

氏 名(本籍) 力<sup>りき</sup> 石<sup>いし</sup> 和<sup>かず</sup> 英<sup>ひで</sup>

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 5 4 7 号

学位授与年月日 平 成 8 年 3 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 オオムギの組織培養と遺伝子導入に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 日 向 康 吉

教 授 菅 洋

教 授 亀 谷 壽 昭

# 論文内容要旨

## 緒論

近年多くの作物において遺伝子導入による育種が試みられ、新しい育種法として注目されているが、オオムギにおいては培養細胞からの植物体再分化やプロトプラスト培養が難しく、遺伝子導入による育種技術の開発も進んではいない。

このような状況を考慮して本研究では、オオムギの組織培養の品種比較研究を展開して再分化能の高い品種を見だし（第1章）、この品種の高い再分化能の遺伝性について検討するとともに（第2章）、再分化能に影響を及ぼす各種要因の検討を行った（第3章）。そして、これらの検討を基礎にして、オオムギにおいても、パーティクルガン法によって遺伝子導入が可能であることを実証したものである（第4章）。

### 第1章 再分化能の品種変異

本実験では、世界各地から収集した品種や近縁野生種の再分化能等の評価を行った。はじめに、世界各地の269在来品種を供試して完熟胚培養でのカルス形成能および再分化能の品種変異を調査したところ、カルス形成能には幅広い品種変異が認められたが、不定芽は再分化せず、不定根のみが形成された。不定根発生率と各種遺伝形質との関係を検討した結果、栽培オオムギの地理的分化と密接な関わりを持つ小穂非脱落性遺伝子型 ( $Bt\ bt_2$ 型と  $bt\ Bt_2$ 型) との間では有意な相関が認められ、 $bt\ Bt_2$ 型の方が高い値を示した (Table 1)。しかし、条性、皮・裸性およびエステラーゼ同位酵素遺伝子型とは無関係であることがわかった。

次いで、未熟胚を用いて培養を行ったところ、供試87品種には不定芽再分化率について幅広い変異が認められた。不定芽再分化率と小穂非脱落性遺伝子型との関係をみると、完熟胚培養における不定根発生率の場合と同様に  $bt\ Bt_2$ 型が  $Bt\ bt_2$ 型に比べて有意に高かった (Table 2)。これらのことにより、カルスからの器官再生が小穂非脱落性遺伝子型と関係することを示した。

近縁野生種 (*Hordeum spontaneum* および *H. agriocrithon*) 95系統について未熟胚培養を行い、カルス生長量および不定芽再分化率を栽培種 (*H. vulgare*) の調査結果と比較した。*H. spontaneum* と *H. agriocrithon* の間では、カルス生長量および不定芽再分化率に差は認められなかった (Table 3)。また、近縁野生種

と栽培種の間でカルス生長量および不定芽再分化率を比較すると、両形質ともに栽培種の方が高い値を示すものの、有意差は認められなかった。しかし、アルビノ再分化率は明らかに近縁野生種が高かった。このことは、近縁野生種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唆する。

以上の実験から、オオムギでは未熟胚培養を行うことによって再分化する培養系を作ることができることを示した。そして、不定芽再分化率が特異的に高い品種Leninsを見いだした。

## 第2章 未熟胚由来カルスからの再分化能に関する遺伝解析

第1章で見いだした不定芽再分化率の高い品種Leninsを用いて、その特性がどのように遺伝するかを検討した。Leninsは継代培養により旺盛なカルス増殖を示し、また1個の未熟胚から多数の不定芽を再分化する能力を有していた (Table 4)。そこで、この品種を共通親として培養特性の異なる5品種にトップ交雑を行い、 $F_1$ 、 $F_2$ および $BC_1$ における未熟胚培養でのカルス増殖能および再分化能の遺伝性について解析を行った。調査対象形質として、カルス増殖能、再分化率および不定芽再分化指数を用いた。なお、 $F_1$ および $BC_1$ の分析では継代培養を行い、 $F_2$ 分析は培養当代について調査を行った。

カルス増殖能と再分化率についてみると、 $F_1$ の平均値は高い親Leninsに近い値を示した (Table 5,6)。一方、 $F_2$ 集団の分析ではカルス増殖能については連続変異を示すことから、複数の遺伝子の関与が示唆された (Fig. 1)。また、再分化率についても調査したすべての組合わせの $F_2$ 集団が連続変異を示し、複数の遺伝子が関係していると思われた (Fig. 2)。不定芽再分化指数に関してみると、6721との組合せの $F_2$ 集団は不連続な分布を示し、指数5.6と9.2のところで区切った場合、それぞれの区分に含まれる個体数は1:2:1の分離比に適合した (Fig. 3)。6721 x Leninsの $F_1$ に6721を戻し交雑した場合には、 $BC_1$ 個体の頻度分布は2項的な分布を示し、1:1の分離比に適合した。これらのことから、この組合せでは不定芽再分化指数に1個の主働遺伝子が関係していると考えられた。その他の組合せの $F_2$ 集団はすべて連続変異を示した。不定芽再分化指数の場合、6721以外の品種との組合せの $F_1$ および $F_2$ 集団の平均値が中間親よりも低くなったことから、6721以外の品種には抑制要因の存在が考えられた (Table 7)。

以上の結果から、カルス増殖能、再分化率および不定芽再分化指数には複数の遺伝子が関係していることが考えられた。しかし、これらの形質は比較的遺伝率が高く、高再分化品種Leninsの特性を他の栽培品種に付与することができるものと推論した。

### 第3章 再分化能に影響を及ぼす各種要因の解析

ここでは、それぞれの遺伝子型において再分化能に影響を及ぼす各種要因の検討を行った。

まず、胚の発育段階を受粉後日数によって4段階（受精後約2週間の胚を基準としてステージIとし、以降一週間毎にII、IIIおよびIVとした）に分け、胚の発育段階がカルス形成能および再分化能に及ぼす影響を調査した。その結果、すべての品種において誘導されるカルスの形態がステージIIIで変化した。また、供試19品種中17品種の再分化率もステージIIIで大きく低下した（Table 8）。このことから、ステージII（受精後3週間）とステージIII（受精後4週間）の間の時期に起こる遺伝子発現の変化が、カルスの形態および再分化率に大きな影響を及ぼすと考えられた。

次に、DNAメチル化阻害剤である5-azacytidine (5-azaC) で未熟胚を処理し、カルス形成能および再分化能に及ぼす影響を調査した。ステージIでは長時間処理により関東二条5号とK-3でカルス形成率が低下したが、その他の品種ではカルス形成に対する影響は認められなかった。無処理区での再分化率をみると、供試した7品種は再分化率の低いグループ（アサマムギ, Wecah, Igri）、中程度のグループ（関東二条5号, K-3, Golden Promis）および高い品種（Lenins）の3つに分けられた。再分化に対する5-azaC処理の影響をみると、Leninsは処理により再分化率が低下したが、低および中程度の品種では再分化率が上昇した（Table 9）。

ステージIIの胚を用いたときには、カルス形成率に関する影響は認められなかった。再分化率では、LeninsおよびIgriを除いた他の品種でそれらの値を高める効果が認められた（Table 10）。処理時間による違いはあるが、5-azaC処理はステージIの胚と同様にステージIIの胚に対しても、再分化率が中程度以下の品種に関しては再分化率を高める効果があると思われた。ステージIIIの胚については、

処理の効果が認められなかった。以上の結果から、DNAの脱メチル化が再分化能に影響する可能性を示唆した。

カルス誘導および再分化に関する光条件の影響を調査した。対照区は全ての培養期間を16時間日長で行った。処理区としてカルス誘導時のみを暗黒条件にしたDL区とカルス誘導および再分化を暗黒条件で行い、その後、光馴化させたDDL区を設けた。その結果、関東二条5号とK-3ではDLおよびDDL処理区の方が対照区に比べて高い再分化率を示した。それに対して、アサマムギ、Wecah, Golden PromisおよびLeninsでは暗条件でカルス誘導もしくは再分化を行うことにより再分化率が低下した (Table 11)。これらのことから、光条件は再分化率に大きな影響を及ぼすが、その効果は品種により異なることが明らかとなった。

以上、本実験では胚の発育段階が再分化率に強く影響すること、および5-azaC処理や光条件の与え方等によっても再分化率が左右されることを示した。

#### 第4章 パーティクルガン法による遺伝子導入系の確立

未熟胚および未熟胚の切断片を標的組織として、パーティクルガン法による遺伝子導入を行うとともに、導入効率に関わる各種条件の検討を行った。なお、導入遺伝子として除草剤ピアラフォス耐性遺伝子 (*bar*) と $\beta$ -Glucuronidase遺伝子 (*GUS*) を、イネのアクチン遺伝子あるいはトウモロコシのユビキチン遺伝子のプロモーターに接続し、異なるプラスミドに組み込んだものを使用した (Fig. 4)。導入実験は、同種のプロモーターに接続した *bar* 遺伝子と *GUS* 遺伝子を含む2種のプラスミドを1:1の比率で混合して、co-transformationを行った。

導入条件の検討は *GUS* 遺伝子のトランジェント発現を調査することにより行った。パーティクルガン照射前の培養期間と *GUS* 遺伝子の発現との関係を見ると、標的組織のサイズによっても異なるが *GUS* 遺伝子の発現は前培養期間が2~4日間の時に最も高かった (Fig. 5)。照射時の標的組織の置床方法は中心部に配置 (S法) するより、中心を避けてドーナツ状に配置 (C法) した方が、またプロモーターはイネのアクチン遺伝子のプロモーターの方がトウモロコシユビキチン遺伝子のプロモーターよりトランジェント発現は高かった (Table 12,13)。これら条件を検討しつつ遺伝子導入を行った結果、108個体のピアラフォス耐性植物を得ることができた (Table 14)。導入効率は全実験区の平均で10.4%であっ

た。そして、得られた植物のなかから任意に15個体を選んでサザンハイブリダイゼーションを行い、これらが確かにトランスジェニック植物であることを確かめた。なお、最終的に得られた耐性植物体の獲得効率に関しては、前培養は5日、未熟胚のサイズは0.5~0.8mm、プロモーターはイネのアクチン遺伝子の場合が高かった (Table 15)。以上、本研究で見いだした高再分化品種Leninsではパーティクルガン法による遺伝子導入が可能であることを実証した。このことは、高い不定芽再分化率を持つ品種には遺伝子導入育種が可能であることを示している。

### 総合考察

本研究では世界各地から集めた多数の品種を供試して、組織培養の際の再分化率の調査を行い、高い再分化率を示すLeninsを見いだした。Leninsの高い再分化率の遺伝性を検討したところ、この性質は比較的遺伝率が高く、現在栽培されているピールムギなどの実用品種に交雑等を通じて付与できるものと考えられた。一方、再分化率は未熟胚の発育段階、5-azacytidine処理および培養時の光条件によって影響を受けることを示した。以上の実験を基礎にして、再分化率の高い材料を用い、培養条件に十分な考慮を払えば、パーティクルガン法によりオオムギに高い効率で遺伝子導入ができることを示した。今後オオムギの育種においては、従来の交雑育種法や突然変異育種法などに加えて、本遺伝子導入法も利用しながら、さらに効率のよい育種を行うことが期待できる。

Table 1. Root differentiation percentages in non-brittle rachis genotypes

Region or country	Root differentiation (%) Mean±S.D.		
	<i>Bt bt<sub>2</sub></i>	<i>bt Bt<sub>2</sub></i>	Unknown
Japan	2.6±6.9 (14)	- (0)	3.2±10.2(16)
Korea	0.5±2.2 (15)	0.0 (1)	2.6±5.3 (14)
China	3.8±6.6 (17)	0.0 (2)	- (0)
Nepal	0.0 (12)	1.9±3.8 (9)	- (0)
S.W.Asia	10.6±21.2(16)	14.7±19.9(19)	- (0)
Turkey	0.0 (1)	4.6±15.1(11)	6.6±11.3 (6)
Europe	2.1±7.0 (11)	21.9±29.0(41)	24.9±21.1(16)
N.Africa	1.1±3.5 (10)	0.0 (1)	- (0)
Ethiopia	- (0)	18.9±29.1(22)	16.8±23.3(15)
Total/Mean	3.3±10.1(96)	15.6±25.1(106)	11.6±18.3(67)

Numerals in the parentheses indicate the number of varieties tested.  
*Bt bt<sub>2</sub>* and *bt Bt<sub>2</sub>* indicate non-brittle rachis genotypes.

Table 2. Shoot regeneration percentages in *H. vulgare* with non-brittle rachis genotypes

Genotype	No. of varieties	Shoot regeneration (%) Mean±S.D.		
		Green	Albino	Total
<i>Bt bt<sub>2</sub></i>	37	13.8±12.1	2.4±1.8	16.2±13.2
<i>bt Bt<sub>2</sub></i>	50	28.1±15.6	4.2±3.7	32.3±18.5
t-value		2.76**	1.70	3.15**

\*\* : Significant at 1% level.

Table 3. Shoot regeneration percentages in *Hordeum spontaneum*, *H. agriocrithon* and *H. vulgare*

Species (Variant)	No. of strains	Shoot regeneration (%) Mean±S.D.		
		Green	Albino	Total
<i>H. spontaneum</i>	81	11.1±14.5	10.3±11.8	21.4±18.9
<i>dawense</i>	4	5.1± 4.4	7.4± 8.8	12.5±12.5
<i>ischnatherum</i>	10	8.4± 9.8	14.7±18.0	23.1±21.6
<i>laguncliforme</i>	3	10.5± 3.0	13.1± 3.3	23.6± 5.9
<i>paradoxon</i>	4	5.5± 4.8	2.7± 2.8	8.2± 7.3
<i>proskowetzii</i>	12	17.5±14.9	20.2±16.5	37.7±16.1
<i>spontaneum</i>	48	9.3±10.1	8.0± 7.7	17.3±14.2
<i>H. agriocrithon</i>	13	14.4±15.4	9.5± 8.4	23.9±20.7
( Total 94	Mean	11.5±14.8	10.2±11.4	21.7±19.2 )
<i>H. vulgare</i>	87	22.0±17.4	3.4± 3.3	25.4±20.1

Table 4. Callus growth abilities(CGA), regeneration percentages(RP) and shoot regeneration indices(SRI) of parent with subcultured and non-subcultured

Variety	Subcultured Mean±S.D.			Non-subcultured Mean±S.D.		
	CGA	RP	SRI	CGA	RP	SRI
Wecah	5.4±0.6	3.3±5.8	0.1±0.2	4.3±0.8	13.3±11.9	0.3±0.3
Mota 9	8.8±2.1	8.6±8.4	0.1±0.1	6.7±1.5	35.2±14.5	0.8±0.5
Asamamugi	8.2±2.0	0	0	3.2±0.8	5.6± 4.9	0.1±0.1
Cowra	5.5±1.3	0	0	3.4±0.6	6.6± 4.4	0.1±0.1
6721	12.0±1.2	96.7±5.8	8.9±1.9	6.9±1.5	94.4± 9.6	4.1±1.0
Lenins	14.7±0.2	100	36.9±1.3	5.4±0.6	94.2± 6.4	9.9±1.0

Table 5. Callus growth abilities (mean±S.D.) of F<sub>1</sub> crossed reciprocally between Lenins and the other varieties

parent	Mid parent	F <sub>1</sub> crossed with Lenins as		
		Male	Female	
Wecah	5.4±0.6	10.1	11.7±1.4	10.8±2.9
Mota 9	8.8±2.1	11.8	16.3±4.0	16.0±3.0
Asamamugi	8.2±2.0	11.5	14.0±2.3	20.0±2.2*
Cowra	5.5±1.3	10.1	18.0±1.0	14.6±2.4
6721	12.0±1.2	13.4	17.8±2.9	14.9±1.3
Lenins	14.7±0.2			

\* : Significant difference at 5% level between reciprocal crossed F<sub>1</sub>s.

Table 6. Regeneration percentages (mean ±S.D.) of F<sub>1</sub> crossed reciprocally between Lenins and the other varieties

parent	Mid parent	F <sub>1</sub> crossed with Lenins as		
		Male	Female	
Wecah	3.3±5.8	51.7	80.9±16.5	77.5±14.3
Mota 9	8.6±8.4	54.3	86.7±15.0	83.3± 7.2
Asamamugi	0.0	50.0	78.3± 7.2	83.3±16.7
Cowra	0.0	50.0	65.0±21.8	90.3±10.0
6721	96.7±5.8	98.4	100	96.7± 5.8
Lenins	100			



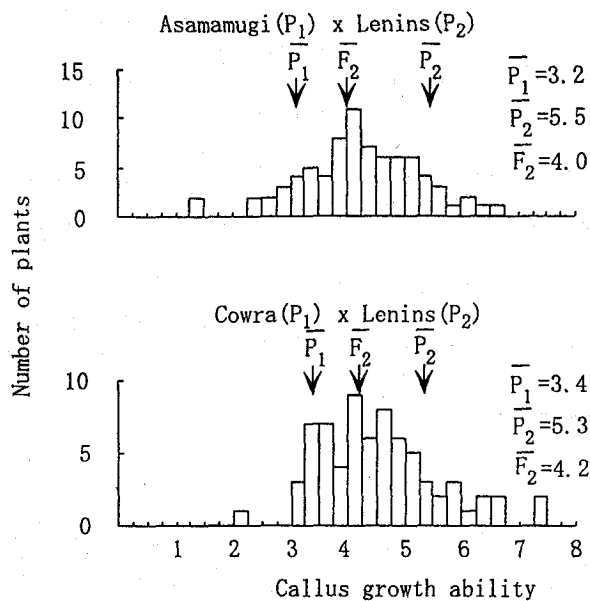


Fig. 1. Frequency distribution of callus growth ability in  $F_2$  populations crossed between Lenins and two barley varieties. The arrows indicate means of parents and  $F_2$  populations.

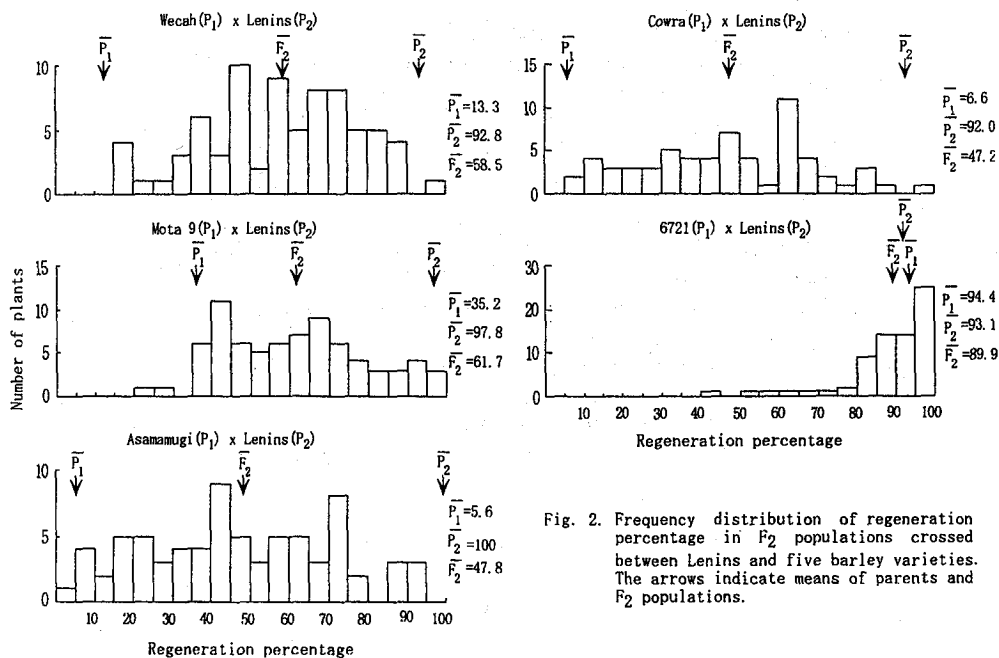


Fig. 2. Frequency distribution of regeneration percentage in  $F_2$  populations crossed between Lenins and five barley varieties. The arrows indicate means of parents and  $F_2$  populations.

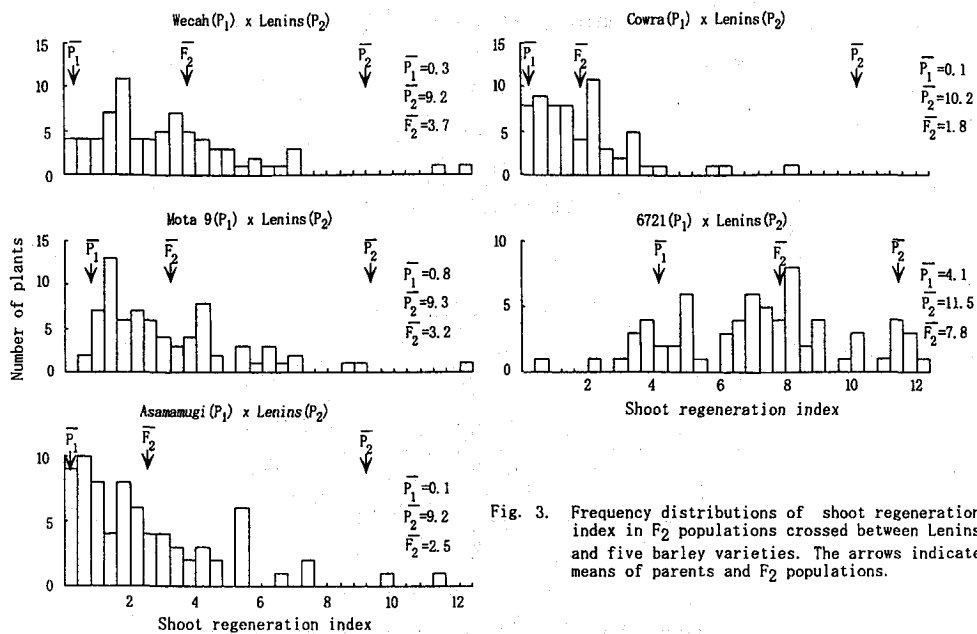


Fig. 3. Frequency distributions of shoot regeneration index in  $F_2$  populations crossed between Lenins and five barley varieties. The arrows indicate means of parents and  $F_2$  populations.

Table 7. Shoot regeneration indices (mean  $\pm$  S.D.) of  $F_1$  crossed reciprocally between Lenins and the other varieties

parent	Mid parent	$F_1$ crossed with Lenins as		
		Male	Female	
Wecah	0.1 $\pm$ 0.2	18.5	8.4 $\pm$ 2.8	8.4 $\pm$ 2.2
Mota 9	0.1 $\pm$ 0.1	18.5	9.0 $\pm$ 4.3	9.7 $\pm$ 1.5
Asamamugi	0.0	18.5	6.8 $\pm$ 1.3	14.3 $\pm$ 3.0**
Cowra	0.0	18.5	3.0 $\pm$ 1.0	11.6 $\pm$ 2.0*
6721	8.9 $\pm$ 1.9	22.9	26.1 $\pm$ 9.3	20.5 $\pm$ 1.7
Lenins	36.9 $\pm$ 1.3			

\*,\*\* : Significant difference at 5% and 1% level between reciprocal crossed  $F_1$ s.

Table 8. Shoot regeneration percentages (mean±S.D.) of calli derived from embryos at four developmental stages

Variety	Developmental stage			
	I	II	III	IV
<b>Group A</b>				
Duckbill (OUA628)	17.0±2.4	23.9±4.1	6.8±5.2	1.3±1.2
Shashamane 16 (OUF634)	4.5±5.6	13.3±8.8	3.7±3.7	2.9±2.8
Fuji Nijo (OUJ220)	39.6±4.9	31.8±5.4	4.9±3.6	4.0±2.6
Igri (OUU760)	11.1±4.2	13.9±2.1	1.8±1.5	2.4±1.9
CSR 141d (OUU746)	33.0±1.4	25.4±2.9	0	4.0±3.3
<b>Group B</b>				
Moroccan (OUB605)	32.3±7.0	29.3±5.1	6.1±0.5	0
Beldi Dwarf-2 (OUB617)	28.2±7.7	21.5±7.9	2.9±2.6	0
Yangiebashi (OUN651)	14.7±2.7	13.0±8.3	4.2±2.1	0
Turkey 393 (OUT731)	18.2±4.4	11.6±3.5	1.7±1.7	0
Germany 53 (OUU637)	11.1±2.8	16.9±1.1	4.4±2.5	0
Golden Promis (OUU132)	52.1±7.4	63.8±8.2	20.7±6.3	0
<b>Group C</b>				
Algiers (OUB623)	27.6±3.0	17.5±4.2	0	0
Peru 2 (OUB610)	52.3±4.0	15.2±3.8	0	0
Harbin 13-8A (OUC601)	45.1±4.6	40.3±3.5	0	0
Tsunakubo (OUJ823)	11.3±2.9	42.1±5.9	0	0
Rokkaku (OUJ743)	20.8±3.6	10.4±4.1	0	0
Baku 3 (OUU693)	3.2±4.2	17.0±4.0	0	0
<b>Group D</b>				
Fiche 14 (OUF617)	35.3±5.9	0	0	0
Turkey 375 (OUT725)	34.5±3.8	0	0	0

Table 9. Effects of 5-azacytidine treatment for stage I embryos on callus formation and shoot regeneration

Variety	Duration of treatment (hours)	Callus formation (%)	Shoot regeneration (%)
		Mean±S.D.	Mean±S.D.
Asamamugi	0	100	2.3±2.3
	2	100	7.3±3.9
	4	100	5.6±2.9
	6	100	14.2±1.7
Wecah	0	100	4.6±1.1
	2	100	6.3±3.5
	4	100	5.7±2.9
	6	100	12.1±6.0
Igri	0	100	3.5±0.3
	2	100	10.2±3.7
	4	100	10.7±4.5
	6	96.3±3.7	4.2±4.2
Kanto Nijyo 5	0	100	21.1±3.5
	2	95.8±4.2	36.1±7.5
	4	86.7±8.8	51.2±5.1
	6	45.8±4.2	41.0±19.5
K-3	0	100	28.4±4.1
	2	83.3±6.7	41.6±6.4
	4	74.3±5.5	27.8±14.7
	6	31.7±4.4	0
Golden Promis	0	100	23.9±4.8
	2	94.9±5.1	20.0±4.1
	4	87.1±8.4	24.5±3.7
	6	100	43.2±6.6
Lenins	0	100	83.4±1.4
	2	100	82.0±6.7
	4	100	75.5±3.8
	6	71.8±18.3	43.0±6.6

Table 10. Effects of 5-azacytidine treatment for stage II embryos on callus formation and shoot regeneration

Variety	Duration of treatment (hours)	Callus formation (%)	Shoot regeneration (%)
		Mean±S.D.	Mean±S.D.
Asamamugi	0	100	0
	2	100	0
	4	100	0
	6	100	4.8±1.2
Wecah	0	100	6.7±6.7
	2	100	4.2±4.2
	4	100	4.8±2.9
	6	100	22.2±4.9
Igri	0	100	10.4±5.1
	2	100	12.6±1.6
	4	100	8.3±3.1
	6	100	12.1±0.6
Kanto Nijyo 5	0	100	14.8±3.9
	2	100	11.4±3.6
	4	100	30.6±9.0
	6	100	39.9±7.4
K-3	0	100	32.0±6.5
	2	100	50.1±6.7
	4	100	25.7±5.6
	6	100	53.7±5.3
Golden Promis	0	100	22.2±4.6
	2	100	12.9±1.1
	4	100	33.1±3.7
	6	100	21.6±0.9
Lenins	0	100	78.0±3.2
	2	100	70.5±8.7
	4	100	75.6±4.4
	6	100	70.0±4.4

Table 11. Effects of light condition on callus formation and shoot regeneration

Variety	Treatment	Callus formation (%) Mean±S.D.	Shoot regeneration (%) Mean±S.D.	Shoot regeneration index Mean±S.D.
Asamamugi	Control	100	4.9±2.5	0.3±0.2
	DL	100	0	-
	DDL	100	0	-
Wecah	Control	100	6.5±1.4	1.1±0.4
	DL	100	3.1±2.5	0.1±0.1
	DDL	100	0	-
Igri	Control	100	7.3±1.7	0.6±0.2
	DL	100	9.2±2.5	0.6±0.3
	DDL	100	7.0±2.2	0.3±0.1
Kanto Nijyo 5	Control	100	19.5±2.6	1.5±0.7
	DL	100	30.6±3.7	2.8±0.6
	DDL	100	39.5±5.9	4.6±1.6
K-3	Control	100	26.5±3.9	1.7±0.3
	DL	100	52.3±6.9	6.3±1.4
	DDL	100	45.7±4.1	7.4±1.1
Golden Promis	Control	100	26.5±5.5	3.3±0.4
	DL	100	19.4±4.7	3.0±1.1
	DDL	100	12.4±0.5	2.4±0.4
Lenins	Control	100	78.8±2.4	25.1±1.3
	DL	100	53.6±4.6	13.2±2.3
	DDL	100	50.0±5.7	13.9±1.3

Light condition are as follows.

control : callus induction(light)→regeneration(light).

DL : callus induction(dark)→regeneration(light).

DDL : callus induction(dark)→regeneration(dark)→greening(light).

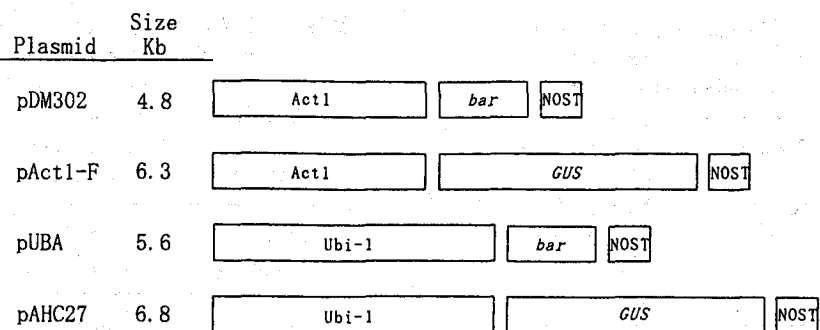


Fig. 4. Schematic of plasmids used in this study. Plasmids were combined a fragment contained promoter of which was rice actin (*Act1*) or maize ubiquitin (*Ubi-1*) and the uid A reporter gene (*GUS*) or a selectable gene (*bar*) and the nopaline synthase terminator (*NOST*).

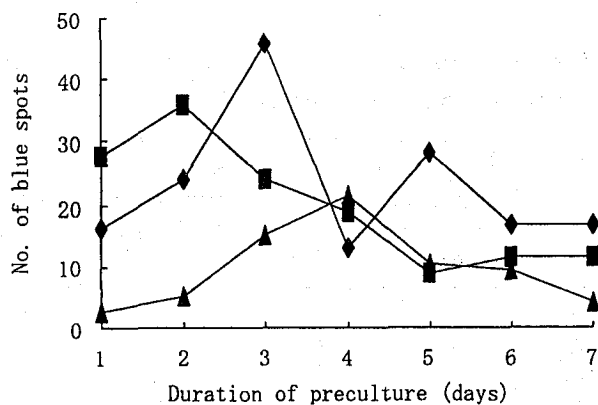


Fig. 5. Effects of preculture and explant types on number of blue spots. Each symbol indicates explant types as follow;  
 ◆ : A type (0.5~0.8mm in immature embryo length)  
 ■ : B type (1.0~1.3mm in immature embryo length)  
 ▲ : C type (about 0.3mm segments of 1.0~1.3mm immature embryos)

Table 12. Effects of plating method of target tissue on *GUS* transient expression

Plating <sup>1)</sup> method	No. of blue spots Mean±S.D.
C	21.4±11.1
S	14.4±5.7
t-value	2.12*

1) C and S indicate methods which plate embryos in circle and square, respectively.

\*:Significant at 5% level.

Table 13. Effects of promoter sequence on *GUS* transient expression

Promoter sequence	No. of blue spots Mean±S.D.
Actin	23.3±10.0
Ubiquitin	10.4±5.9
t-value	4.00**

\*\* :Significant at 1% level.

Table 14. Effect of preculture periods prior to bombardment on the shoot regeneration and production of bialaphos resistant plants

Preculture period (days)	No. of embryos (A)	No. of shoot regenerated calli		No. of resistant plantlets to bialaphos	No. of mature plants (B)	B/Ax100
		green	albino			
1	175	51	1	32	24	13.7
2	200	52	0	19	13	6.5
3	200	36	1	24	17	8.5
4	136	39	1	24	17	12.5
5	126	29	2	28	23	18.3
6	119	31	1	16	8	6.7
7	85	21	0	11	6	7.1
Total	1041	259	6	154	108	10.4



Table 15. Numbers of regenerated shoot, resistant plantlet to bialaphos and mature plant in the six plots which transgenic plants were efficiently obtained

Preculture period (days)	Explant <sup>1)</sup> size	Plating <sup>2)</sup> method	Promoter <sup>3)</sup> sequence	No. of embryo (A)	No. of shoot regenerated callus		No. of resistant plantlets to bialaphos	No. of mature plants(B)	B/Ax100
					green	albino			
1	A	S	A	25	14	1	6	6	24.0
1	A	C	A	25	9	0	9	7	28.0
1	A	C	U	25	16	0	12	7	28.0
3	A	S	A	25	13	0	13	8	32.0
5	B	S	A	18	3	0	7	6	33.3
5	C	C	A	25	7	0	9	9	36.0

1) A and B indicate 0.5~0.8mm and 1~1.3mm in immature embryo length, respectively.

C indicate about 0.3mm segments of 1~1.3mm in immature embryos.

2) C and S indicate methods which plate embryos in circle and square, respectively.

3) A and B indicate promoters of rice actin gene and maize ubiquitin gene, respectively.

## 論文審査の要旨

本研究はオオムギの組織培養技術を品種の観点から検討し、高い再分化能を持つ品種を見出し、その遺伝性および培養特性を検討する一方、この品種への遺伝子導入技術の開発を行ったものである。

まず、世界各地から収集した栽培品種269品種、近縁野生種96系統を供試して、これらを組織培養した際の再分化能の評価を行い、再分化能と小穂非脱落性遺伝子型と深い関係があること、また、近縁野生種では再分化個体にアルビノ個体が含まれる割合が高いことなどを指摘した。そして、未熟胚を培養した際に極めて高い再分化能を示す品種「レニン」を見いだした。

つぎに、この再分化能の高い品種レニンと従来から実験に用いられている数品種との交配を行い、そのF<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>および戻交雑後代を検討して、高い再分化能は複数の遺伝子によって支配されているが、その遺伝率は比較的高いことを示した。これは、この品種の持つ高い再分化能を交雑等の技術を用いて各種品種に導入可能であることを示している。

さらに本研究では、再分化に係わる各種要因について検討した。置床する未熟胚は受精後3週目までは再分化能が比較的強いが、3週間をすぎると急速にその再分化能を失うこと、DNAメチル化阻害剤である5-azacytidine処理によって再分化が高まる品種と高まらない品種があること、この処理の効果も置床胚のステージと関係すること、培養時の光条件によって再分化能に強く影響を受ける品種と影響を受けない品種があることなどを指摘した。これらの条件検討は今後のオオムギの組織培養技術に重要な知見を与えた。

つぎに上述の培養条件を基礎にして、パーテクルガン法によって、外来遺伝子を品種レニンに導入する実験を行った。照射する際の未熟胚の前培養期間、大きさ、配列法、プロモーターなどの各種の条件を検討し、条件を選べば20%台の高い確率で遺伝子が導入できることを明らかにし、オオムギにおいても遺伝子導入ができることを実証した。

以上の研究はオオムギを材料とした育種技術に新しい知見を加えたものであり、当該研究者に博士（農学）の学位を授与するにふさわしいものと判断した。