

## オオムギの近縁野生種と栽培種における 未熟胚由来カルスからの再分化能の比較

力石和英・武田和義・安田昭三\*

Comparison between Shoot Regeneration Ability in Calli  
Derived from Immature Embryos of Wild and Cultivated Barley

Kazuhide RIKIISHI, Kazuyoshi TAKEDA and Shozo YASUDA

The variation in shoot regeneration ability of calli derived from immature embryos was examined in 95 wild strains, 82 of which were of *Hordeum spontaneum* and 13 of which were *H. agriocrithon*, and 87 cultivated varieties collected from various countries or regions of the world.

In 85 strains of the wild species, a number of calli regenerated shoots, and their proportion ranged from 1.2% to 75.7%. The average percentage of shoot regenerating calli was 21.7% among the strains that formed calli, 11.5% of which regenerated green and 10.2% albino shoots. On average, 21.4% and 23.9% calli regenerated shoots in *H. spontaneum* and *H. agriocrithon*, respectively, and there was no significant difference between these values. A significant difference in the percentage of shoot regenerating calli was found among six variants (*dawense*, *ishnatherum*, *laguncliforme*, *paradoxon*, *proskowetzii*, *spontaneum*) which were comprised in *H. spontaneum*.

In 73 varieties of cultivated species, there were shoots regenerating calli likely to wild species, and their proportion ranged from 3.2% to 85.5%. The average percentage of shoot regenerating calli was 25.4%, 22.0% of which regenerated green and 3.4% of which regenerated albino shoots. There was a significant difference in percentage of green shoots regenerating calli against shoots regenerating ones between the wild (53.0%) and cultivated species (86.6%).

The two kinds of non-brittle rachis genotypes, *Bt bt<sub>2</sub>* and *bt Bt<sub>2</sub>* are one of the key characters distinguishing the oriental and occidental types of cultivated barley. The average percentages of shoot regenerating calli were 16.2% and 32.3% for the genotypes *Bt bt<sub>2</sub>* and *bt Bt<sub>2</sub>*, respectively, suggesting that there is a geographical variation in the shoot regeneration ability of calli in the cultivated species. By contrast, the oriental and occidental strains of wild species showed no difference in the shoot regeneration ability of calli.

The geographical variation of shoot regeneration ability differed significantly between wild and cultivated species. This suggests that the geographical variation of shoot regeneration ability occurred after the cultivation of the barley was established.

**Key words :** *Hordeum spontaneum*, *Hordeum agriocrithon*, Tissue culture, Geographical variation, Shoot regeneration ability

## 緒 言

オオムギ属 (*Hordeum*) には栽培種の *H. vulgare* の他に野生種の *H. bulbosum*, *H. murinum* など約30種が含まれている (Bothmer 1992). そのうち *H. spontaneum* は栽培種との交雑が容易で、稔実のよい子孫を残すことから栽培種の祖先種であると一般に考えられている (Harlan and Zohary 1966). *H. spontaneum* には穂の形態的差異によって分類されるいくつかの変種が含まれている。また、*H. agriocrithon* は *H. vulgare* と *H. spontaneum* の自然交雑によって生じたと考えられている (Briggs 1978).

最近、オオムギの栽培品種において組織培養からの再分化能に品種間変異が存在することが明らかになってきた (Lazar *et al.* 1984, Koornneef *et al.* 1987, Petolino and Thompson 1987, 力石・安田1994). また、力石ら (1994) はオオムギ在来品種の完熟胚由来カルスからの不定根再分化能には地理的分化が存在し、西域には東亜の品種に比べて不定根再分化能の高い品種が存在することを報告している。

本研究ではオオムギ栽培種の祖先種と深い関わりを持つと考えられる近縁野生種 *H. spontaneum* および *H. agriocrithon* の未熟胚由来カルスからの不定芽の再分化率を調査し、栽培種における品種間変異ならびに地理的分化と比較した。

## 材料および方法

岡山大学資源生物科学研究所大麦系統保存施設で保存している近縁野生種 *H. spontaneum*82系統と *H. agriocrithon*13系統、計2種95系統と世界各地域の栽培種87品種を供試した。*H. spontaneum* は西南アジアを中心に中国チベットの高地から、アフリカ西端のモロッコまでの広い範囲にわたって分布しており、*H. agriocrithon* は主にチベットに分布している (Table 1). なお、*H. spontaneum* には6変種 (*dawense*, *ischnatherum*, *lagunclifome*,

*paradoxon*, *proskowetzii*, *spontaneum*) が含まれる。栽培種は日本, 朝鮮半島, 中国, ネパール, 西南アジア, トルコ, ヨーロッパ, 北アフリカおよびエチオピアから収集された87品種である。

これら供試品種の未熟胚から Lührs and Lörz (1987) の方法に従ってカルス誘導および再分化を行った。すなわち, 開花10~14日後の未熟穎果を採取し, 70%エタノールで1分間, 有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間殺菌した後, 滅菌水で3回洗浄し, 穎果から未熟胚を取り出して1シャーレ当たり10個ずつ, 3シャーレに置床した。この時期における胚の長さは0.8~2.0 mm 程度であった。4週間後にカルスを分割して再分化培地に

Table 1. Strains of *Hordeum spontaneum* and *H. agriocrithon* used in study

Species	Region	No. of strains	Species	Region	No. of strains
<i>H. spontaneum</i>	Tibet	6	<i>H. agriocrithon</i>	Tibet	10
	Nepal	1		Israel	2
	Afghanistan	10		Czechoslovakia	1
	Iran	6			
	Iraq	22			
	Cyprus	2			
	Turkey	5			
	Russia	25			
	Libya	2			
	Morocco	3			
	Total	82		Total	13

置床した。カルス誘導培地には2.4-D 2 mg/l, マルトース30 g/l, ゲルライト 2 g/l を含む修正 MS 培地 (Jähne *et al.* 1991) を用いた。再分化培地には, カルス誘導培地のホルモンを IAA 2 mg/l, Zeatin 0.05 mg/l に変更したものを使用した。培養条件はいずれも25℃, 16時間日長とした。

再分化培地に分割, 移植する前に, カルスの生長量を直径によって5段階(1:カルス形成なし, 2:2.5 mm 以下, 3:2.5~5.0 mm, 4:5.0~10 mm, 5:10 mm 以上)に分けて調査した。不定芽が再分化したかどうかは再分化培地移植後4週間目に調査した。置床カルスに対する不定芽を再分化したカルスの割合を不定芽再分化率, 緑色不定芽を再分化したカルス(緑色およびアルビノ不定芽の両者を再分化したカルスも含む)の割合を緑色不定芽再分化率, アルビノ不定芽のみを再分化したカルスの割合をアルビノ不定芽再分化率とした。

## 結果および考察

### 1. カルス形成能および再分化能

本研究に供試した近縁野生種の中に, カルスを全く形成しない系統が1系統 (OUH745, *proskowetzii*) あった。カルス生長量を *H. spontaneum* と *H. agriocrithon* に分けてみると, それぞれのスコアの平均値は3.1と3.6 (全体では3.2) であった。 *H. spontaneum* の6変種

の間にはカルス生長量に変異があり、最もカルス生長量の大きかった *dawense* (3.6) に比べて *ischnatherum* (2.8) と *proskowetzii* (2.8) のカルス生長量は明らかに少なかった (Table 2)。一方、栽培種は全てカルスを形成し、カルス生長量を示すスコアの平均値は3.5で野生種との間に大きな差は認められなかった。

Table 2. Callus growth index in *Hordeum spontaneum*, *H. agriocrithon* and cultivated species

Species (Variant)	No. of strains	Callus growth index
<i>H. spontaneum</i>	82	3.1
<i>dawense</i> <i>ischnatherum</i> <i>laguncliforme</i> <i>paradoxon</i> <i>proskowetzii</i> <i>spontaneum</i>	4	3.6
	10	2.8
	3	3.2
	4	3.4
	13	2.8
	48	3.2
<i>H. agriocrithon</i>	13	3.6
	( Total 95	Mean 3.2 )
Cultivar	87	3.5

近縁野生種では、カルスを形成した94系統中85系統 (90.4%) が不定芽を再分化し、不定芽再分化率は系統によって1.2%から75.7%まで幅広く変異した。カルスを形成した94系統における不定芽再分化率の平均値は21.7%で、そのうち緑色不定芽再分化率は11.5%、アルビノ不定芽再分化率は10.2%であった (Table 3)。不定芽再分化率は *H. spontaneum* の OUH650が75.7%で最も高かった。緑色不定芽再分化率は *H. agriocrithon* の OUH789が50.7%で最も高く、アルビノ不定芽再分化率は *H. spontaneum* の OUH650が65.1%で最も高かった。

Table 3. Percentages of shoot regeneration in *Hordeum spontaneum*, *H. agriocrithon* and cultivated species

Species (Variant)	No. of strains	Shoot regeneration (%)		
		Green	Albino	Total
<i>H. spontaneum</i>	81	11.1	10.3	21.4
<i>dawense</i> <i>ischnatherum</i> <i>laguncliforme</i> <i>paradoxon</i> <i>proskowetzii</i> <i>spontaneum</i>	4	5.1	7.4	12.5
	10	8.4	14.7	23.1
	3	10.5	13.1	23.6
	4	5.5	2.7	8.2
	12	24.5	18.5	42.9
	48	9.3	8.0	17.3
<i>H. agriocrithon</i>	13	14.4	9.5	23.9
	(Total 94	Mean 11.5	10.2	21.7)
Cultivar	87	22.0	3.4	25.4

*H. spontaneum* と *H. agriocrithon* の不定芽再分化率はそれぞれ平均21.4%と23.9%となり有意な差が認められなかった。しかし、*H. spontaneum* に含まれる6変種の間には、緑色およびアルビノ不定芽再分化率に変異が認められた。不定芽再分化率が最も低い *paradoxon* の平均8.2%に比べて最も高い *proskowetti* では約5倍の平均42.9%であった (Table 3)。このことは、これら6変種の間で不定芽再分化能に関する遺伝子構成が異なっている可能性を示唆している。

栽培種では、供試品種中73品種 (83.7%) から得られたカルスで不定芽が再分化し、不定芽再分化率は品種によって3.2%から85.5%まで幅広く変異した。供試栽培種の間で不定芽再分化率の平均値は25.4%で野生種の21.7%よりもやや高く、緑色不定芽再分化率は22.0%、アルビノ不定芽再分化率は3.4%であった。不定芽再分化率に対する緑色不定芽再分化率の占める割合は栽培種で86.6%、近縁野生種系統では53.0%となり、後者で明らかに低かった (Table 3)。

近縁野生種系統は、カルス形成能および再分化能について栽培種と同様の幅広い変異を示した。しかし、緑色不定芽再分化率の割合が低い点では栽培種とは異なっていた。このことは、近縁野生種系統が再分化時の葉緑体形成に関して栽培種とは異なった特性を有することを示している。

## 2. 再分化能の地理的分化

オオムギの小穂非脱落性は第3染色体に座乗する補足遺伝子  $Bt$  と  $Bt_2$  に支配され、 $Bt Bt_2$  では脱落性、 $Bt bt_2$ 、 $bt Bt_2$  および  $bt bt_2$  では非脱落性となることが明らかにされており、いわゆる東亜地域には  $Bt bt_2$  が、西域には  $bt Bt_2$  が主として分布することが知られている (Takahashi *et al.* 1983)。本研究で供試した栽培種には  $Bt bt_2$  型が37品種、 $bt Bt_2$  型が50品種含まれている。不定芽再分化率を小穂非脱落性の遺伝子型別にみると、 $Bt bt_2$  型の品種は平均16.2%で、 $bt Bt_2$  型の品種は平均32.3%となり、 $bt Bt_2$  型の品種が有意に高い値を示した (Table 4)。著者らはオオムギ地方品種の完熟胚由来カルスからの不定根再分化能にも地理的分化が存在し、 $bt Bt_2$  型において不定根再分化能が高いことを認めている (力石ら 1994)。本研究の結果は、未熟胚由来カルスからの不定芽再分化率においても完熟胚由来カルスからの不定根再分化の場合と同様に、再分化能が小穂非脱落性の遺伝子型間で異なり、地理的分化を有していることを示唆する。なお、言うまでもなく、野生種はいずれも小穂脱落性なので非脱落性の遺伝子型と再分化能との関係を調べることはできない。

Table 4. Percentages of shoot regeneration in cultivars with non-brittle rachis genotypes

Genotype	No. of strains	Shoot regeneration (%)		
		Green	Albino	Total
$Bt bt_2$	37	13.8	2.4	16.2
$bt Bt_2$	50	28.1	4.2	32.3
t-value		2.76**	1.70	3.15**

\*\* : Significant at 1% level

Konishi (1988) は栽培オオムギおよび近縁野生種のエステラーゼ同位酵素について調査し、3 遺伝子座 (*Est-1*, *Est-2*, *Est-4*) における複対立遺伝子の組合せで11のグループ (A ~ J およびその他) に分類し、A ~ E 型は東亜地域に多く分布し、F ~ J 型は西域に多く分布することを明らかにした。また、栽培種における小穂非脱落性型とエステラーゼ同位酵素型との関係を調査した結果、A ~ E 型には *Bt bt<sub>2</sub>* 型が多く含まれ、F ~ J 型には *bt Bt<sub>2</sub>* 遺伝子型が多く含まれることを報告している。このことは、エステラーゼ同位酵素型の分布が小穂非脱落性遺伝子型の地理的分布と同じ傾向を有することを示唆する。

本研究で供試した栽培種をエステラーゼ同位酵素型によって A ~ E 型の品種群と F ~ J 型の品種群に分けて不定芽再分化率を比較した場合にも (Table 5), A ~ E 型の品種群の平均値は18.1%で、F ~ J 型の品種群の平均値は28.9%となり、F ~ J 型の品種の方が有意に高い値を示した。供試した野生種系統をエステラーゼ同位酵素型で分類すると、ネパール以東から収集された系統には A ~ E 型が多く、アフガニスタン以西から収集された系統には F ~ J 型が多くみられ、栽培種と同じ傾向があった。しかし、これら A ~ E 型および F ~ J 型の系統群の間で再分化率を比較した場合には、それぞれの平均値は25.5%と21.4%となり、両者に有意な差が認められなかった。このように、供試した近縁野生種のエステラーゼ同位酵素型の分布は、東亜および西域に分布する栽培種と同じ傾向を有するにも関わらず、栽培種にみられるような不定芽再分化率の違いは認められなかった。

Table 5. Percentages of shoot regeneration in wild and cultivated species with esterase isozyme genotypes

Regenerated shoot	Wild species			Cultivated species		
	Regeneration percentage (%)		t-value	Regeneration percentage (%)		t-value
	A~E (19)	F~J (40)		A~E (25)	F~J (47)	
Green	12.6	12.6	0.43	15.5	25.1	2.14 *
Albino	12.9	8.8	1.13	2.6	3.8	1.69
Total	25.5	21.4	0.33	18.1	28.9	2.42 *

A~E and F~J indicate A, B, C, D and E type and F, G, H, I and J type of esterase isozyme genotype, respectively.

Numerals in parentheses indicate the number of tested strains and varieties.

\* : Significant at 5% level

Komatsuda *et al.* (1991) は再分化能を高める要因と第2染色体上にある条性を支配する *V-v* 遺伝子座が連鎖していることを報告している。一方、本研究では第3染色体に座乗している小穂脱落性遺伝子 (*Bt, Bt<sub>2</sub>*) によって支配される小穂非脱落性の各遺伝子型間で、再分化能が明らかに異なることを示した。このことは、*Bt<sub>2</sub>* 遺伝子座と連鎖する再分化能を高める遺伝子が存在する可能性を示唆する。近縁野生種と栽培種における再分化能の地理的分化が異なる原因に関しては、両者の再分化能が異なる遺伝子によって支配されていることによるのか、もしくは近縁野生種が小穂脱落性を失って栽培化され *Bt bt<sub>2</sub>* 型と *bt Bt<sub>2</sub>* 型の分化が生じた後に、再分化能を支配する遺伝子に突然変異が起きた可能性が考えられる。

## 摘 要

本研究ではオオムギ近縁野生種 *Hordeum spontaneum* 82系統と *H. agriocrithon* 13系統、計2種95系統および世界各地の栽培種87品種を供試して、未熟胚由来カルスからの不定芽再分化能を調査し、近縁野生種と栽培種における再分化能の品種変異およびその地理的分化を比較した。

近縁野生種では95系統中94系統がカルスを形成し、そのうち85系統(90.4%)が不定芽を再分化して、不定芽再分化率は系統によって1.2%から75.7%まで幅広く変異した。カルスを形成した94系統における不定芽再分化率の平均値は21.7%、緑色不定芽再分化率は11.5%、アルビノ不定芽再分化率は10.2%であった。*H. spontaneum* と *H. agriocrithon* の不定芽再分化率の平均値はそれぞれ21.4%と23.9%で、有意差は認められなかった。しかし、*H. spontaneum* に含まれる6変種(*dawense*, *ishnatherum*, *laguncliforme*, *paradoxon*, *proskowetzii*, *spontaneum*)の間では不定芽再分化率に差異が認められた。

栽培種では供試品種のすべてがカルスを形成し、そのうち73品種(83.7%)が不定芽を再分化して、不定芽再分化率は品種によって3.2%から85.5%まで幅広く変異した。供試品種全体の不定芽再分化率の平均値は25.4%、緑色不定芽再分化率は22.0%、アルビノ不定芽再分化率は3.4%であった。このように、不定芽再分化率に対する緑色不定芽再分化率の占める割合は栽培種で86.6%、近縁野生種で53.0%となり、両者に大きな差が認められた。

供試した栽培種を小穂非脱落性に関する遺伝子型によって東亜地域に多く分布する *Bt bt<sub>2</sub>*型と西域に多く分布する *bt Bt<sub>2</sub>*型に分けて不定芽再分化率を比較すると、*Bt bt<sub>2</sub>*型の平均値は16.2%、*bt Bt<sub>2</sub>*型の平均値は32.3%となり、*bt Bt<sub>2</sub>*型の不定芽再分化率が有意に高く、地理的分化が認められた。しかし、近縁野生種では不定芽再分化能の地域間差がみられないので、オオムギの祖先種が栽培化されてから不定芽再分化能の地理的分化が生じたものと考えられる。

キーワード：*Hordeum spontaneum*, *Hordeum agriocrithon*, 組織培養, 地理的変異, 再分化能

## 引 用 文 献

- Bothmer, R. von. 1992. The wild species of *Hordeum*: Relationships and potential use for improvement of cultivated barley. In "Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology" (Shewry, P. R., ed.), 3-18. Wallingford, C·A·B International.
- Briggs, D.E. 1978. The origin and classification of barleys. In "Barley", 76-88. Chapman & Hall, London.
- Harlan, J.R. and Zohary, D. 1966. Distribution of wild wheats and barley. *Science*. 153: 1074-1080.
- Jähne, A., Lazzeri, P.A., Jäger-Gussen, M. and Lörz, H. 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82: 74-80.
- Komatsuda, T., Lee, W., Sano, H., Annaka, T., Enomoto, S., Kang, M. and Oka, S. 1991. A genetical

- factor enhancing plant regeneration linked with the *V·v* locus in *Hordeum vulgare* L. Japan. J. Breed. 41: 661-664.
- Konishi, T. 1988. Genetic differentiation and geographical distribution of barley. Crop Genetic Resources of East Asia: 237-243.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. and Martinelli, L. 1987. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. Theor. Appl. Genet. 74: 633-641.
- Lazar, M.D., Baenzinger, P.S. and Schaeffer, G.W. 1984. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. Theor. Appl. Genet. 82: 131-134.
- Lührs, R. and Lörz, H. 1987. Plant regeneration in vitro from embryogenesis cultures of spring- and winter type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theor. Appl. Genet. 75: 16-25.
- Petolino, J.F. and Thompson, S.A. 1987. Genetic analysis of anther culture response in maize. Theor. Appl. Genet. 74: 284-286.
- 力石和英・武田和義・安田昭三. 1994. オオムギ在来品種における完熟胚由来カルスからの不定根発生率の品種変異と地理的分化 (投稿中).
- 力石和英・安田昭三. 1994. オオムギ完熟胚および未熟胚由来カルスの再分化能の比較. 岡大資生研報 2: 33-42.
- Takahashi, R., Yasuda, S., Hayashi, J., Fukuyama, T., Moriya, I. and Konishi, T. 1983. Catalogue of Barley Germplasm Preserved in Okayama University, 1-217. Inst. Agr. Biol. Sci., Okayama Univ.