



イネ薬培養による欠失葉緑体 DNA の発生 メカニズムの解明とベクター利用の検討

(課題番号：03660001)

平成4年度科学研究費補助金
(一般研究C)研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 原 田 竹 雄
(弘前大学農学部)

イネ葯培養による欠失葉緑体 DNA の発生 メカニズムの解明とベクター利用の検討

研究組織

研究代表者：原田竹雄（弘前大学農学部助教授）

研究分担者：なし

研究経費

平成3年度 1,500千円

平成4年度 700千円

計 2,400千円

研究発表等

(1)論文等

HARADA, T., T. SATO, D. ASAKA and I. MATSUKAWA : Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 81 : 157-161, 1991.

HARADA, T., R. ISHIKAWA, M. NIIZEKI and K. SAITO : Pollen-derived rice callus that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastids for growth. *Mol. Gen. Genet.* 233 : 145-150, 1992.

HARADA, T. : Deletion in rice plastid DNA. *Rice Biotechnology Quarterly.* 10 : 4, 1992.

(2)口頭発表

原田竹雄, 石川隆二, 新関 稔, 齋藤健一：イネ花粉由来カルスの線状色素体 DNA の構造。第4回植物分子生物学シンポジウム, 仙台, 1991年6月。

HARADA, T., R. ISHIKAWA, M. NIIZEKI and K. SAITO : Large-scale deleted plastid DNA in the rice callus derived from pollen. *Third International Workshop on Rice Molecular Biology.* Sapporo, August, 1991.

原田竹雄, 藤田 隆, 小笠原博幸, 石川隆二, 新関 稔, 齋藤健一：イネ葯培養由来カルスの欠失変異色素体 DNA の解析。日本育種学会第81回大会, 1992年4月。

目 次

I. 緒 言	1
II. アルビノの欠失色素体 DNA	2
III. 欠失色素体 DNA の構造解析	7
IV. 色素体 DNA のコピー数と色素体の電子顕微鏡観察	12
V. 正常色素体及び葉緑体におけるヘアピン末端を有する DNA	15
VI. 総合論議	18
VII. 要 約	20

I. 緒 言

イネ葯培養は純系を早期に得る手段として、多くの試験研究機関が育種プログラムにこの技術を取り入れている (OONO 1981)。しかしその効率を向上させるためには改良の余地が残されている。その一つに、イネ葯培養による再分化個体にはアルビノが多発するという問題がある。このアルビノ化現象はコムギやオオムギでも観察され、禾本科に特異的な現象である (CLAMPHAM 1993)。アルビノの発生率には多くの要因が関与しているという報告がある。例えば、材料とするイネの系統や生育状況 (BULLOCK et al. 1982)、花粉の発育段階 (CHEN and LIN 1976)、培養や低温処理の温度 (HUANG 1984, GENOVESI and MAGILL 1979)、培地のショ糖濃度や生長ホルモンの組み合わせ (CLAMPHAM 1973) などである。しかし、アルビノ発生の原因は不明である。

アルビノの細胞には葉緑体の前駆体である色素体が存在する (VAUGHN et al. 1989)。この色素体内には色素体 DNA にコードされているリブコース-2-リン酸脱炭酸酵素や 23S と 16S の rRNA 分子が欠如している (SUN et al. 1979)。核と細胞質遺伝子間の協調的発現があることから (RODERMEL et al. 1988)、これらの分子の欠如は色素体からの葉緑体への分化に関与する核遺伝子の変異による可能性もある。一方、DAY and ELLIS (1984, 1985) はオオムギの葯培養によって再分化した花粉由来のアルビノの色素体 DNA に大きな欠失領域があることを報告した。

高等植物の色素体の主たる機能は葉緑体へ分化しての光合成である。しかし、色素体は細胞の分化の方向性に従って大きくその形態と機能を変換させるという特徴がある (KIRK and TILNEY-BASSETT 1978)。植物細胞には全能性があることから、葉緑体以外の色素体 (例えば、アミロプラスト・有色体・白色体) からも葉緑体への分化が可能であると考えられる (POSSINGAM 1980)。色素体は独自の DNA を持っており、光合成に関与するタンパクと独自の翻訳系で機能する tRNA や rRNA をコードしている (SUGIURA 1989)。このことから、色素体はどんな分化の過程であろうと無傷のゲノムを保持する必要があり、その発現はメチル化や翻訳機構の上で制御されているものと考えられる (NGERNPRASIRTSIRI et al. 1988, DENG and GRUISSEM 1988)。

寄生植物の一種である *Epifagus virginiana* の色素体 DNA は、光合成に関与する遺伝子群を欠失しているが、rRNA・tRNA・リボソーム蛋白遺伝子・数個の ORF (オープンリーディングフレーム) が残されている。このことから、この寄生植物のゲノムには非光合成的な生理機能を有する何らかのタンパクがコードされており、この転写・翻訳のために色素体ゲノムが残存している可能性が示唆されている (DEPAMPHILIS and PALMER 1990)。一方、植物の 5-アミノレブリン酸 (ポルフィリンの前駆物質) はグルタミン酸から生成されるが、この生合成の過程には、色素体 DNA にコードされる tRNA^{Glu} 分子が必要とされる (SCHON et al. 1986)。ポルフィリンはミトコンドリアやその他の細胞小器官の電子伝達系などに機能する化合物であり、基礎的な代謝系には必須であることから、HOWE and SMITH (1991) は、非光合成植物の

色素体 DNA がこの tRNA^{Glu} を生産するための RNA ポリメラーゼを生産しているものと考えている。この様に非光合成的色素体ゲノムの機能については不明の点が多く、緑色植物での欠失色素体 DNA の解析は、これらの点を解明する優れた研究材料となろう。イネの葉緑体 DNA はタバコ及びゼニゴケと同様、全塩基配列が決定されており (HIRATSUKA et al. 1989)、コムギやオオムギに比べその解析が進んでいることから研究材料として好適である。

本研究はより効率的なイネ薬培養技術の開発を目標として、薬培養におけるアルビノ発生の原因を解明するとともに、葉緑体への遺伝子導入系のベクターとして、欠失色素体 DNA の使用の可能性について検討したものである。

II. アルビノの欠失色素体 DNA

1. 材料及び方法

イネ (*Oryza sativa* L. 栽培品種 'キタアケ') を温室で育成し、葉耳間長をめやすとし 1 核期の花粉を含む幼穂を採取し、10°C で 10 日間低温処理後、薬培養に使用した。5 ml の N6 基本培地に 30 g/l ショ糖, 1 g/l 酵母エキス, 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を添加した液体培地上に薬を浮遊培養した。形成したカルスを 0.8% 寒天の固形培地上で増殖させた後、0.5 mg IAA/l と 2 mg/l カイネチンを含む N6 基本培地上で再分化を図った。

再分化個体の根からのカルス誘導は ABE and FUTUHARA (1984) の方法に従った。また浮遊培養は 25°C の条件下で、再分化のための培養は 25°C, 約 3,000 Lux の 16 時間明期の条件下で行った。

DNA の抽出は MURRAY and THOMPSON (1980) の方法に従った。サザンハイブリダイゼーションは制限酵素で処理した DNA を 0.8% アガロースゲルで電気泳動後, SUGIURA and KUSUDA (1979) の方法によりブロッティングを行った。タバコ葉緑体 DNA のクローン pTBa13, pTBa30, pTX6 (SUGIURA et al. 1986) とイネ葉緑体 DNA のクローン pH10R (rbcL 遺伝子を含む 9.5 kbp の Hind III 断片; MOON et al. 1988) をプローブとして用いた。検出は digoxigenin-dUTP によりラベルした非アイソトープ法 (HELIES et al. 1988) で行った。

2. 結 果

植物のミトコンドリアゲノムには葉緑体ゲノムの一部が転移したと考えられる領域が存在する (STERN and PALMER 1984)。イネのミトコンドリアゲノムには rbcL-atpB-atpE-trnM-trnV の葉緑体遺伝子のクラスターが存在する (MOON et al. 1988)。このため、この領域を含む葉緑体プローブ DNA の pH10R は、ミトコンドリア DNA の相同領域にもハイブリダイズし、Fig. 1 に示すとおり Hind III 分解の全 DNA に対するハイブリダイゼーションの結果は、9.5 kbp の色素体 DNA と 6.9 kbp のミトコンドリア DNA が検出される。しかし、いくつかのアルビノ植物では 6.9 kbp の断片のみが検出された。このアルビノでは制限酵素の種類を変

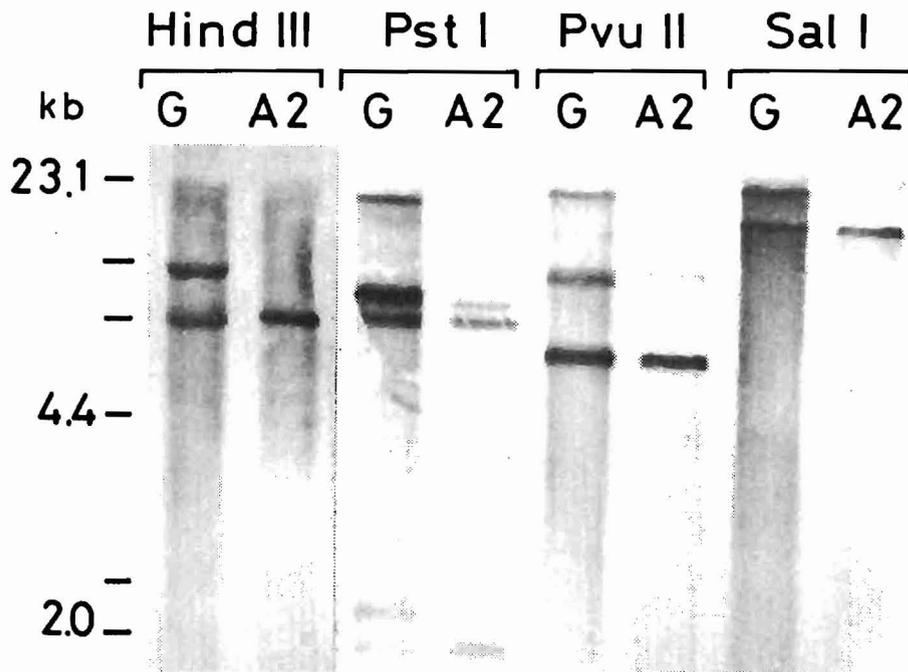


Fig. 1. Hybridization analysis of total DNA from rice albino clone 2 (A2). Total DNAs were digested with *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*II and *Sal*I, fractionated on agarose gel, and then transferred to nitrocellulose filters. Each filter was hybridized with the labeled 9.5-kbp fragment containing *rbcL* (pH10R). Lane G; green plant. Lane A2; albino clone 2.

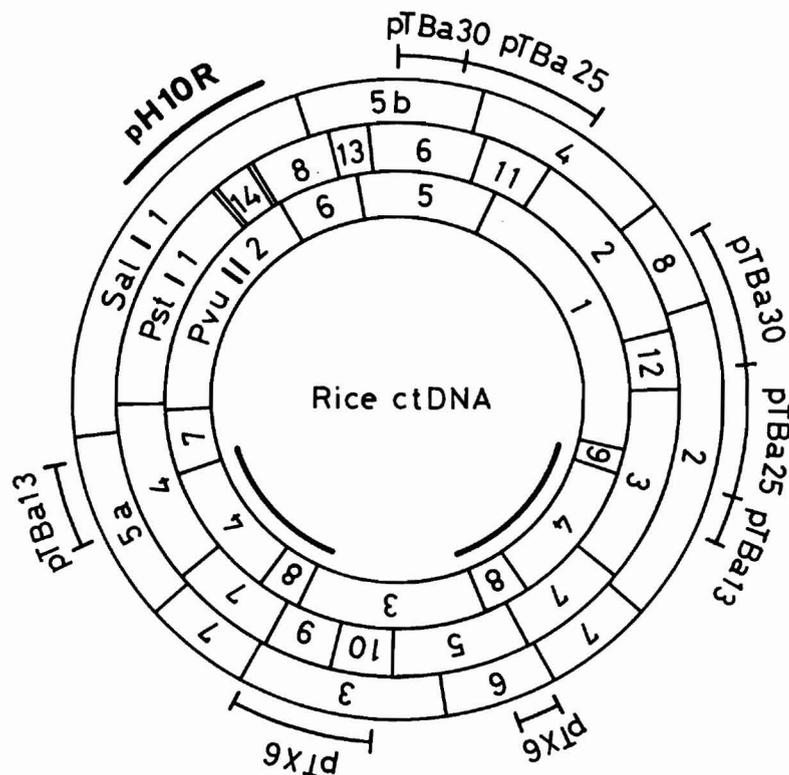


Fig. 2. Restriction map of rice ptDNA. The positions of the probes pH10R, pTBa13, pTBa25, pTBa30 and pTX6 are indicated.

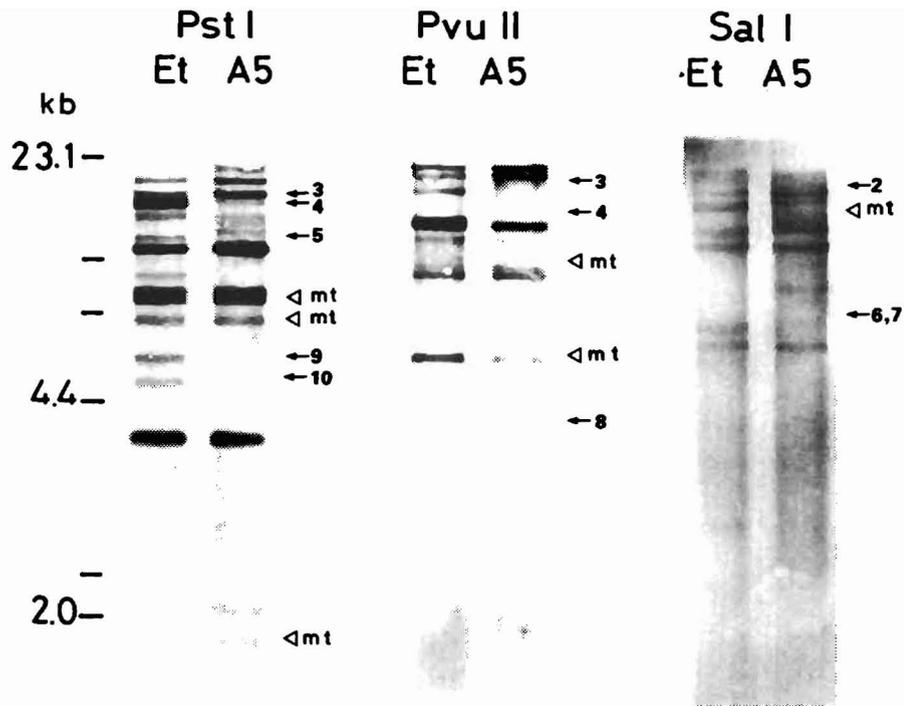


Fig. 3. Hybridization analysis of total DNA from rice albino clone 5 (A5). Total DNAs were digested with each enzyme, fractionated on agarose gel, then transferred to a nitrocellulose filter and hybridized with labeled probe pH10R, pTBa13, pTX6 and pTBa30. Fragment numbers not detected in the albino plant are shown by arrows. mt ; fragment(s) of mtDNA (Fig. 1). Lane Et ; etioloated plant. Lane A5 ; albino clone 5.

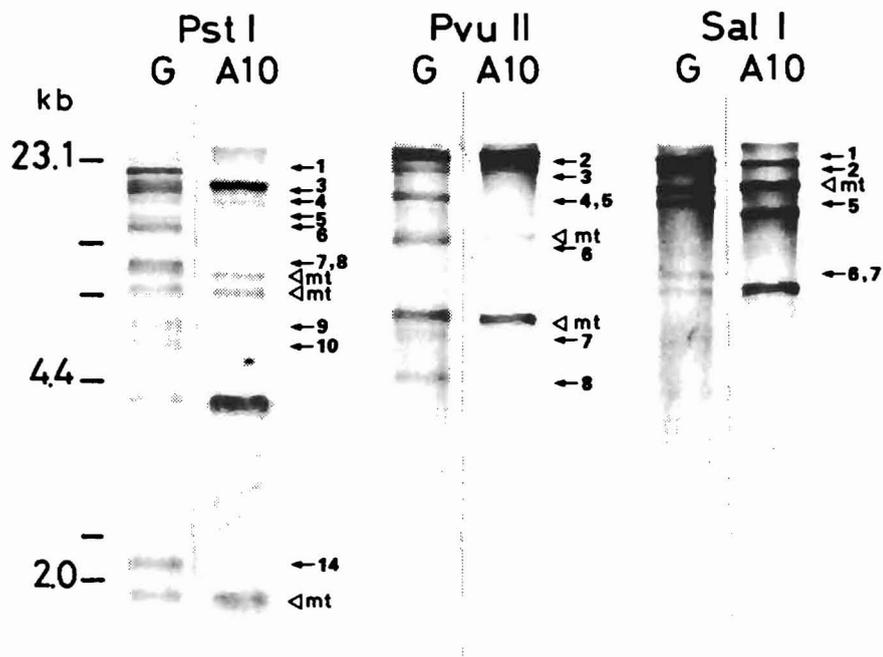


Fig. 4. Hybridization analysis of rice total DNA from albino clone 10 (lane A10). Electrophoresis, hybridization and probes used were identical to those in Fig. 3.

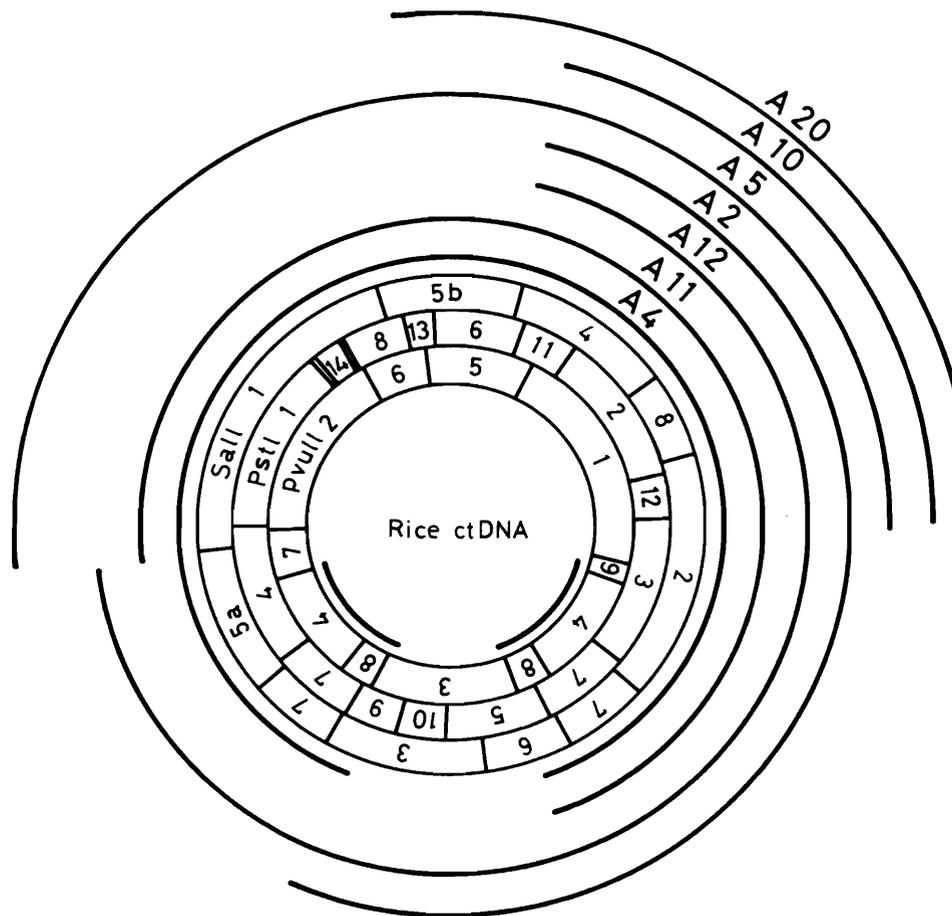


Fig. 5. Diagram summarizing retained ptDNA regions in rice albino plants. The retained regions in each of the albino plants are shown outside the ptDNA restriction map.

えての解析結果もミトコンドリア DNA のみが検出されることから、色素体 DNA の *rbcL* の領域が欠失していると判断された (Fig. 1)。

次に、葉緑体 DNA のほぼ全域をカバーするタバコとイネのプローブ DNA を使用し、サザンハイブリダイゼーションにより、欠失領域を検討した (Fig. 2)。アルビノ20個体の全 DNA を Pst I, Sal I, Pvu II で切断し検討したところ、正常なパターンが得られるものもあったが、7種のアルビノでは断片の欠失が認められた。アルビノ A4 は小単一配列 (SSC) の領域が検出されなかった。アルビノ A5 は SSC の領域に加え、逆位反復配列の部位がなかった (Fig. 3)。最も規模の大きな欠失は A10 と A20 において観察された (Fig. 4)。これらの検出パターンには欠失の結果新たに生じたと考えられるコントロールには見られない断片が認められた。Fig. 5 に示すように欠失の領域はアルビノ個体によって異なったが、欠失色素体 DNA の全ては Pst I-2 の領域を保持していた。

アルビノの根から誘導されたカルスから、再度再分化を試みたところ、全てアルビノとなった。これらのカルスのサザンハイブリダイゼーションの結果は、もとのアルビノと同一の欠失領域を示したことから、欠失色素体 DNA はカルス組織で保存が可能であることが判明した。

欠失色素体 DNA は20個のアルビノのうち13個体には検出されなかったが、制限酵素断片による解析実験では検出されない小規模な欠失領域が存在している可能性を排除出来なかった。

3. 論 議

薬培養由来のイネアルビノで大規模な色素体 DNA の欠失が観察された。この結果は、コムギとオオムギで観察された結果と一致する (DAY and ELLIS 1984, 1985)。植物ミトコンドリア DNA の大規模な欠失構造が報告されているが、これらは数 kbp の反復配列間の分子内組換えによることが判明している (LONSDALE et al. 1984, STERN and PALMER 1986, SICULELLA and PALMER 1988, FAURON et al. 1989)。しかし、葉緑体ゲノム上には、ミトコンドリア DNA のような数 kbp におよぶ反復配列は逆位反復配列以外には存在しない (HIRATSUKA et al. 1988)。ミトコンドリア DNA の欠失例が人間の細胞でも発見され (HOLT et al. 1988)、その原因は 10 bp 前後の反復配列間での組換えによることが明らかにされている (SCHON et al. 1989, MITA et al. 1990)。イネの色素体 DNA には、このような短い反復配列がいくつか存在する (SHIMADA and SUGIURA 1989) ことから、これらの配列が関与している可能性も考えられる。

一方、色素体 DNA は培養条件下では比較的安定している (CHOWDHURY et al. 1988, KEMBLE et al. 1988, RODE et al. 1985)。今回使用した種子由来のカルスも、色素体 DNA に全く変異が認められなかったことから、欠失色素体 DNA の出現は、薬培養に特異的な現象であるものと考えられた。VAUGHN et al. (1980) は花粉由来アルビノのオルガネラの形態的異常を、また MIYAMURA et al. (1987) はコムギの花粉の第1核期から2核期の発育過程で色素体 DNA の消失を顕微鏡下で観察している。DAY and ELLIS (1984) は薬培養の再分化個体にアルビノが多発する原因は、細胞質ゲノムの母性遺伝が関与すると考えられる色素体 DNA の消失現象 (KUROIWA et al. 1982, VAUGHN et al. 1980) と関係がある可能性を示唆している。

欠失 DNA 分子を有する色素体は、独自のタンパク合成能を失うことになる。OELMULLER and MOHR (1986) は、クロラムフェニコール処理による色素体内のタンパク合成阻害が、核にコードされる色素体タンパクの遺伝子の転写を停止させることを明らかにした。また、BURGESS and TAYLOR (1988) は、葉緑体からの何らかの刺激が核コードの葉緑体タンパク遺伝子の転写に必要であることを報告している。これらの結果から、欠失 DNA を有する色素体は葉緑体への分化能力を失い、このことがアルビノ化の一因となっていると考えられる (HAGEMANN and BORNER 1978, SCOTT et al. 1982, SASAKI and KUROIWA 1988)。

III. 欠失色素体 DNA の構造解析

1. 材料及び方法

アルビノ（栽培品種‘キタアケ’）の根より誘導したカルス（A5, 20C）を使用した。これらのカルスは N6 基本培地に 30 g/l ショ糖, 1 g/l 酵母エキス, 2,4-D 2 mg/l を含む寒天培地上または液体培地中で経代された。

カルスより抽出した全 DNA を制限酵素で消化し, 0.8%アガロースゲルで泳動後ナイロン膜にブロットし, サザンハイブリダイゼーションにより欠失構造を解析した。プローブ DNA は名古屋大学杉浦教授から分譲していただいたイネ葉緑体 DNA の13種のクローンを使用した。

パルスフィールド電気泳動は液体窒素でパウダー化した約 0.1 g のカルスを0.7%の低融点アガロースゲル (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 15 mM NaCl, 200 mM EDTA) に包埋した。このアガロースブロックを, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% sarkosyl, 1 mg/ml Proteinase K で 50°C, 16時間処理したのち, CHEF-DRIVE II (BIORAD) で 0.5xTAE 緩衝液を用い, 9°C, 45秒のパルスタイムで 200 V, 12時間電気泳動した。また, アルカリ電気泳動は, 制限酵素で分解した全 DNA を 50 mM NaOH に溶解し, これを0.8%アガロースゲルを用いて, SAMBROOK et al. (1989) の方法に従って行った。PCR 実験は, 0.4 μg のテンプレート DNA, 1 μmol のプライマー, Cetus 社の Taq ポリメラーゼと緩衝液を使用し, 25サイクル (94°C, 1.5分; 55°C, 2.5分; 72°C, 4分) で行った。反応産物は 3%の NuSieve アガロースで検出した。用いたプライマーの塩基配列は以下の通りである。

プライマー A → CTTAAATGTGTTTAGTATTTAGTAGCCCGA

B ← CAGCTTTAAAGGGAAGGGAGATAGACTG

C → CATAGTGGCAACTAAACACGAGGGT

D ← TCATAGTTGCATTA CTTATAGCTTC

(→は 5' から 3' 方向を意味する)

これらの配列は EMBL database の (no. X15901) : A, 12121-12150 ; B, 12602-12630 ; C, 122736-122760 ; D, 123821-123845 に相当する。

2. 結 果

Fig. 6 に, 各カルス内の色素体 DNA の欠失領域を示す。いくつかのカルスではヘテロな欠失色素体 DNA 分子の存在が認められたが, 4-5 回のカルス経代後には, 均一の欠失 DNA 分子が得られた。この現象はカルス培養でのヘテロな色素体 DNA のふるい分け (Sorting) の結果と考えられた。残存する領域の制限酵素認識部位は, コントロールとして使用した種子由来カルスの DNA 及び塩基配列から構築された物理地図と一致した。

より詳細な構造を検討するため, A5 カルスを使用して解析を進めた。制限酵素分解を行わない場合には, 19 kbp と 38 kbp の分子が観察され, また Pst I で分解した場合にも 2 本の断片

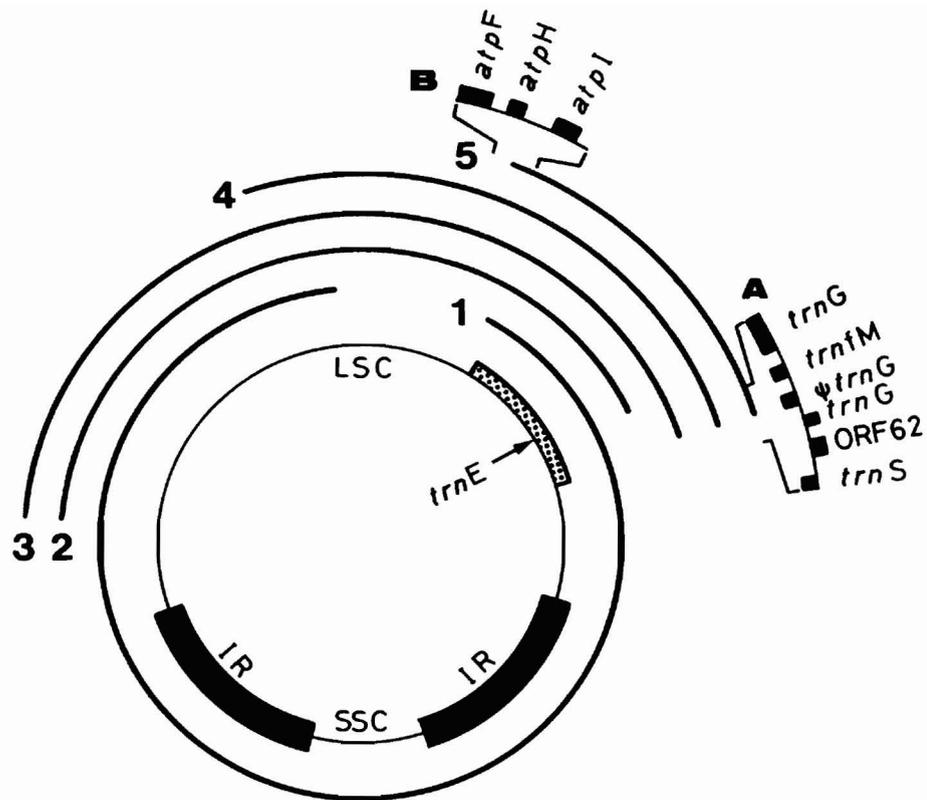


Fig. 6. Retained regions of the deleted plastid DNA in each callus (curved lines 1-5). Line 5 indicates the region of callus line described here. The inner circle represents the rice plastid genome. The inverted repeats are indicated with bold boxes. LSC and SSC indicate the large and small single copy regions, respectively. The dotted area shows the region of the pPR2 clone, next to *trnE* (glutamate tRNA gene). A and B denote regions described in the text.

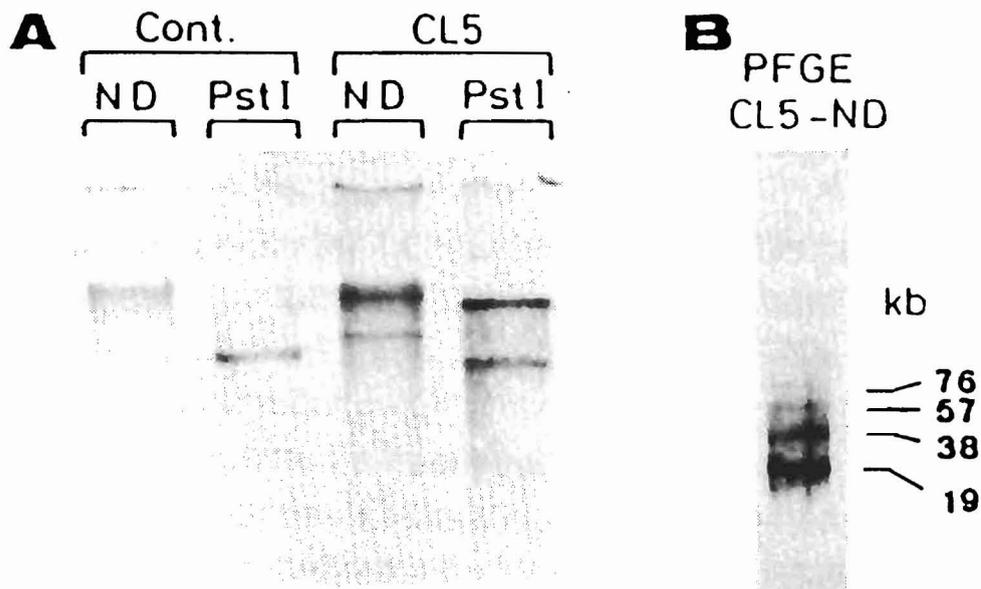


Fig. 7. A Southern blot of pPR2 homologous DNA. Blotting and hybridization were carried out as described in Fig. 1. The probe used was pPR2 clone. The sizes of the two fragments in lane CL5-ND were determined to be 19 kbp and 38 kbp in another experiment using 0.3% high gel-strength agarose (Nippon-Gene AgaroseH).

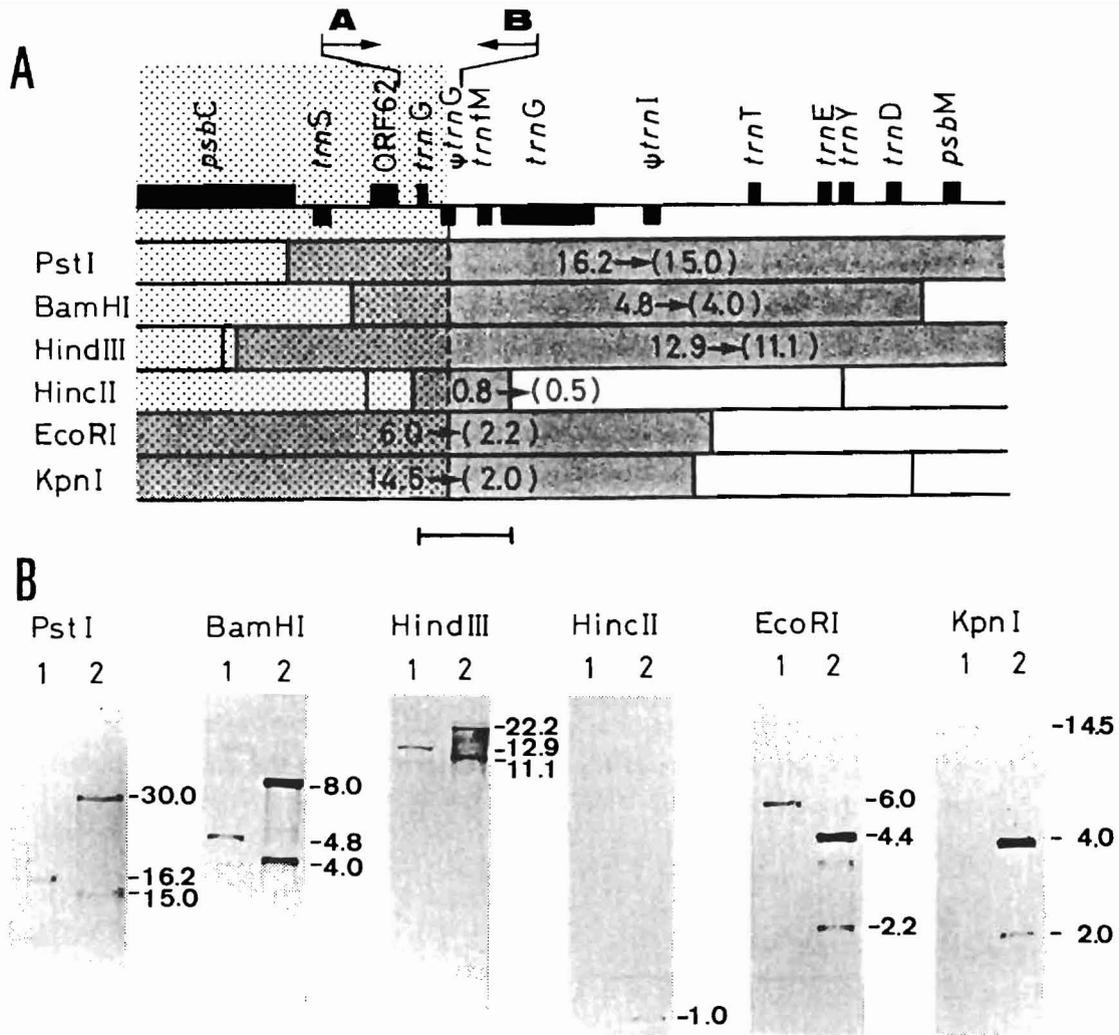


Fig. 8. A restriction map of the terminus of deleted plastid DNA in callus line 5 and Southern blots obtained using the *HincII* 0.8 kbp fragment as a probe. (A) A restriction map constructed from sequence data of rice chloroplast DNA. Locations of genes and the positions of primers A and B (Fig. 5) are shown above the map. The vertical dashed line indicates the terminus and concatemeric point. The region of the probe used is shown below the map. The sizes of fragments which should hybridize with the probe are indicated in kbp, and the sizes of terminal fragments are in parentheses. (B) Lanes 1 and 2 for each restriction enzyme show the hybridization pattern of total DNA from seed callus, and that from callus line 5, respectively. The sizes of the fragments detected in each lane are shown in kbp.

が観察された (Fig. 7)。プローブ DNA が Fig. 6 の領域 A を有している限り、制限酵素の種類を変えた場合にもこのような 2 本のバンドが観察された (Fig. 8B)。プローブ DNA 領域と検出される断片のサイズから、Fig. 8A に示したように、*trnG* 遺伝子側 (Fig. 8A のドット領域) が消失し、末端が形成されているものと判断された。さらに、もう一方の末端部位を決定するため、Fig. 6 の領域 B を含むプローブと数種の制限酵素を使用したサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*atpH* 領域が失われていること、すなわち、*atp I* の 3' 側で末

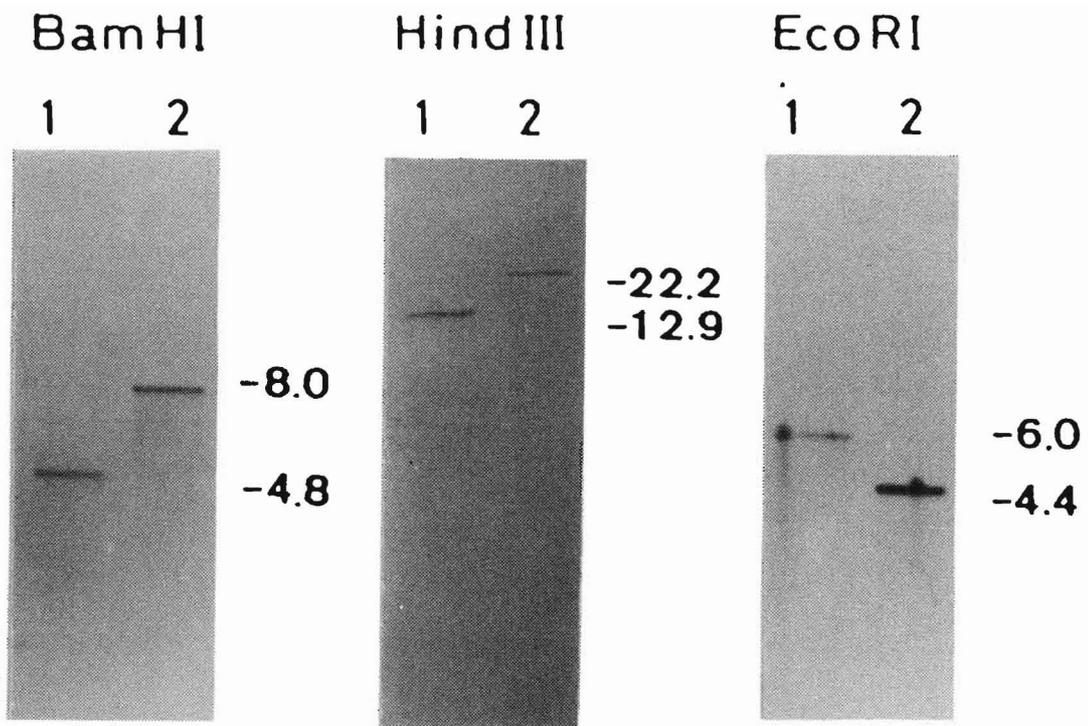


Fig. 9. Electrophoretic analysis of the terminal structure of the deleted plastid genome in callus line 5.

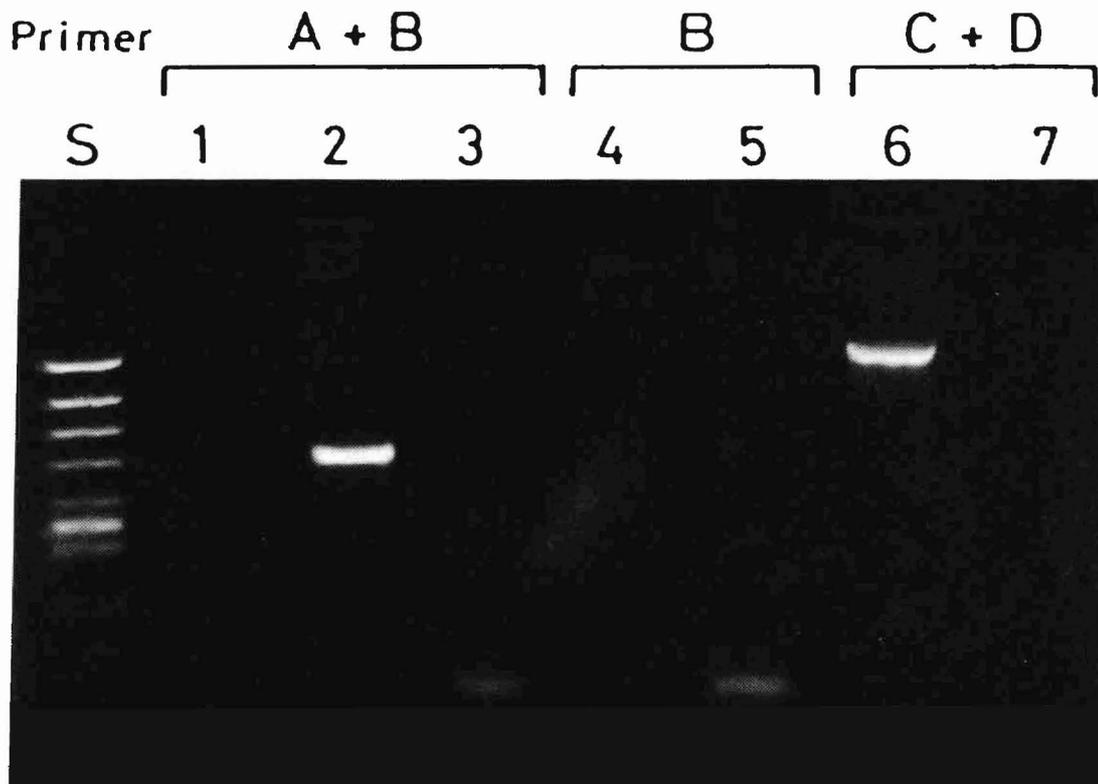


Fig. 10. PCR analyses of the deleted plastid DNA. Lane 1, H₂O control ; lanes 2, 4 and 6, total DNA from seed callus ; lanes 3, 5 and 7, total DNA from callus line 5. Primers used are shown above the figures.

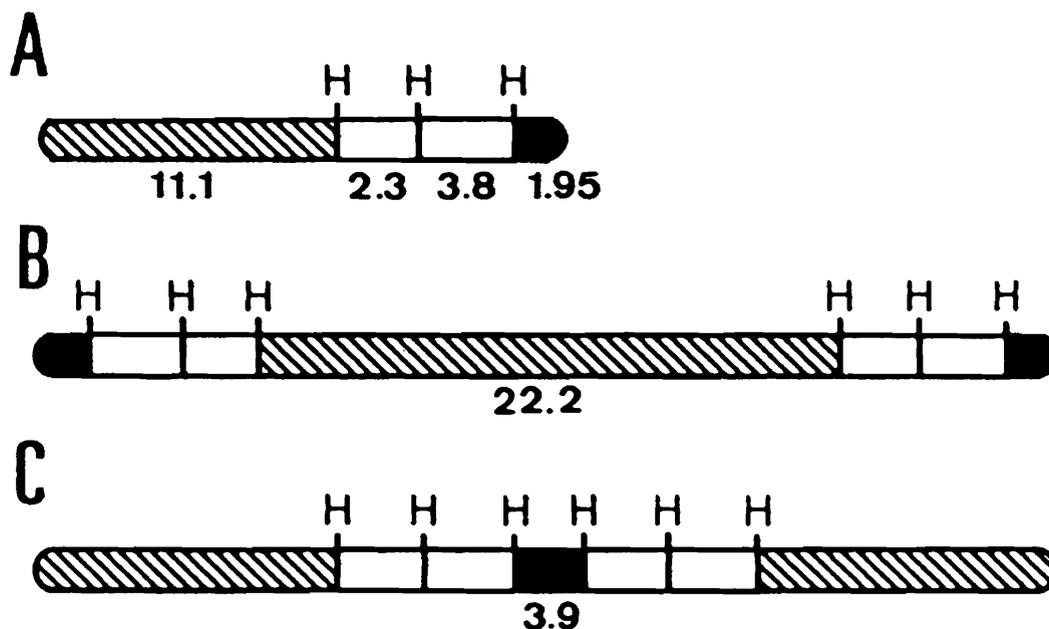


Fig. 11. The structures of deleted plastid DNA in callus line 5. (A) Structure of monomer, (B) structure of head-to-head dimer, (C) structure of tail-to-tail dimer. Terminal and concatemeric fragment sizes are indicated in kbp. H ; *Hind*III restriction site.

端が形成されていることが明らかにされた。

Fig. 8B に示すように、各制限酵素によって検出される 2 本の断片のうち、大きな断片サイズは小さい断片サイズの 2 倍であった。また、もう一方の末端においても同様の結果が得られた。これらの断片は他の領域をプローブとした場合には検出されないことから、末端が向かい合った形で連結しているものと結論された。さらに、無処理の DNA 分子は 19, 38, 57, 76 kbp と単量体から 4 量体と考えられる分子が認められることから (Fig. 7B), 19 kbp の線状分子が Head-to-Head, Tail-to-Tail の様式で連結した分子種が存在しているものと判断された (Fig. 11)。

Fig. 9 は 3 種の制限酵素を使用し、アルカリ条件下で電気泳動を行った結果である。未変性ゲルで確認された 2 本の検出断片のうちサイズが大きい方は確認されたが、小サイズの断片は消失した。アルカリ変性では DNA の 2 本鎖が解離し 1 本鎖になる (SAMBROOK et al. 1989)。このため 2 本鎖 DNA 分子の一方の末端がヘアピンで閉じていると考えられた。同じ結果が、もう一方の末端での実験においても観察されたことから、この欠失色素体線状 DNA 分子は両末端がヘアピンで閉じているものと結論された。

プライマー A と B を使用して PCR 実験を行ったところ、コントロールカルスの場合には塩基配列から予想されるサイズ (569 bp) の DNA が増幅されたが、A5 カルスでは約 130 bp の DNA が増幅された (Fig. 10)。さらに、この DNA はプライマー B のみによる PCR 実験でも増幅された。この結果はプライマー B を含む配列が逆位の状態で存在することを示唆する。この約 130 bp の DNA は、末端 A 領域を含むプローブのみと分子雑種を形成した。一方、16S

rRNA 遺伝子 (rrs16) の一部を増幅するプライマー C と D を用いた PCR では、A5 カルスで増幅 DNA が確認されなかったことから (Fig. 10), A5 カルスには正常な色素体 DNA 分子が消失しているものと考えられた。

Fig. 6 に示す A5 以外のカルスでの欠失色素体 DNA 分子についても同様な解析を行った。その結果、これらの分子も線状で末端がヘアピンであることがサザンハイブリダイゼーションの実験から明らかにされた。

3. 論 議

両末端がヘアピンで閉じており、Head-to-Head, Tail-to-Tail の連結様式で多量体を形成しているという DNA の構造は、オオムギで明らかにされた欠失色素体 DNA と基本的には同じである (ELLIS and DAY 1986, COLLIN and ELLIS 1991)。しかし、イネ色素体 DNA の全塩基配列が既に決定されている (HIRATSUKA et al. 1989) ことから、より詳細な構造が比較的容易に決定された。このような DNA 分子の構造は動物ウイルスである、ワクシニアウイルスにおいても報告されている。このウイルスの複製初期における電子顕微鏡観察やラベリング実験から、末端側に複製開始点が存在するものと考えられている (ESTEBAN et al. 1977, PONGO et al. 1981)。BAROUDY et al. (1983) は末端のヘアピンの一部にニックが形成され、フリーの 3' 末端がプライマーとして機能するという複製モデルを提唱している。ヘアピン末端を有する線状のプラスミド DNA が *Rhizoctonia solani* で報告されており (MIYASHITA et al. 1990), その複製機構に関してもワクシニアウイルスと基本的には同じモデルが考えられている。これらのモデルは、ヘアピン構造及び Head-to-Head, Tail-to-Tail と連結する多量体分子種の構成を説明可能である点で注目されよう。しかし、高等植物の葉緑体ゲノムの複製開始点は *atpH* の近傍に存在するという報告 (DEHAAS et al. 1986) もあり、欠失色素体 DNA の複製機構を解明するためには、より詳細な研究が必要とされよう。

IV. 色素体 DNA のコピー数と色素体の電子顕微鏡観察

1. 材料及び方法

材料として、イネの緑葉とアルビノ個体の葉を、また懸濁培養した種子由来のカルスと A5 カルスを使用した。各材料からの全 DNA を Hind III で消化し、プローブとして *rbcL* を含むイネ葉緑体 DNA クローン (pH10R) を用いたサザンハイブリダイゼーションにより、ミトコンドリアと色素体 DNA のコピー数を算出した。電子顕微鏡観察は、常法によりグルタルアルデヒド (2.5%) 及びオスミウム酸 (2% osmic acid) 溶液で 2 重固定し、エタノール (75, 90, 95, 100%) で脱水後、スパー (Spur) 樹脂に包埋した。切片はウルトラミクロトーム (LKB 社 NOVA) を用いて薄切した後、酢酸ウラニル (3%) - クエン酸鉛溶液で電子染色を行った。切片の観察は日本電子 JEM2000EX 型透過型電子顕微鏡を用い、加速電圧 100 KV で観察した。

2. 結 果

Fig. 12 に示すように A5 欠失色素体 DNA のコピー数をサザンハイブリダイゼーションのシグナルの強さから概算したところ、正常な色素体 DNA を有する種子由来カルの DNA 量とほぼ同レベルであり、細胞当たり約8,000コピー存在していた (Table 1)。また、このコピー数は同一カルス内のミトコンドリア DNA のコピー数とほぼ一致していた。

緑葉ではラメラ構造が発達した楕円形の葉緑体が細胞質全般に観察され、緑葉が光合成の器官として分化していることが示された。この葉緑体の長径は約 2-3 μm 、短径が約 1 μm であ

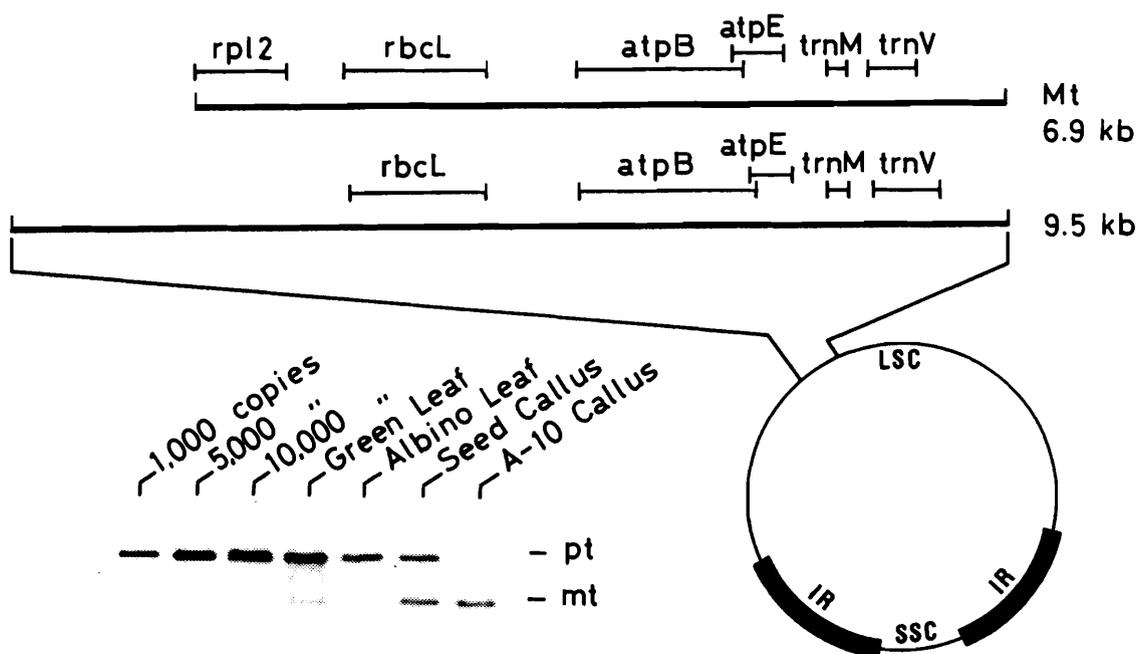


Fig. 12. DNA gel blot analysis of plastid and mitochondrial DNA. Total DNA was digested with *Hind*III, and hybridized with pH10R (9.5 kb). Lane 1 to 3 were loaded with the DNA at the equivalent of 1,000, 5,000 and 10,000 copies per haploid genome.

Table 1. Comparison of mt- and ptDNA levels in leaves and calli

	mtDNA*	ptDNA*
Green Leaf	< 300	10,000
Albino Leaf	< 300	5,000
Seed Callus	5,000	8,000
A-10 Callus	5,000	8,000

*Copies/Haploid genome

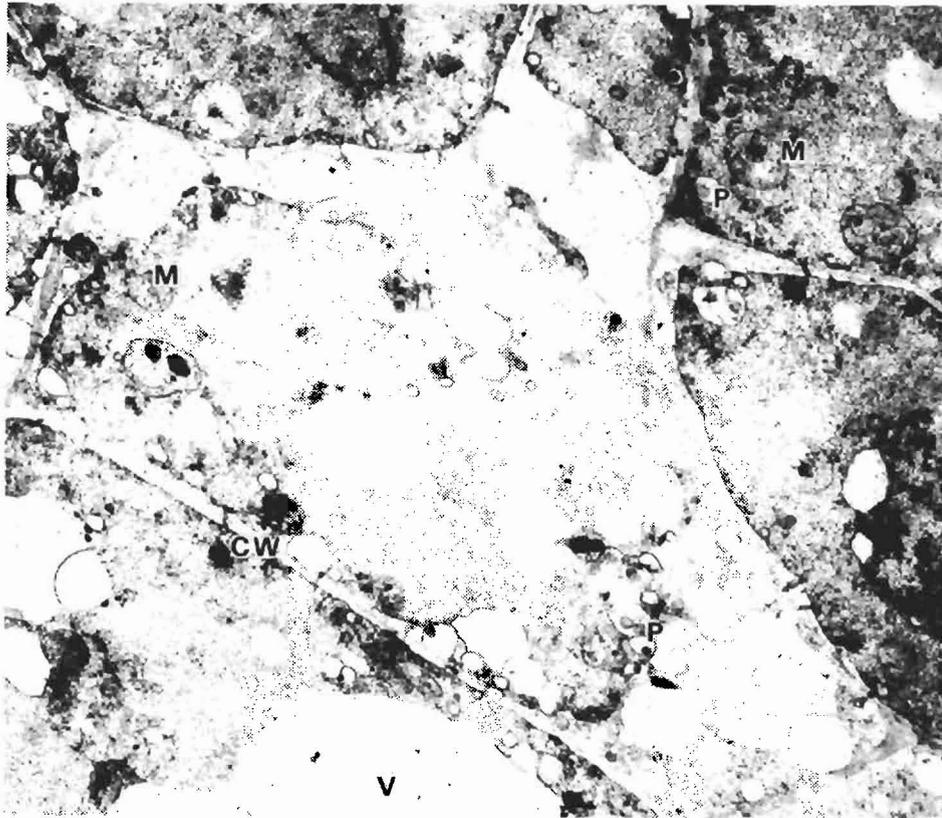


Fig. 13. Electron micrograph of a seed-derived callus. P ; Plastid, M ; Mitochondrion, V ; Vacuole, CW ; Cell wall.

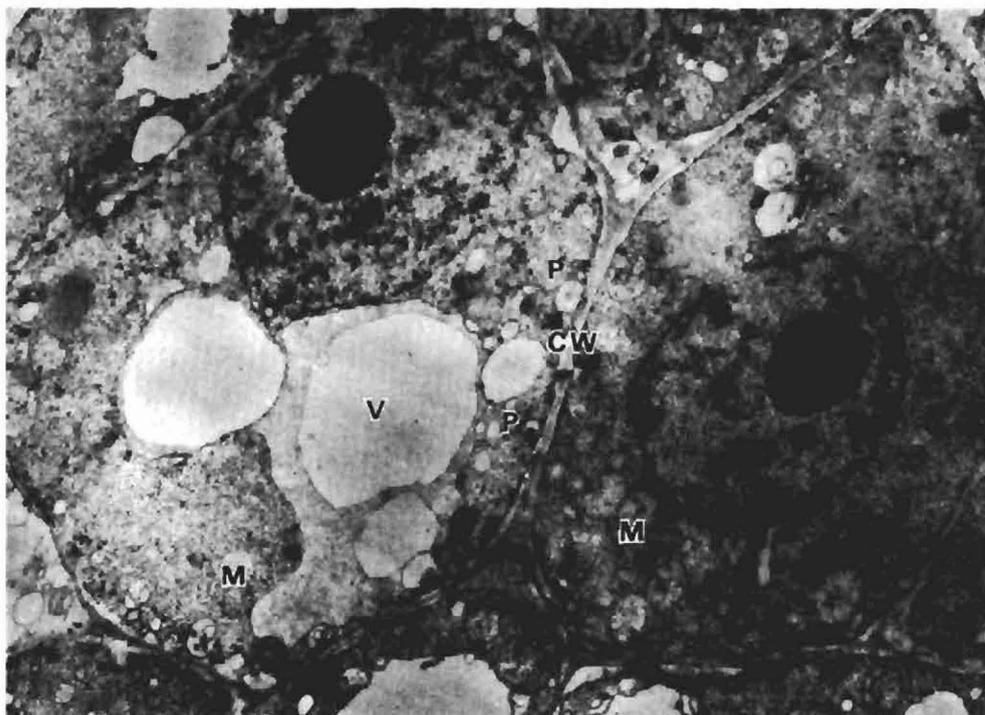


Fig. 14. Electron micrograph of the 10A callus. P ; Plastid, M ; Mitochondrion, V ; Vacuole, CW ; Cell wall.

った。一方、アルビノの葉ではこの様なグラナメラ構造を示す葉緑体は全く見られず、内部にデンプン粒を蓄積している色素体が観察された。同様な色素体は、種子由来のカルス及びA5カルスでも観察された (Fig. 13, 14)。その大きさは約 $0.5\mu\text{m}$ のやや楕円形であり、ミトコンドリアに比べ小さかった。また両カルスの細胞は、核の領域が細胞のおおよそ 1/5 を占有しており、さらに液胞が小さく、活発に分裂している細胞の特徴が観察された。

3. 論 議

欠失色素体 DNA を有するカルス内には多くの色素体が観察された。色素体 DNA のゲノム当たりのコピー数は正常カルスとほとんど変わらず、この数値はミトコンドリア DNA ともほぼ同じであった。このことから、カルス細胞内では色素体が活発に分裂しており、またこの色素体内には多くの DNA が存在しているものと考えられ、色素体 DNA の欠失現象と色素体の分裂は無関係と判断された。さらに、欠失色素体 DNA を有する色素体内では独自の翻訳系が機能していないことから、色素体ゲノム上の遺伝子の翻訳は色素体の分裂及びそのゲノムの複製には関与していないものと考えられた。

V. 正常色素体及び葉緑体におけるヘアピン末端を有する DNA

1. 材料及び方法

イネ (栽培品種 'キタアケ') のアルビノ個体の根より再度誘導されたカルス (10A と 20C) と種子由来カルス及び温室で育成された緑葉 (栽培品種 '日本晴') を使用した。2次元電気泳動は、0.8%アガロースゲルを用い 1xTAE 緩衝液で 20 V, 約15時間電気泳動し DNA を分画した後、ゲルを 50mM NaOH, 1mM EDTA pH 8.0 に約 1 時間浸漬することにより平衡化し、同緩衝液で 2次元目の電気泳動を行った。パルスフィールド電気泳動は、GUIDET et al. (1990) の方法に従って調製した試料を泳動装置として CHEF-DRIVE II (BIORAD) を使用して行った。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブ DNA はイネ葉緑体 Pst I 断片のクローン 2, 6, 9, 11, BamH I 断片クローンの 3, 7, 及び, rbcL を含む Hind III (9.6kbp) 断片の pH10R, さらにミトコンドリア DNA の cox I を使用した。

2. 結 果

緑葉と種子由来カルス及び欠失色素体 DNA を有する 10A と 20C カルスを使用し、パルスフィールド電気泳動を行った。その結果、Pst I-2 をプローブとした場合、10A と 20C は欠失色素体 DNA のため高分子分画にはバンドが全く認められなかったが、緑葉と種子カルスでは、共通して 4 本のバンドが確認された (Fig. 15)。これらのバンドのサイズをマーカー DNA から求めたところ、約 130, 260, 390, 520 kbp であり、イネのゲノムサイズを基本とする倍数分

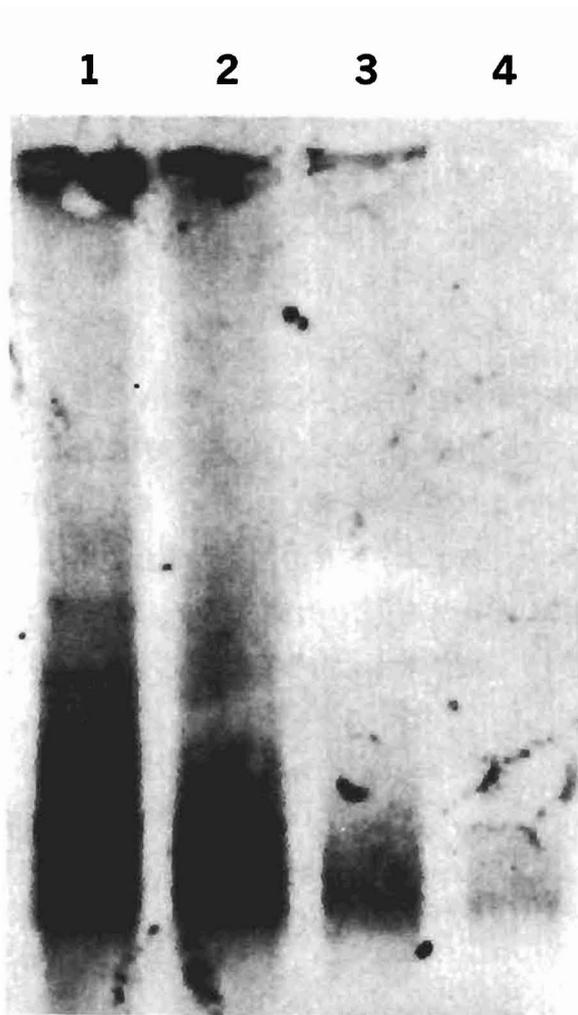


Fig. 15. DNA gel blot analysis with a chloroplast DNA clone (Pst I-2) as probe. Lane 1 ; green leaves, lane 2 ; seed callus, lane 3 ; 20C callus, lane 4 ; 10A callus.

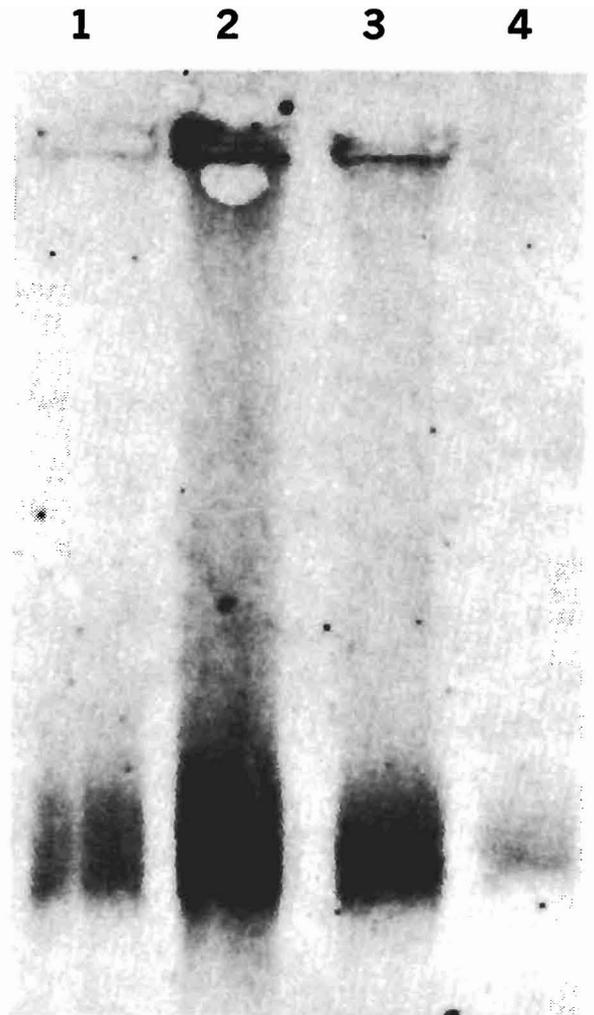


Fig. 16. DNA gel blot analysis with a mitochondrial genes specific probe (cox I). Lane 1 ; green leaves, lane 2 ; seed callus, lane 3 ; 20C callus, lane 4 ; 10A callus.

子であった。これらのバンドはミトコンドリア DNA のプローブ *cox I* を使用した場合には確認されなかった (Fig. 16)。

次に、2次元電気泳動による色素体 DNA の解析を行った。その結果、緑葉と種子由来カルスを制限酵素消化なしで泳動した場合、また両 DNA を *Sal I* で消化し泳動を行った場合のどちらにも、対角線上に色素体 DNA の強いシグナルが得られた (Fig. 17, 18)。このシグナルに加えて、もう1本のラインが確認され、そのサイズは Major なラインの2倍のサイズに位置するところに形成された。

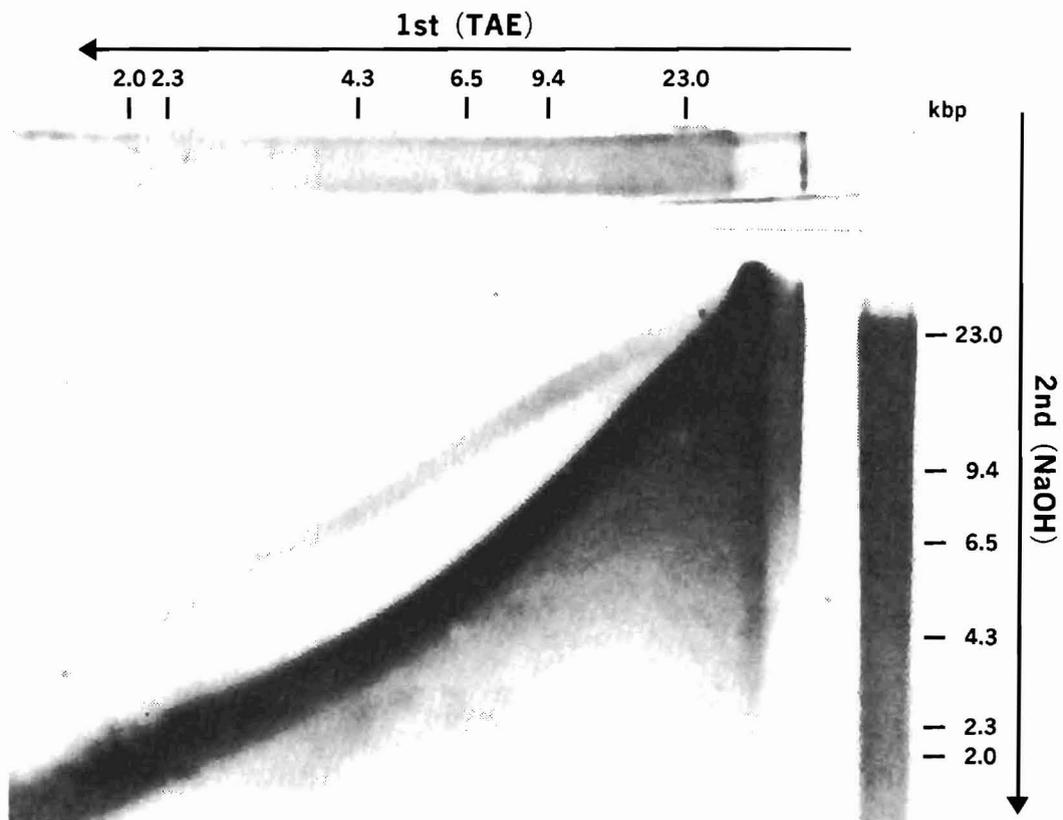


Fig. 17. Separation on two dimensional neutral/alkaline gels of total DNA from seed-derived callus. Total DNA was loaded on a gel which was blotted onto nylon membrane and probed with a mixture of chloroplast DNA clones.

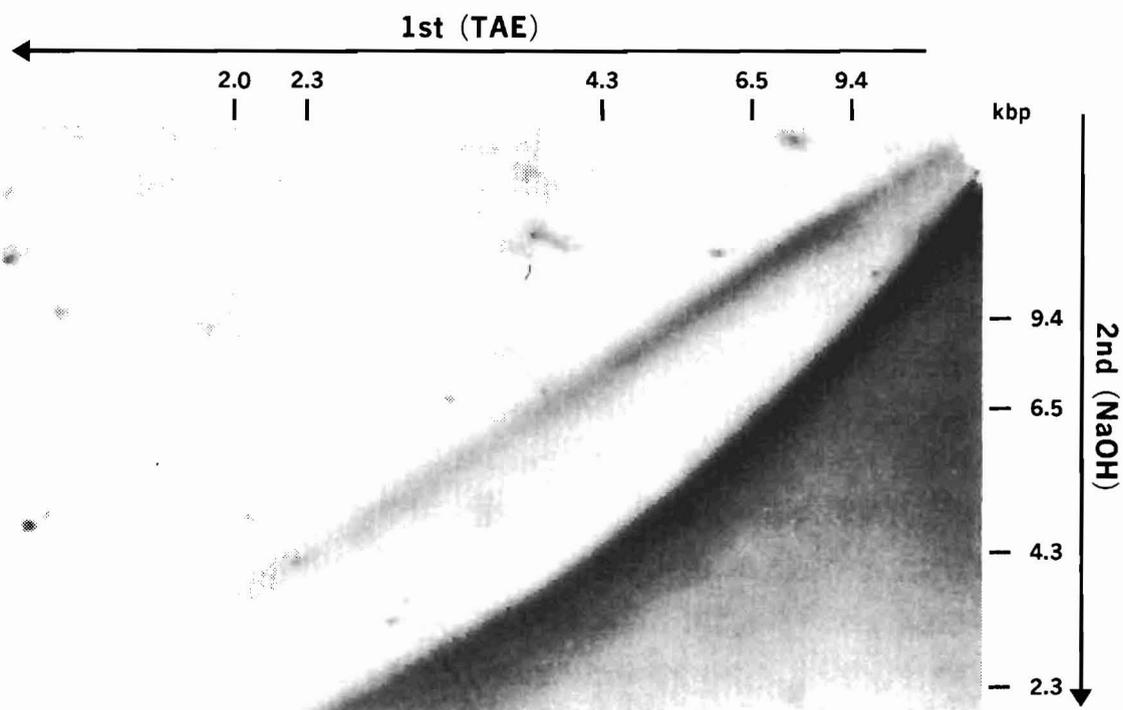


Fig. 18. Separation on two dimensional neutral/alkaline gels of total DNA from green leaves. Total DNA was loaded on a gel which was blotted onto nylon membrane and probed with a mixture of chloroplast DNA clones.

3. 論 議

2次元電気泳動で対角線上に2本のラインが形成された。このうち Major ラインは、1次元目におけるサイズと同一サイズに位置するところに形成された。このラインは色素体 DNA が抽出などの調製中にランダムに剪断された分子によるものと考えられる。このラインに加え、1次元目のサイズに対し、2次元目ではそのサイズを2倍とする位置にもラインが形成された。剪断された DNA が2次元目のアルカリ変性条件下でサイズを2倍としたことは、片方の末端がヘアピンで閉じていた分子が変性条件下でそのヘアピンを開いた結果と考えられた。このことから、ヘアピン末端構造を有する色素体 DNA が正常なカルスの色素体や葉緑体に存在することが明らかにされた。この事実は COLLIN and ELLIS (1991) によって、オオムギ葉緑体から得られた事実と一致する。彼らは、この様なヘアピン末端を有する分子は全体の約2%であると概算しているが、今回得られたイネの実験結果からは、その量を正確に算出することは出来なかった。

ホウレンソウ、エンドウマメ、スイカの葉緑体 DNA が単量体から4量体までの線状分子を構成すると報告されている (DENG et al. 1989, BENDICH and SMITH 1990)。イネのカルス内の色素体及び緑葉の葉緑体においても、ゲノムサイズを基本とする Oligomeric な分子種の存在が明らかにされた。この線状と考えられる DNA 分子の末端がヘアピン構造である可能性がある。この点を明らかにするためには、2次元のパルスフィールド電気泳動実験や制限酵素による断片化、使用するプローブ DNA の種類を変えるなど、より詳細な解析実験が必要とされよう。

VI. 総 合 論 議

欠失色素体 DNA 分子を有するカルスの培養速度は、正常な色素体 DNA を有する種子由来カルスとほとんど同じであった。また、これらのカルスの色素体 DNA 量を概算したところ、活発な増殖を続ける懸濁培養条件下ではミトコンドリア DNA 量とほぼ同レベルのコピー数が存在していた。光合成を全く行わないカルス内で、何故このように色素体 DNA の高いコピー数を必要とするのであろうか？ もし、カルスの増殖のためになんらかの生理学的な機能を有する遺伝子が色素体 DNA 上に存在するとすれば、その遺伝子は、A5 と 20C カルス内で残存する欠失色素体 DNA の共通領域 (Fig. 19) に存在しなければならない。

欠失色素体 DNA は rRNA や tRNA 遺伝子が欠失していることから、残存領域の遺伝子は翻訳産物として機能しているとは考えられない。約 3 kbp の共通残存領域には trn 遺伝子群があるのみである (Fig. 19)。このうち、trnE はポリフィリン生合成系においてグルタミン酸の活性化に必要とされる (SCHON et al. 1986 ; SMITH 1988)。また、Fig. 20 に示すようにリガゼなどの酵素群は核ゲノムにコードされている (KANNANGARA et al. 1988 ; GRIMM 1990)。欠失色素体 DNA の全ては、tRNA 領域を保持していた。さらにイネのこの領域に相当する部

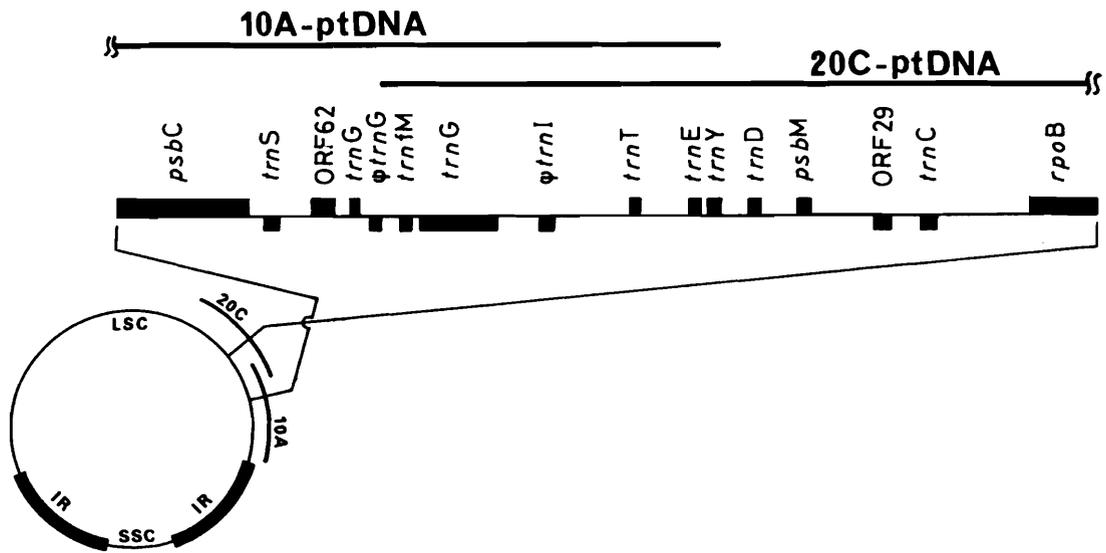


Fig. 19. Overlapping region of the deleted plastid DNA retained in 20C and 10A callus.

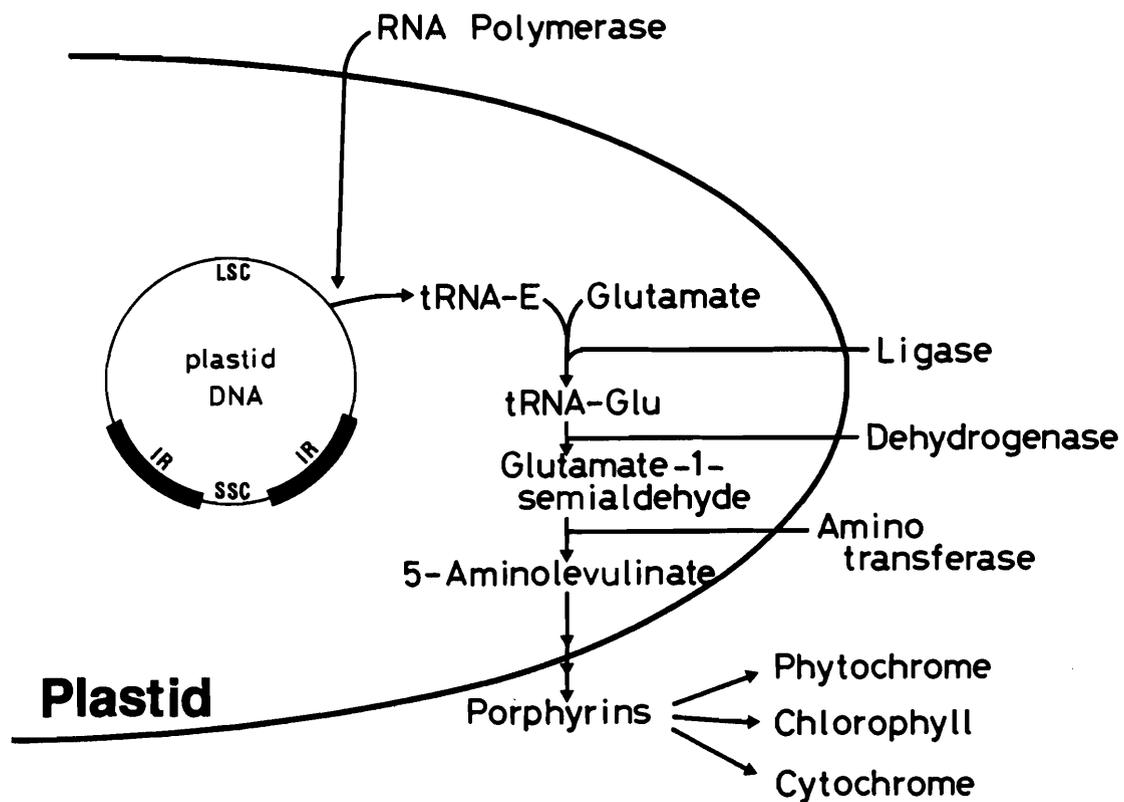


Fig. 20. Outline of the biosynthetic pathway of porphyrin in plant.

位がコムギやオオムギの欠失色素体 DNA でも必ず残存していた (DAY and ELLIS 1985)。以上のことから、ミトコンドリアやその他の細胞内小器官の代謝に必要なポルフィリンの生合成には残存領域の *trnE* の転写が必要であり、この理由により、色素体 DNA の *trnE* 領域が残されるものと考えられた。また、この *trnE* の転写は色素体ゲノム上の *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* の翻訳産物 (HU and BOGORAD 1990) により転写されるのではなく、核コードの RNA ポリメ

ラーゼが関与しているであろう。

以上の結果から、正常な色素体や葉緑体に存在するヘアピン構造の末端を有する DNA が、花粉培養の初期過程において生じる色素体 DNA の消化からまぬがれ、その一部が残された結果がアルビノ発生の原因の一つと考えられる。アルビノ発生率は核遺伝子に支配されていることから (BULLOCK et al. 1982)、色素体 DNA の消失には核ゲノムにコードされている遺伝子の関与が予想される。この消失過程をより詳細に検討することが、アルビノ発生の防止策につながるかも知れない。

葉緑体への導入ベクター DNA を構築するためには、葉緑体内で機能する複製機構を有することが必要とされる。複製の機構はまだ良く判っていないが、末端がヘアピンで閉じていることで可能と考えられた。相同組換えを利用した葉緑体への遺伝子導入系が報告されているが、その効率は極めて低い (DANIELL et al. 1990, JEFFREY et al. 1992)。これらの導入 DNA には、複製に関与すると考えられている領域を考慮して構築されたものもあるが (SPORLEIN et al. 1991)、葉緑体ゲノムの複製機構そのものは未だ不明の点が多く、効率的なベクター構築の支障となっている。本研究で明らかにされた、欠失色素体 DNA の構造、すなわち両末端がヘアピンで閉じており、trnE 遺伝子領域を有することが、色素体内で最終的に機能する複製可能な DNA 分子と考えられることから、この基本的要素を満たした組換え DNA を構築し、葉緑体へ導入する実験系を検討する必要がある。また、この様な研究を通して、正常な葉緑体ゲノムと共存可能な葉緑体専用のベクター DNA が構築できる可能性も考えられる。

VII. 要 約

1. イネ葯培養由来のアルビノの色素体 DNA には大規模な欠失構造を有する色素体 DNA が存在した。欠失の領域は個体によって異なり、またその規模も約 10 kbp から 100 kbp を越えるものまでと様々であった。

2. 欠失の構造を詳細に検討したところ、両末端がヘアピンで閉じている線状分子であった。さらに、この分子が Head-to-Head, Tail-to-Tail の様式で連結した単量体から 4 量体の分子が混在していることが確認された。

3. カルス内の欠失色素体 DNA は種子由来カルスの正常な色素体 DNA とほとんど同じコピー数を有していた。また、このコピー数はミトコンドリア DNA とほぼ一致するものであり、欠失色素体 DNA の生理学的機能について考察された。

4. 欠失色素体 DNA を有するカルスには正常色素体 DNA を有するカルスと同様、多くの色素体が電子顕微鏡により観察されたことから、色素体の分裂には色素体 DNA にコードされる遺伝子の翻訳産物は関与していないものと考えられた。

5. 正常な色素体 DNA や緑葉の葉緑体 DNA は 135 kbp を基本サイズとする単量体から 4 量体までの分子種を構成していることが明らかにされ、これらの分子構造について考察された。

6. 正常な DNA を有する色素体や緑葉の葉緑体にも、ヘアピン構造を有する DNA 分子の

存在が明らかにされた。

7. 葉緑体への遺伝子導入系に機能するベクターとして、ヘアピン末端を有する欠失色素体 DNA 分子の使用について論議された。

謝 辞

本研究において多くの御指導・御助言をくださった齋藤健一先生，新関稔先生，石川隆二先生並びに育種学教室諸氏に深くお礼申し上げます。また，電子顕微鏡観察にご協力いただいた藤田隆先生に厚くお礼申し上げます。

引 用 文 献

- ABE, T and Y. FUTSUFARA 1980. Varietal difference of plant regeneration from callus tissue in rice. Jap J Breed 34 : 147-155.
- BAROUDY, BM., S. VENKATESAN and B. MOSS 1983. Structure and replication of vaccinia virus telomeres. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 47 : 723-729.
- BENDICH, A. J. and S. B. SMITH 1990. Moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis show linear DNA molecules from chloroplasts and mitochondria. Curr Genet 17 : 421-425.
- BULLOCK, W. P., P. S. BAENZIGER, G. W. SCHAEFFER and P. J. BOTTINO 1982. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) Fls and their reciprocal crosses. Theor Appl Genet 62 : 155-159.
- BURGESS, D. G. and W. C. TAYLOR 1988. The chloroplast affects the transcription of a nuclear gene family. Mol Gen Genet 214 : 89-96.
- CHEN, C. C. and M. H. LIN 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot Bull Acad Sin 17 : 18-24.
- CHOWDHURY, M. K. U, G. W. SCHAEFFER, R. L. SMITH and B. F. MATTHEWS 1988. Molecular analysis of organelle DNA of different subspecies of rice and the genome stability of mtDNA in tissue cultured cells of rice. Theor Appl Genet 76 : 533-539.
- CLAMPHAM, D. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. Z Pflanzenzuchtg 69 : 142-155.
- COLLIN, S. and T. H. N. ELLIS 1991. Evidence for the presence of hairpin chloroplast DNA molecules in barley cultivars. Curr Genet 20 : 253-258.
- DAY, A and T. H. N. ELLIS 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen : Possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. Cell 39 : 359-368.

- DAY, A and T. H. N. ELLIS 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr Genet* 9 : 671-678.
- DANIELL, H., J. VIVEKANANDA, B. L. NIELSEN, G. N. YE, K. K. TEWARI and J. C. SANFORD 1990. Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1721-1725.
- DEHAAS, J. M., K. J. M. BOOT, M. A. HARING, A. D. J. KOOL, H. J. J. NIJKAMP 1986. A *Petunia hybrida* chloroplast DNA region, close to one of the inverted repeats, shows sequence homology with the *Euglena gracilis* chloroplast DNA region that carries the putative replication origin. *Mol Gen Genet* 202 : 48-54.
- DEPAMPHILIS, C. W., J. D. PALMER 1990. Loss of photosynthetic and chloroplast respiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* 348 : 337-339.
- DENG, X-W. and W. GRUISSEM 1988. Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J* 7 : 3301-3308.
- DENG, X-W., R. A. WING and W. GRUISSEM 1989. The chloroplast genome exists in multimeric forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 4156-4160.
- ELLIS, T. H. N. and A. DAY 1986. A hairpin plastid genome in barley. *EMBO J* 5 : 2769-2774.
- ESTEBAN, M, L. FLORES and J. A. HOLOWCZAK 1977. Model for vaccinia virus DNA replication. *Virology* 83 : 467-473.
- FAURON, C., M. HAVLIK, D. LONSDALE and L. NICHOLS 1989. Mitochondrial genome organization of the maize cytoplasmic male sterile type T. *Mol Gen Genet* 216 : 395-401.
- GENOVESI, A. D. and C. W. MAGILL 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci* 19 : 662-664.
- GRIMM, B. 1990. Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis : Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 4169-4173.
- GUIDET, F., P. ROGOWSKY and P. LANGRIDE 1990. A rapid method of preparing megabase plant DNA. *Nuc Acids Res* 18 : 4955.
- HAGEMANN, R. and T. BORNER 1978. Plastid ribosome-deficient mutants of higher plants as a tool in studying chloroplast biogenesis. In : Akoyunoglou G, Argyroudi-Akoyunoglou J (eds). *Chloroplast development*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 709-720.
- HEILES, H. B. J., E. GENERSCH, C. KESSLER, R. NEUMANN and H. J. EGGERS 1988. *In situ*

- hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papilloma viruses (HPV016/18) in HeLa and SiHa cells. *BioTechniques* 6 : 978-981.
- HIRATSUKA, J., H. SHIMADA, R. WHITTIER, T. ISHIBASHI, M. SAKAMOTO, M. MORI, C. KONDO, Y. HONJI, C-R. SUN, B-Y. MENG, Y-Q. LI, A. KANNO, Y. NISHIZAWA, A. HIRAI, K. SHINOZAKI and M. SUGIURA 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome : Inter molecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217 : 185-194.
- HOLT, I. J., A. E. HARDING and J. A. MORGAN-HUGHES 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 : 717-719.
- HOWE, C. J. and A. G. SMITH 1991. Plants without chlorophyll. *Nature* 349 : 109.
- HU, J. and L. BOGORAD 1990. Maize chloroplast RNA polymerase : The 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1531-1535.
- HUANG, H. 1984. The relative efficiency of microspore culture and chromosome elimination as methods of haploid production in *Hordeum vulgare* L. *Z Pflanzenzuchtg* 92 : 22-29.
- JEFFREY, M. S. and P. MALIGA 1991. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* 4, 39-45.
- KANNANGARA, C. G., S. P. GOUGH, P. BRUYANT, J. K. HOOBER, A. KAHN and D. VONWETTSTEIN 1988. tRNA^{Glu} as a cofactor in δ -aminolevulinate biosynthesis ; Steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends Biochem Sci* 13 : 139-143.
- KEMBLE, R. J., S. A. YARROW, S.-C. WU, 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.
- KIRK, J. T. O. and R. A. E. TILNEY-BASSETT 1978. The Plastid : Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- KUROIWA, T., S. KAWANO and S. NISHIBAYASHI 1982. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* 298 : 481-483.
- LONSDALE, D. M., T. P. HODGE, C. M.-R. FAURON 1984. The physical map and organization of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. *Nuc Acids Res* 12 : 9249-9261.
- MITA, S., R. RIZZUTO, C. T. MORAES, S. SHANSKE, E. ARNANDO, G. M. FABRIZI, Y. KOGA, DIMAURO, E. A. SCHON 1990. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nuc Acids Res* 18 :

561-567.

- MIYAMURA, S., T. KUROIWA and T. NAGATA 1987. Disappearance of plastid and mitochondrial nucleoids during the formation of generative cell(s) of higher plants revealed by fluorescence microscopy. *Protoplasma* 141 : 149-159.
- MIYASHITA, S., H. HIROCHIKA, J. IKEDA and T. HASHIBA 1990. Linear plasmid DNAs of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* with unique terminal structures. *Mol Gen Genet.* 200 : 165-171.
- MOON, E., T.-H. KAO and R. WU 1988. Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol Gen Genet* 213 : 247-253.
- MURRAY, M. G., W. F. THOMPSON 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nuc Acids Res* 8 : 4321-4325.
- NGERNPRASIRTSIRI, J., H. KOBAYASHI and T. AKAZAWA 1988. DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 4750-4754.
- OELMULLER, R. and H. MOHR 1986. Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 167 : 106-113.
- OONO, K. 1981. *In vitro* methods applied to rice, In ; THORPE, T. A.(ed) *Plant tissue culture, methods and application in agriculture.* Academic Press, New York, pp. 273-298.
- PALMER, J. D. and C. R. SHIELDS 1984. Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307 : 437-440.
- PONGO, B. G. T., M. O'SHEA and P. FREIMUTH 1981. Initiation and termination of vaccinia virus DNA replication. *Virology* 108 : 241-248.
- POSSINGAM, J. V. 1980. Plastid replication and development in the life cycle of higher plant. *Annu Rev Plant Physiol* 31 : 113-129.
- RODE, A., C. HARTMANN, M. DRON, E. PICARD and F. QUETIER 1985. Organelle genome stability in anther-derived doubled haploids of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Moisson). *Theor Appl Genet* 71 : 320-324.
- RODERMEL, S. R., M. S. ABBOTT, L. BOGORAD 1988. Nuclear-organelle interactions : Nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell* 55 : 673-681.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSH and T. MANIATIS 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SASAKI, Y. and T. KUROIWA 1988. Effect of chloramphenicol and lincomycin on chloroplast DNA amplification on greening pea leaves. *Plant Mol Biol* 11 : 585-588.
- SCHON, A., G. KRUPP, S. GOUGH, S. BERRY -LOWE, C. G. KANNANGARA and D. SOLL 1986. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast

- glutamate tRNA. *Nature* 332 : 281-284.
- SCHON, E. A., R. RIZZUTO, C. T. MORAES, H. NAKASE, M. ZEVIANI and S. DiMAYRI 1989. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244 : 346-349.
- SCOTT, N. S., P. CAIN and J. V. POSSINGHAM 1982. Plastid DNA levels in albino and green leaves of the albstrians mutant of *Hordeum vulgare*. *Z Pflanzenphysiol* 108 : 187-191.
- SHIMADA, H. and M. SUGIURA 1989. Pseudogenes and short repeated sequences in the rice chloroplast genome. *Curr Genet* 16 : 293-301.
- SICULELLA, L. and J. D. PALMER 1988. Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atp A* gene. *Nuc Acids Res* 16 : 3787-3799.
- SMITH, A. G. 1988. Subcellular localization of two porphyrin synthesis enzymes in *Pisum sativum* (pea) and *Arum* (cuckoopint) species. *Biochem J* 249 : 423-428.
- SPORLEIN, B., M. STREUBEL, G. DAHLFELD, P. WESTHOFF and H. U. KOOP 1991. PEG-mediated plastid transformation : A new system for transient gene expression assays in chloroplasts. *Theor Appl Gen* 82, 717-722.
- STERN, D. B. and J. D. PALMER 1984. Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 1946-1950.
- STERN, D. B. and J. D. PALMER 1986. Tripartite mitochondrial genome of spinach : physical structure, mitochondrial gene mapping, and locations of transposed chloroplast DNA sequences. *Nuc Acids Res* 14 : 5651-5666.
- SUGIURA, M. and J. KUSUDA 1979. Molecular cloning of tobacco chloroplast ribosomal RNA genes. *Mol Gen Genet* 172 : 137-141.
- SUGIURA, M., K. SHINOZAKI, N. ZAITA, M. KUSUDA and M. KUMANO 1986. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction fragments : Mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Sci* 44 : 211-216.
- SUGIURA, M. 1989. The chloroplast chromosomes in land plants. *Annu Rev Cell Biol* 5 : 51-70.
- SUN, C. S., S. C. WU, C. C. WANG and C. C. CHU 1979. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen plantlets of rice. *Theor Appl Genet* 55 : 193-197.
- VAUGHN, K. C., L. R. DEBONTE, K. G. WILSON and G. W. SCHAEFFER 1980. Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. *Science* 208 : 196-198.