



Title	イネカルスにおけるアイソザイム遺伝子の発現様式
Author(s)	石川, 隆二; ISHIKAWA, Ryuji; 森, 宏一 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(4), 371-379
Issue Date	1987-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12080
Type	departmental bulletin paper
File Information	15(4)_p371-379.pdf



イネカルスにおけるアイソザイム遺伝子の発現様式

石川隆二・森 宏一

森島啓子*・木下俊郎

(北海道大学農学部作物育種学教室)

(*国立遺伝学研究所)

(昭和62年6月15日受理)

Expression Pattern of Isozyme Genes in Rice Calli

Ryuji ISHIKAWA, Koh-ichi MORI, Hiroko MORISHIMA*

and Toshiro KINOSHITA

(Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture,

Hokkaido University, Sapporo, 060 Japan)

(*National Institute of Genetics, Mishima, 411 Japan)

緒 言

電気泳動法と酵素活性染色法の進歩により遺伝子の発現がゲル上の複数のバンドとして観察されるようになった⁸⁾。その結果1つの酵素種に属し基質特異性を同じくするものが、その分子構造の差に由来する電荷の違いによってゲル上で区別されることが明らかにされた。MARKERT & MOLLER¹¹⁾らはこの酵素種をアイソザイムと呼ぶことを提唱した。

酵素多型は、その発現を担う遺伝子系を反映していることが多く、国際生化学連合による定義では、アイソザイムを酵素多型のうち遺伝的な差異に由来することが明らかなものとして規定した。

植物におけるアイソザイムの研究が始められた1960年代に、イネにおいてもパーオキシダーゼ、酸性フォスファターゼおよびエステラーゼに関して野生種、栽培種における種間および種内変異の調査が行われた^{4,5,23,24)}。その後、さらに多数の遺伝子座に関して広汎な系統間および品種間の変異調査が行われた^{7,22)}。現在までに32の遺伝子座が同定されているが(RGN 3)、そのうち座乗染色体が明らかにされているのが12遺伝子あり、連鎖関係の報告されているものが、そのうち5遺伝子である^{9,13,17,18,19)}。一方、植物育種の分野において、アイソザイムは個体レベルおよび細胞レベルにおける遺伝的標識と

して利用されている。特に培養細胞においては、脱分化の過程を経るため従来の形態的標識を用いることができないので、細胞で作られる遺伝子の直接産物であるアイソザイム遺伝子はきわめて有望である。既に、タバコ、ペチュニアおよびセロリなどではアイソザイムが標識として用いられている^{3,10,16)}。イネカルスではエステラーゼの形質発現の報告があるが¹⁵⁾、培養中にその発現様式が変化する結果も得られており、標識として用いるには更なる検討が望まれる。

本研究においては、8酵素種14アイソザイム遺伝子について、カルスにおける標識遺伝子としての利用を検討した。

材料および方法

本実験に供試した材料は、栽培種 (*Oryza sativa*) に属する日本型品種しおかりと台中65号、およびしおかりの遺伝的背景に10種の矮性遺伝子をそれぞれ戻し交雑法により導入した同質遺伝子系統、台中65号の遺伝的背景に21種の主働遺伝子をそれぞれ持つ同質遺伝子系統 (Table 1)、国立遺伝学研究所に系統維持されているインド型2品種 (Ac. 001, Ac. 414) と野生籾 *O. rufipogon* (= *O. perennis*) に属する1系統 W 106 であった。

培養細胞の作成: 本実験に供試したカルスは北海道大学農学部作物育種学教室において作成維持されているも

1) 北海道大学農学部作物育種学教室業績

2) 文部省科学研究費 (一般 B, 課題番号 61480030) による研究成果

Table 1. List of isogenic lines used

a) Isogenic lines of "Shiokari"

Isoline	Number of backcrossing generation	Gene symbol	Character expression
ID-1	11	<i>d-1</i>	daikoku dwarf
ID-6	7	<i>d-6</i>	ebisumochi dwarf
ID-7	9	<i>d-7</i>	heiei-daikoku dwarf
ID-10	9	<i>d-10</i>	toyohikari-bunwai dwarf
ID-17	8	<i>d-17</i>	slender dwarf
ID-18 ^h	10	<i>d-18^h</i>	hosetsu dwarf
ID-19	9	<i>d-19</i>	kamikawa dwarf
ID-30	7	<i>d-30</i>	waisei-shirasasa dwarf
ID-35	10	<i>d-35</i>	tanginbozu dwarf
ID-47	7	<i>sd-1</i>	Taichung Native-1 dwarf

b) Isogenic lines of "Taichung 65"

Isoline	Number of backcrossing generation	Gene symbol	Character expression
T 65 A	11	<i>A</i>	Anthocyanin activator
T 65 APn	11	<i>A, Pn</i>	Purple node
T 65 bc-1	10	<i>bc-1</i>	brittle culm
T 65 Cl	9	<i>Cl</i>	Clustered spikelets
T 65 d-1	6	<i>d-1</i>	daikoku dwarf
T 65 d-2	9	<i>d-2</i>	ebisu dwarf
T 65 dl	5	<i>dl</i>	drooping leaf
T 65 Pn	11	<i>Pn</i>	Purple node
T 65 Ef-1	10	<i>Ef-1</i>	Earliness
T 65 fgl	10	<i>fgl</i>	faded green leaf
T 65 fs-1	7	<i>fs-1</i>	fine stripes in leaf margin
T 65 g-1	14	<i>g-1</i>	long sterile lemmas
T 65 gh-1	7	<i>gh-1</i>	gold hull and internode
T 65 gl-1	10	<i>gl-1</i>	glabrous leaf and hull
T 65 la	6	<i>la</i>	"lazy" growth habit
T 65 lg	11	<i>lg</i>	liguleless
T 65 nl-1	8	<i>nl-1</i>	neck leaf
T 65 pgl	8	<i>pgl</i>	pale green leaves
T 65 sd-1 (Tn)	6	<i>sd-1</i>	Taichung Native-1 dwarf
T 65 sd-1 (Ts)	6	<i>sd-1</i>	Taichung Shen-2 dwarf
T 65 wx	27	<i>wx</i>	glutinous endosperm

のである。これらは M6 培地を用い、上記各系統の種子胚からカルスを誘導し、およそ 10 日おきに継代したものである。誘導後 2~3 カ月経たものを“初期カルス”とし、1 年以上経たものを“後期カルス”として実験に用いた。しおかりと台中 65 号については根から誘導したカルスも用いた。

電気泳動法とアイソザイムの染色：植物体の場合には発芽後 4~5 日の幼芽、幼根および成熟した個体の緑葉を用い、カルスの場合は各系統から幾つかの小塊をとりだし混合したものをを用いた。アイソザイムの種類は Table 2 に示した 8 酵素種 14 遺伝子について調べた。なお遺伝子記号はイネ遺伝子記号命名委員会の提案 (RGN 3) に従っている。対立遺伝子の記号は標準化されていないの

で著者らの使用する記号を用いた。

電気泳動には澱粉支持体を用い、連続緩衝液系と不連続緩衝液系の 2 方法によった。緩衝液の組成とアイソザイム染色法は *CARDY et al.*²⁾ の方法を参考にした (Table 3, 4)。連続緩衝液系では 14%、不連続緩衝液系では 0.83% の蔗糖を加え、13% の澱粉濃度でゲルを作り、擦りつぶした試料を吸収させたフィルターをゲルに挿入し泳動を行った。両系とも 60 mA の定電流で泳動を始め、連続緩衝液系では 5 時間、不連続緩衝液系では泳動開始 1 時間後に 170 V の定電圧に変えて計 5 時間 20 分後に泳動を終え、ゲルは 5~5 枚にスライスし、37°C の恒温器内 (*Cat-1*, *Pox-1* および *Pox-2* は室温) で各アイソザイムの活性染色を行った。

Table 2. Isozyme loci used in this experiment

Gene symbol	Enzyme species	Gene symbol	Enzyme species
<i>Acp-1</i>	Acid phosphatase (E. C. 3. 1. 3. 2.)	<i>Est-9</i> (= <i>Est-cl</i>)	Esterase (E. C. 3. 1. 1. -)
<i>Amp-1</i>	Aminopeptidase (E. C. 3. 4. 11. -)	<i>Pgd-1</i>	Phosphogluconate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 43.)
<i>Amp-2</i>	do. (Alanine NA substrate)	<i>Pgi-1</i>	Phosphoglucose isomerase (E. C. 5. 3. 1. 9.)
<i>Amp-3</i> (= <i>Amp-1</i>)	do. (Leucyl NA substrate)	<i>Pgi-2</i>	do.
<i>Cat-1</i>	Catalase (E. C. 1. 11. 1. 6.)	<i>Pox-1</i> (= <i>Px-1</i>)	Peroxydase (E. C. 1. 11. 1. 7.)
<i>Est-2</i>	Esterase (E. C. 3. 1. 1. -)	<i>Pox-2</i> (= <i>Px-2</i>)	do.
<i>Est-5</i>	do.	<i>Sdh-1</i>	Shikimate dehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 25.)

Table 3. Electrode buffer systems

System	Gel buffer	Electrode buffer
Continuous buffer system	1.5 mM Histidine-HCl titrate to pH 7.6 with Tris	0.4 M Tris titrate to pH 7.6 with Citric acid
Discontinuous buffer system	A. 0.05 M Tris titrate to pH 8.1 with Citric acid	0.19 M H ₃ BO ₃ titrate to pH 8.1 with NaOH
	B. Electrode buffer (A : B = 9 parts : 1 part)	

実験結果

1. 植物体におけるアイソザイム遺伝子の発現様式

本実験に用いたアイソザイム遺伝子は、*Pox-1* を唯一

の例外としてすべて催芽後 4~5 日の幼芽において観察された。その中で個体の発育に伴いその発現を変えるものがあり、植物体の発育段階に応じた発現様式の変化は大きく 3 つに分けられた (Table 5)。

Table 4. Staining buffers and solutions

Enzyme	Buffer	Staining solution
ACP	75 ml 0.1 M Sodium acetate titrate to pH 5.0 with Acetic acid	100 mg Fast Garnet GBC 36 mg α -Naphthyl Phosphate
AMP	75 ml 0.1 M Tris titrate to pH 6.0 with Maleic acid	12.5 mg Fast Black K salt 40 mg DL-Alanin- β -naphthylamide (for <i>Amp-1</i> , <i>Amp-2</i>) 40 mg L-Leucyl- β -naphthylamide (for <i>Amp-1</i> , <i>Amp-3</i>)
CAT	————	A 100 ml Distilled water 1 ml H ₂ O ₂ (3%) B 90 ml Distilled water 5 ml FeCl ₃ (8%) 5 ml K ₃ Fe(CN) ₃ (8%) (leave for a few minutes in A solution after rinsed with distilled water then leave for B solution)
EST	50 ml 0.2 M NaH ₂ PO ₄ 10 ml 0.38 M Na ₂ HPO ₄ 40 ml Distilled water	2.5 ml N-Propanol 50 mg Fast Blue RR 15 mg α -Naphthylacetate (for <i>Est-5</i>) 20 mg β -Naphthylacetate (for <i>Est-2</i> , <i>Est-9</i>)
PGD	75 ml 0.05 M Tris titrate to pH 8.5 with HCl	10 mg 6-Phosphogluconic acid NA ₃ 5 mg NADP 5 mg MTT 5 mg PMS
PGI	do.	40 mg D-Fructose-6-phosphate 10 units G ₆ PDH 5 mg NADP 5 mg MTT 5 mg PMS
POX	100 ml 0.05 M Potassium acetate titrate to pH 5.0 with Acetic acid	10 mg 3-Amino-9-ethylcarbazole 10 ml Acetone 2 ml 0.1 M CaCl ₂ 1 ml H ₂ O ₂ (3%), Acetic acid (1%) 2 drops of Eugenole
SDH	75 ml 0.1 M Tris titrate to pH 9.0 with HCl	5 mg Shikimic acid 5 mg NADP 5 mg MTT 5 mg PMS

Table 5. Three types of organ specific expression at 14 isozyme loci in plant tissue

Expression type	Young root	Plumule	Mature leaf	Isozyme gene
I	+	+	+	<i>Est-2, Pgi-1, Pgi-2</i> and <i>Sdh-1</i>
II	+	+	+(m)	<i>Acp-1, Amp-1, Amp-2</i> <i>Amp-3</i> and <i>Est-5</i>
III	+	+	0	<i>Est-9</i> and <i>Pgd-1</i>
	0	+	+	<i>Pox-2</i>
	0	+	0	<i>Cat-1</i>
	0	0	+#	<i>Pox-1</i>

+: strong activity present.

+#: strong activity (in flowering time).

+: activity present but weak.

+(m): major band modified.

0: no activity present.

1. 植物の全生育時期・器官において発現様式が変化しないもの
2. 特定の時期に発現様式が変化してバンドが修飾されるもの
3. 特定の時期および器官において発現するが、それ以外では発現されないもの

1のタイプには3酵素種4遺伝子 (*Est-2, Pgi-1, Pgi-2* および *Sdh-1*) が含まれた。

2のタイプには3酵素種5遺伝子 (*Acp-1, Amp-1, Amp-2, Amp-3* および *Est-5*) が含まれた。*Acp-1* は幼芽においては1本の主要バンド (A) として発現し、成葉になると3本の主要バンド (A, M, C) と3本の微

少バンド (a, m, c) として発現した⁶⁾。アミノペプチターゼに属する3種のアイソザイム遺伝子は何れも幼芽において1本の主要バンドが発現したが、生育が進むにつれ1ないし数本のバンドにより修飾されたため、対立遺伝子の識別が困難となった。*Est-5* は幼芽時に2本のバンドとして発現したが、生育が進むにつれて陽極側のバンドが消失し、新しく陰極側に同じ基質特異性を示すバンドが現われた。このバンドが *Est-5* 遺伝子支配か否かは調べられていない。

3のタイプには4酵素種5遺伝子 (*Cat-1, Est-9, Pgd-1, Pox-1* および *Pox-2*) が含まれた。そのうち *Cat-1, Est-9* および *Pgd-1* は幼芽の時期に発現し、成

Table 6. Four types of stage specific expression at 14 isozyme loci in calli derived from embryos

Expression type	Callus		Isozyme gene
	Initial stage	Late stage	
I	+	+	<i>Cat-1, Est-2, Pgd-1, Pgi-1, Pgi-2</i> and <i>Sdh-1</i>
II	+	+(m)	<i>Est-5</i>
	+(m)	+(m)	<i>Acp-1, Amp-1, Amp-2, Amp-3</i>
III	+	0	<i>Est-9</i>
IV	0	0	<i>Pox-1</i>
	0	—	<i>Pox-2</i>

+: strong activity present.

+: activity present but weak.

+(m): major band modified.

0: no activity present.

—: not examined.

葉では消失した。しかし、*Cat-1* は花粉においても発現した。

Pox-1 は開花期の成葉や穎花においてのみ発現が認められた。*Pox-2* はほとんどの時期および器官において発現が認められたが、根組織では発現しなかった。

2. カルスにおけるアイソザイム遺伝子の発現様式

しおかりおよび台中65号の同質遺伝子系統(計31系統)から誘導した継代期間の異なるカルスにおいてアイソザイム遺伝子の発現の比較を行ったところ、ID-47系統の*Est-2*を例外として系統間には発現様式の差異は認められなかったが、継代期間の異なるカルスにおいては、大きく4つの発現様式のタイプがみられた(Table

6)。初期および後期カルスでみられたザイモグラムを植物体におけるザイモグラムと比較してFig. 1に示した。

Pgi-1, *Pgi-2* および *Sdh-1* は1年以上継代されたカルスでも安定して発現しており、カルス誘導した系統の有している遺伝子型を判定できた。また、植物体においてはおもに幼芽期に発現されていた *Cat-1* と *Pgd-1* もカルスでは長期間安定して発現していた。カルスが誘導された初期から *Amp-1*, *Amp-2* および *Amp-3* は、植物体における成葉でみられるような修飾を受けていた。*Acp-1* は初期カルスでは、強い活性をもつA, MおよびCバンドと弱い活性のa, mおよびcバンドが現われたが継代期間が長くなるにつれ、成葉で現われる全ての

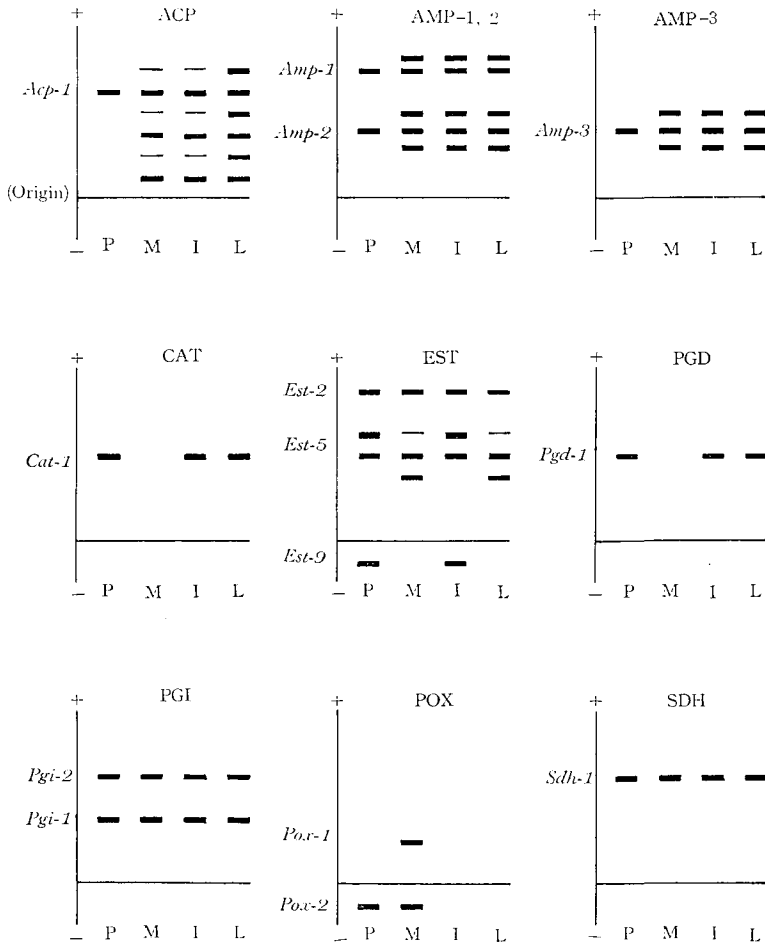


Fig. 1. Comparisons of allelic expression at 14 isozyme loci in plumule (lane; P) and mature leaf (lane; M), and in initial (lane; I) and late (lane; L) stages of calli derived from embryos. Phenotypes of the Japonica rice are shown except for *Est-2* and *Pox-2* in which expressions of the active alleles carried by the Indica or wild type are shown.

バンド (A, M, C, a, m および c) の活性が強くなり対立遺伝子の識別は困難であった。*Est-5* は初期カルスでは幼芽の時期の発現様式と同じであったが、継代期間が長くなると成葉と同様な発現様式を示した。

Est-9 は誘導初期のカルスにおいて発現していたが、継代期間が長くなると消失した。また個体では見られない α -ナフチルアセテートを基質とするバンドが、*Est-9* のバンドより陰極側に出現したが継代期間が長くなると消失した。*Pox-1* の発現はどの時期のカルスにおいてもみられなかった。

Pox-2 と *Est-2* は、一般の日本型品種において null 型であるためバンドが現われなかったが、ID-47 系統由来のカルスのみ *Est-2* のバンドが初期のカルスでも後期のカルスでも認められた。次にこの 2 遺伝子の発現をインド型品種 Ac. 001, Ac. 414 および野生稻 W 106 由来のカルスを用いて調べたところ、*Est-2* は発現していたが *Pox-2* の発現は認められなかった。これらカルスは長期にわたり継代していないため後期カルスにおける発現については調べていない。

最後に、根組織から誘導したカルスについて調べたところ、種子胚由来のカルスと同じ発現様式を示した。植物体の根組織では発現が現われない *Cat-1* も根から誘導したカルスでは発現していた。

考 察

アイソザイムは植物における遺伝的標識として各種の研究に用いられ、イネにおいても植物体のレベルでは、異なる生育時期や組織における発現様式について詳しく調べられている^{6,21,22)}。一方、アイソザイムのバンドは細胞でつくられる遺伝子の直接産物なので、カルスや細胞レベルにおける染色体や染色体断片の標識として用いることも可能である。オオムギ、タバコおよびペチュニアなどでは既に染色体の標識としてカルスの生育に伴う染色体の欠失の確認や雑種細胞の選抜に用いられている²⁰⁾。しかし、継代期間など培養条件が異なったときに発現が変化する^{12,14,15)} ことも知られており、標識として利用するためには発現様式の安定性を調べておく必要がある。イネカルスでは、アイソザイム遺伝子の発現様式についての研究は極めて少ない¹⁵⁾。本実験において継代期間の異なるカルスを比較したところ調査した 8 酵素種 14 遺伝子の中にはそれぞれ異なる発現調節をうけているものがあることが認められたが、次のように大きく 4 つに分けることができる。

1. 継代期間が異なっても発現が変化せず、カルスの

有する遺伝子型が容易に推定できるもの

2. カルス誘導後比較的初期、もしくは一定の期間を経た後にアイソザイム遺伝子の発現であるバンドが修飾を受けるもの
3. 継代期間中に発現が消失するもの
4. カルスでは全く発現しないもの

第 1 の型に属する、1 年以上発現が変化しなかった 5 酵素種 6 遺伝子、*Cat-1*, *Est-2*, *Pgd-1*, *Pgi-1*, *Pgi-2* および *Sdh-1* は細胞やカルスレベルにおける標識遺伝子として用い得ることがわかった。

アイソザイムの発現がカルス継代期間中に変化し器官特異性を消失する傾向にあることが、タバコにおいて報告されている¹⁾。またイネにおいてはエステラーゼの発現が脱分化、再分化の際に特徴的な変化をみせることが知られている¹⁵⁾。本実験においても、カルス継代に伴う *Acp-1*, *Est-5* および *Est-9* の発現様式の変化が植物体の生育に伴って生じる変化と似ていること、および根組織から誘導したカルスがその器官特異的な発現様式を消失したことが見出されたが、これらの事実はカルスの生理的側面からみると大変興味ぶかい現象である。

日本品種しおかりは *Est-2* が null 型であるにもかかわらず、*sd-1* を有する同質遺伝子系統において *Est-2* の発現を示したが、これはカルスを誘導した ID-47 系統が *Est-2* 遺伝子をホモに有しているためとわかった。これは *sd-1* 遺伝子の供給親のインド型品種が、しおかりとは極めて遠縁関係にあり、しおかりへの戻し交雑の回数が不十分で台中 N-1 (低脚烏尖型) のもつ *Est-2* が残存していた可能性が高い。しかし、系統維持中に ID-47 系統で突然変異を生じていた可能性も否定できない。

摘 要

イネ 36 系統を用いて、8 酵素種 14 アイソザイム遺伝子の発現様式を植物体とカルスの間で比較した。

植物体の生育に伴うアイソザイムの発現様式の変化は大きく 3 つに分けられる。

1. 個体の全生育時期において発現様式が変化しないもの - *Est-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* および *Sdh-1*。
2. 特定の時期に発現様式が変化してバンドが修飾されるもの - *Acp-1*, *Amp-1*, *Amp-2*, *Amp-3* および *Est-5*。
3. 特定時期および器官において発現するもの - *Cat-1*, *Est-9*, *Pgd-1*, *Pox-1* および *Pox-2*。

次に継代期間の異なる種子胚由来のカルスを用いて発現様式の変化を調べたところ次の 4 つのタイプに分

けられた。

1. *Cat-1*, *Est-2*, *Pgd-1*, *Pgi-1*, *Pgi-2* および *Sdh-1* の 6 遺伝子の発現は長期間継代しても変化せず、遺伝子型を確実に推定できた。このうち *Cat-1* と *Pgd-1* は植物体において幼芽時にのみ発現されるものであった。

2. *Acp-1*, *Amp-1*, *Amp-2*, *Amp-3* および *Est-5* がうけた修飾は、植物体の生育に伴って生じる変化様式とほぼ同じものであった。

3. *Est-9* は初期カルスでは発現するが、その後消失した。

4. *Pox-1*, *Pox-2* はカルスにおいては全く発現しなかった。

また根および種子胚から誘導したカルスにおけるアイソザイムの発現様式を比較したところ、カルス化することによって器官特異性は消失する傾向が認められた。

以上の結果より、6 遺伝子、*Cat-1*, *Est-2*, *Pgd-1*, *Pgi-1*, *Pgi-2* および *Sdh-1* が細胞培養時の標識としても十分に利用できることが明らかとなった。

謝 辞

本研究で供試した実験材料を心よく提供して戴いた琉球大学助教授、佐藤茂俊博士に御礼申し上げる。また、貴重な御意見や御批判を頂いた北海道大学農学部作物育種学講座の教員並びに大学院生の方々に深謝する。

引用文献

1. BASSIRI, A. and P. S. CARLSON: Isozyme patterns in tobacco plants and their derived calli. *Crop Sci.* **19**: 909-914. 1979
2. CARDY, B. J., C. W. STUBER and M. M. GOODMAN: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). pp. 31. Institutes of Statistics, mimeo. series no. 1317. North Carolina State University, Raleigh, NC. 1980
3. CARLSON, P. S., H. H. SMITH and R. D. DEARING: Parasexual interspecific plants hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**: 2292-2294. 1972
4. CHU, Y. E.: Variations in peroxidase of *O. perennis* and *O. sativa*. *Jap. J. Genet.* **42**: 233-244. 1967
5. CHU, Y. E. and H. I. OKA: Comparison of variations in peroxidase isozyme between *perennis-sativa* and *breviligulata-glaberrima*

- series of *Oryza*. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* **8**: 261-270. 1967
6. ENDO, T.: Developmental modification and hybridization of allelic acid phosphatase isozymes in homo- and heterozygotes for the *Acp-1* locus in rice. *Biochem. Genet.* **19**: 373-384. 1981
7. GLASZMANN, J. C.: A varietal classification of Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) based on isozyme polymorphism. "Rice Genetics", Proceeding of the International Rice Genetics Symposium: 83-90. 1986
8. HUNTER, R. L. and C. L. MARKERT: Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis in starch gels. *Sci.* **125**: 1294-1295. 1957
9. ISHIKAWA, R., T. KINOSHITA and H. MORISHIMA: A primary trisomic analysis of genes for isozymes. *RGN*, **3**: 53-54. 1986
10. KUNG, S. D., J. C. GRAY, S. D. WILDMAN and P. S. CARLSON: Polypeptide composition of fraction 1 protein from parasexual hybrid plants in the genus *Nicotiana*. *Sci.* **187**: 353-355. 1975
11. MARKERT, C. L. and F. MOLLER: Multiple forms of enzymes: Tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45**: 753-763. 1959
12. MCCOWN, B. H., D. D. MACCOWN, G. E. BECK and T. C. HALL: Isoenzyme complements of *Dianthus* callus cultures: Influence of light and temperature. *Am. J. Bot.* **57**: 148-150. 1970
13. 中川原 捷洋・林 健一: イネ・エヌテラーゼ同位酵素遺伝子の座位決定, 育種, **26**, 別冊, **1**: 114-115. 1976
14. OONO, H. and M. NAKANO: The regulation of expression of cellular phenotypes in cultured tissue of tobacco. *Jap. J. Genet.* **53**: 241-250. 1978
15. 大野清春: 第3章 植物培養細胞における体細胞突然変異, "植物培養細胞の変異と選抜" (編集 山田康之), 講談社: 111-123. 1985
16. ORTON, T. J.: Spontaneous electrophoretic and chromosomal variability in callus cultures and regenerated plants of celery. *Theo. Appl. Genet.* **67**: 17-24. 1983
17. PAI, C., T. ENDO and H. I. OKA: Genetic analysis for peroxidase isozymes and their organ specificity in *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Can. J. Genet. and Cytol.* **15**: 845-853. 1973

18. RANJHAN, S., J. C. GLAZMANN and G. S. KHUSH: Localization of *Pgi-1*, *Sdh-1*, *Est-9* and *Adh-1* on rice chromosomes by trisomic analysis. *RGN*, 3: 56-57. 1986
19. SANO, R. and P. BARBIER: Analysis of five isozyme genes and chromosomal location of *Amp-1*. *RGN*, 2: 60-62. 1985
20. SCHIAVO, F. LO., G. GIULIANO and M. TERZI: Identifying natural and parasexual hybrids., "Isozyme In Plant Genetics And Breeding (part A).", S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.), Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam: 305-312. 1983
21. SECOND, G.: Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap. J. Genet.* 57: 25-57. 1982
22. SECOND, G. and P. TROUSLOT: Electrophoresis d'enzymes de riz (*Oryza* sp.). pp. 88 *Travaux et Documents de l'O. R. S. T. O. M.*, 120.
23. SHAHI, B. B., H. MORISHIMA and H. I. OKA: A survey of variations in peroxydase, acid phosphatase and esterase isozymes of wild and cultivated *O. species*. *Jap. J. Genet.* 57: 25-75. 1969
24. SHAHI, B. B., Y. F. CHU and H. I. OKA: Analysis of genes controlling *O. perennis*. *Jap. J. Genet.* 44: 321-328. 1969

Summary

Isozymes seem to be useful genetic markers in *in vitro* selection. In rice, however, isozymes have not been used as such genetic markers because of little knowledge about their expression at cell or callus level. For utilizing the isozymes as the

diagnostic markers, the pattern of their expression in a cell or callus should be verified as compared with that in the original plants. In the present study, allele expression of 14 isozyme loci were studied in calli derived from 36 rice strains and compared with that in the original plants.

In the original plants, four out of 14 isozyme loci, *Est-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* and *Sdh-1* showed quite stable expressions but the others showed stage or organ-specific expressions. To study a fluctuation pattern of isozyme expression during subculture, embryo derived calli cultured for two or three months (initial stage) and those cultured for more than one year (late stage) were compared in each strain. Expressions of six loci, *Cat-1*, *Est-2*, *Pgd-1*, *Pgi-1*, *Pgi-2* and *Sdh-1* were stable both in initial and late stage calli. These six loci can be safely used as markers of specific chromosome or chromosome segment at callus level.

On the other hand, phenotypes of *Acp-1* and *Est-5* were altered during a long subculture. Bands of *Amp-1*, *Amp-2* and *Amp-3* were modified from the initial stage and showed multiple bands, so that identification of allele differences was quite difficult. *Est-9* appeared only in initial stage but not in late stage. *Pox-1* and *Pox-2* were not expressed in either initial or late stage. Thus, these 14 isozyme loci were differently regulated each other.

It was further found that callus from young root showed similar pattern of isozyme expressions with that derived from embryos. *Cat-1* was expressed in plumule but not in root tissue. But root-derived calli showed *Cat-1* band. It was suggested that calli should tend to lose tissue specificity of their isozyme expression during subculture.