片が欠失し、アルファルファ型断片が添加されていた。これは両親の染色体間で組換えが起こった可能性を示唆する。しかし、その他の雑種カルスで科間の組合せにおいてはマ



メ科の親の、またマメ科植物の属間の組合せにおいては、バースフット・トレフォイルのDNA断片パターンがみられた。

またmtDNAに関して、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以外の4組合せでの雑種カルスでは、両親にはみられない新たなDNA断片の出現や両親型断片の欠失および混在等がみられた。これは雑種カルスのmtDNAにおいて両親ゲノム間での組換え、あるいはゲノム内での組換えや再構成が生じたものと考えられる。

一方、cpDNAの場合には5組合せの全ての雑種カルス系統のcpDNAで核と同じ親のDNA断片パターンが観察された。また組換えや再構成等の変異は生じていなかった。

以上の結果から、調査したイネとマメ科植物科間や属間雑種の核においては片親由来のもののみが残存する傾向であるが、一部の組合せにおいて雑種カルス内で両親の染色体の組換えが生じていることが示唆された。また、ミトコンドリアについては両親ゲノム間の組換えあるいは、ゲノム内の組換えや再構成によると考えられる変異がみられた。従って、このような科間および属間の体細胞融合により核およびミトコンドリアに関して遠縁植物からの遺伝子組換えや導入による品種改良が十分可能であることが明らかとなった。

## 謝 辞

本研究の開始から本論文の執筆に到るまでの全般にわたり、終始懇篤なる御指導を賜った弘前大学農学部教授新関 稔博士ならびに弘前大学名誉教授齋藤健一博士に衷心より感謝申し上げます。また本研究の実施と本論文の執筆にあたり暖かい御指導と御校閲をいただいた弘前大学農学部助教授原田竹雄博士、同助教授石川隆二博士ならびに岩手大学農学部教授江尻慎一郎博士に謹んで謝意を表します。弘前大学遺伝子実験施設助教授赤田辰治博士ならびに同施設助手千田峰生博士には多くの有用なる御助言と激励を頂きました。深く感謝いたします。

青森県グリーンバイオセンター細胞工学部 長谷川一氏、弘前大学農学部育種・遺伝学研究室の大学院生笠原 均氏、後藤 聡氏、上田創一氏、澁谷 玲女史、清水武史氏、千葉貴子女史、松倉千昭氏ならびに同研究室学部学生諸氏からいただいた多くの励ましと惜しみない御協力にたいして厚く御礼申し上げます。また同研究室の同窓生各位にも心から感謝いたします。

なお、日本学術振興会の特別研究員として、文部省科学研究費の補助を得て本研究を遂行することができました。御厚志にたいして深謝いたします。

## 引用文献

- Asahi, T., T. Kumashiro and T. Kubo (1988) Constitution of mitochondrial and chloroplast genomes in male sterile tobacco obtained by protoplast fusion of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana debneyi*. *Plant. Cell. Physiol.* 29:43-49
- Aviv, D. and E. Galun (1980) Restoration of fertility in cytoplasmic male sterile (CMS) *Nicotiana sylvestris* by fusion with X-irradiated *N. tabacum* protoplast. *Theor. Appl. Genet.* 58:121-127
- Belliard, G., F. Vedel and G. Pelletier (1979) Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281:401-403
- Bonnett, H. T. and K. Glimelius (1983) Somatic hybridization in *Nicotiana*: behavior of organelles after fusion of protoplast from male-fertile and male-sterile cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 65:213-217
- Bonnett, H. T. and K. Glimelius (1990) Cybrids of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* have an intergeneric mixture of chloroplast from *P. hybrida* and mitochondria identical or similar to *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 79: 550-555
- Breares, T., G. J. Curtis and D. M. Lonsdale (1989) A specific rearrangement of mitochondrial DNA induced by tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 77:620-624
- Chen, K., S. G. Wildman and H. H. Smith (1977) Chloroplast DNA distribution in parasexual hybrids as shown by polypeptide composition of fraction I protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5109-5112
- Chetrit, P., C. Mathieu, F. Vedel, G. Pelletier and C. Primard (1985) Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in *Cruciferae*. *Theor. Appl. Genet.* 69:361-366
- Chien, Y. C., K. N. Kao and L. R. Wetter (1982) Chromosomal and isoenzyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 62:301-304
- Christey, M. C., C. A. Makaroff and E. D. Earle (1991) Atrazine-resistant cytoplasmic male-sterile-*nigra* broccoli obtained by protoplast fusion between cytoplasmic male-sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *Brassica campestris*. *Theor. Appl. Genet.* 83:201-208



- Clark, E., L. Schnabelrauch, M. R. Hanson and K. C. Sink (1986) Differential fate of plastid and mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 72:748-755
- Fejes, E., D. Engler and P. Maliga (1990) Extensive homologous chloroplast DNA recombination in the pt14 *Nicotiana* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 79: 28-32
- Gengenbach, B. G., J. A. Connelly, D. R. Pring and M. F. Conde (1981) Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. *Theor. Appl. Genet.* 59:161-167
- Gleba, Y. Y., S. Hinnisdales, V. A. Sidrov, V. A. Kaleda, A. S. Parokonny, N. V. Boryshuk, N. N. Cherep, I. Negrutia and M. Jacobs (1988) Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by gamma-fusion. *Theor. Appl. Genet.* 76:760-766
- Hartmann, C., Y. Herry, J. De Buyser, C. Aubry and A. Rode (1989) Identification of new mitochondrial genome organizations in wheat plants regenerated from somatic tissue cultures. *Theor. Appl. Genet.* 77:169-175
- Honda, H. and A. Hirai (1990) Recombination of mitochondrial DNA caused by cell fusion (in Japanese). *Japan. J. Breed.* 40(Suppl 2):128-129
- Honda, H., K. Itoh and A. Hirai (1991) The heterogenous composition of mitochondrial DNA in somatic hybrid calli and the relatively simple composition of such DNA in regenerated leaves. *Jpn. J. Genet.* 66:279-289
- Kao, K. N. (1977) Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150:225-230
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajas tana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105-110
- Kemble, R. J. and J. F. Shepard (1984) Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclonal population. *Theor. Appl. Genet.* 69:211-216
- Kemble, R. J., T. L. Barsby, R. S. C. Wong and J. F. Shepard (1986) Mitochondrial DNA rearrangements in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 72:787-793
- Kemble, R. J., S. A. Yarrow, S-C. Wu and T. L. Barsby (1988) Absence of mitochondrial and chloroplast DNA recombinations in *Brassica napus* plants regenerated from protoplasts, protoplast fusions and anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 75:875-881

- Krumbiegel, G. and O. Schieder (1981) Comparison of somatic and sexual incompatibility between *Datura innoxia* and *Atropa belladonna*. *Planta* 153: 466-470
- Kumar, A. and E. C. Cocking (1982) Restriction endonucleases analysis of chloroplast DNA in interspecies somatic hybrids of *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.* 62:377-383
- Macnay, J. W., P. S. Chourey and D. R. Pring (1984) Molecular analysis of genomic stability of mitochondrial DNA in tissue cultured cells of maize. *Theor. Appl. Genet.* 67:433-437
- Medgyesy, P., L. Menczel and P. Maliga (1980) The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris*, and isolation of their somatic hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 179:693-698
- Medgyesy, P., E. Fejes and P. Maliga (1985a) Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6960-6964
- Medgyesy, P., R. Golling and F. Nagy (1985b) A light sensitive recipient for the effective transfer of chloroplast and mitochondrial traits by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 70:590-594
- Menczel, L., F. Nagy, Z. R. Kiss and P. Maliga (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59:191-195
- Milligan, B. G. (1989) Purification of chloroplast DNA using hexadecyltrimethylammonium bromide. *Plant Mol. Biol. Report* 7(2):144-149
- Morgan, A. and P. Maliga (1987) Rapid chloroplast segregation and recombination of mitochondrial DNA in *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 209:240-246
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Planta* 15:473-497
- Nagy, F., I. Torok and P. Maliga (1981) Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana knightiana*. *Mol. Gen. Genet.* 183:437-439
- Nagy, F., G. Lazar, L. Menczel and P. Maliga (1983) A heteroplasmic state induced by protoplast fusion is a necessary condition for detecting rearrangements in *Nicotiana* mitochondrial DNA. *Theor. Appl. Genet.* 66:203-207



- Newton, K. J., C. Knudsen, S. Gabay-Laughnan and J. R. Laughnan (1990)  
An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial  
cytochrome oxidase gene. *The Plant Cell* 2:107-113
- Niizeki, M. and F. Kita (1981) Cell division of rice and soybean and their fused  
protoplasts. *Japan. J. Breed.* 31:161-167
- Niizeki, M., M. Tanaka, S. Akada, A. Hirai and K. Saito (1985) Callus formation  
of somatic hybridization of rice and soybean and characteristics of  
the hybrid callus. *Jpn. J. Genet.* 60:81-92
- Niizeki, M. and K. Saito (1987) Genotypic variation in plant regeneration from  
calli and protoplast of alfalfa, *Medicago sativa* L. *Plant Tissue Cult. Lett.*  
4:27-31
- Niizeki, M. and K. Saito (1989) Callus formation from protoplast fusion between  
leguminous species of *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *Japan. J.*  
*Breed.* 39:373-377
- Niizeki, M., K. Cai, M. Kihara, S. Nakajo and T. Harada (1990) Somatic cell  
hybrids between birdsfoot trefoil and soybean. *Lotus Newsletter* 21:14-17
- Niizeki, M., S. Nakajo, and T. Harada (1992a) Somatic cell hybridization in rice  
and birdsfoot trefoil. *Lotus Newsletter* 23:18-22
- Niizeki, M., S. Nakajo, R. Ishikawa, T. Harada and K. Saito (1992b) Behavior of  
mitochondrial and chloroplast DNA in somatic hybrid calli between rice and  
alfalfa. *Japan. J. Breed.* 42:803-809
- O'Connell, M. A. and M. R. Hanson (1987) Regeneration of somatic hybrid plants  
formed between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennelli*. *Theor. Appl. Genet.*  
75:83-89
- Ozias-Akins, P., D. R. Pring and I. K. Vasil (1987) Rearrangements in  
the mitochondrial genome of somatic hybrid cell lines of  
*Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. + *Pennisetum maximum* Jacq. *Theor.*  
*Appl. Genet.* 74:15-20
- Parokonny, A. S., A. Y. Kenton, Y. Y. Gleba and M. D. Bennett (1992) Genome  
reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by *in situ*  
hybridization. *Plant J.* 2:863-874
- Primard, C., F. Vedel, C. Mathieu, G. Pelletier and A. M. Chevre (1988)  
Interspecific somatic hybridization between *Brassica napus* and  
*Brassica hirta* (*Sinapis alba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 75:205-228
- Rothenberg, M., M. L. Boeshore, M. R. Hanson and S. Izhar (1985) Intergenomic  
recombination of mitochondrial genomes in a somatic hybrid plant. *Curr.*  
*Genet.* 9:615-618



- Sakai, T. and J. Imamura (1990) Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 80:421-427
- Scowcroft, W. R. and P. J. Larkin (1981) Chloroplast DNA assortments randomly in interspecific somatic hybrids of *Nicotiana debneyi*. *Theor. Appl. Genet.* 60:179-184
- Shepard, J. F., D. Bidney, T. Barsby and R. Kemble (1983) Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. *Science* 219:683-688
- Shirzadegan, M., M. Christey, E. D. Earle and J. D. Palmer (1989) Rearrangement, amplification, and assortment of mitochondrial DNA molecules in cultured callus of *Brassica campestris*. *Theor. Appl. Genet.* 77:17-25
- Sidrov, V. A., L. Menczel, F. Nagy and P. Maliga (1981) Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate-treated protoplasts. *Planta* 152:341-345
- Smith, M. A., A. Pay and D. Dupid (1989) Analysis of chloroplast and mitochondrial DNA in asymmetric somatic hybrids between tobacco and carrot. *Theor. Appl. Genet.* 77:641-644
- Spangenberg, G., M. Osusky, M. M. Oliveira, E. Freydl, J. Nagel, M. S. Pais and I. Potrykus (1990) Somatic hybridization by microfusion of defined protoplast pairs in *Nicotiana*: morphological, genetic, and molecular characterization. *Theor. Appl. Genet.* 80:577-587
- Spangenberg, G., M. P. Valles, Z. Y. Wang, P. Montavon, J. Nagel and I. Potrykus (1994) Asymmetric somatic hybridization between tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and irradiated Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 88:509-519
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura (1985) Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA. *Plant. Mol. Biol.* 4:355-364
- Varadarajan, G. S. and C. S. Prakash (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 9:6-12
- Wetter, L. R. (1977) Isoenzyme patterns in soybean-*Nicotiana* somatic hybrid cell lines. *Mol. Gen. Genet.* 150:231-235

## Summary

Protoplast fusion has been a practical method for removing the barriers of incompatibility in sexual crossings of agriculturally important plant species. On the other hands, protoplast fusion induces the heteroplasmic state of fusion partners. Therefore, it may have opportunities for recombinations and/or rearrangements of cytoplasmic genomes. In the Plant Breeding and Genetics Laboratory of Hirosaki University, five asymmetrical somatic hybrids were produced by protoplast fusion in interfamilial combinations of rice and soybean (Niizeki and Kita 1981; Niizeki *et al.* 1985), of rice and birdsfoot trefoil (Niizeki *et al.* 1992a), and of rice and alfalfa (Niizeki *et al.* 1992b) and two intergeneric combinations of soybean and birdsfoot trefoil (Niizeki *et al.* 1990) and of birdsfoot trefoil and alfalfa (Niizeki *et al.* 1989). They had been researched for their karyotypes, isozymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCo), and morphological traits.

In this thesis, interfamilial- and intergeneric asymmetrical somatic hybrids were analyzed for their nuclear DNAs, mitochondrial DNAs (mtDNAs) and chloroplast DNAs (cpDNAs) by the Southern hybridization method. The aim of this thesis is to obtain fundamental information of the nature and behavior of their nucleus and organelle.

### I. Analysis of nuclear DNAs

Nuclear DNAs of somatic hybrids were analyzed with respect to rDNA. In the Southern blots of interfamilial somatic hybrids, all hybrid cell lines had the identical banding patterns of leguminous parents except for one hybrid line of rice and soybean. The deletion of one DNA fragment of soybean was observed in this hybrid cell line. In the case of intergeneric hybrids, the banding patterns of birdsfoot trefoil were detected in all of



the hybrid cell lines of soybean and birdsfoot trefoil. However, the deletion of one DNA fragment of birdsfoot trefoil and the addition of one fragment of alfalfa were observed in the somatic hybrid cell of birdsfoot trefoil and alfalfa. These results show that the intergenomic translocation may have occurred between the chromosomes of somatic hybrids.

## II. Analysis of mtDNAs

In the Southern blots of mtDNAs using of three mitochondrial genes as probes, the novel fragments were detected in several cell lines of four somatic hybrids except the hybrid of birdsfoot trefoil and alfalfa. In addition, the presence or deletion of both parental fragments were observed in the mtDNAs of somatic hybrids of rice and soybean and of rice and alfalfa. These results indicate that some kinds of alterations such as intermolecular and/or intramolecular recombinations of mtDNAs occurred in several cell lines of four somatic hybrids.

## III. Analysis of cpDNAs

In the Southern blots of cpDNAs, the banding patterns of all cell lines of five somatic hybrids were identical with those of leguminous or birdsfoot trefoil cell lines, using of four rice chloroplast genomic DNA fragments as probes. No novel fragments were observed at all. Therefore, it was suggested that the chloroplasts of five somatic hybrids sorted out unidirectionally, and that any kinds of recombinations and/ or rearrangements of cpDNAs did not occur in the five somatic hybrids.

From these results, unidirectional nuclear genome elimination have occurred in the nuclei of five interfamilial- and intergeneric somatic hybrids. However, chromosomal recombinations may have occurred in the nuclei of somatic hybrids of rice and soybean and of birdsfoot trefoil.



and alfalfa. Some kinds of recombination and/or rearrangement may have occurred in mtDNAs of four combinations of somatic hybrids, but alterations of cpDNAs may not have occurred. Therefore, it will be possible to expect improvement of the nucleus and mitochondria in these five interfamilial- and intergeneric somatic hybrids.