

福岡県農業総合試験場特別報告

第7号

ビール大麦における半数体育種に
関する研究

平成5年7月

福岡県農業総合試験場

(福岡県筑紫野市吉木)

ISSN 0913-509X

**SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER**

NO. 7

Studies on Haploid Breeding for Malting Barley

The Fukuoka Agricultural Research Center

Chikushino, Fukuoka 818, Japan

July 1993

ビール大麦における半数体育種に
関する研究※

古 庄 雅 彦

1 9 9 3

※ 九州大学審査学位論文

序

作物育種においては新品種育成までの年限を短縮する方法の一つとして半数体育種法があり、諸外国において麦類をはじめとして主な作物の育種事業に利用されている。また、わが国ではこれまでに水稲あるいは小麦等での利用はあるものの、ビール大麦ではなかった。ビール大麦は、早生であることや契約栽培による商品価値の高さなどにより、二毛作地帯では重要な作物となっている。しかし、最近わが国の主要なビール大麦生産地帯である北部九州では、被害粒の多発等によってビール大麦としての検査合格率と上位等級比率が低下し、生産現場から緊急にその問題解決に対応できる品種の育成が求められている。

本研究はビール大麦の品種育成において、育種年限を短縮するための半数体育種法の効率化やその具体的な利用方法について究明したものである。その結果、これまでにない半数体育種法の開発、手法の効率化さらに本法を実際の育種事業に適用してビール大麦系統を育成するなどの成果を得たので、ここに特別報告として公表することとした。これらの研究成果はビール大麦あるいはその他の大麦育種に利用され、広く農業振興に寄与することを期待するものである。

なお、本報告は福岡県農業総合試験場において、1986年から1991年までに指定試験事業「暖地向醸造用二条大麦新品種の育成」および県単独事業「バイオテクノロジー技術開発特別研究（二条大麦の半数体利用による新品種の育成法）」の中で実施した試験成績を取りまとめたものである。

本研究の遂行および取りまとめにあたって、指導と助言を頂いた九州大学教授小西猛朗博士、同教授岩田伸夫博士ならびに同助教授吉田智彦博士に厚くお礼を申し上げますとともに、福岡県農業総合試験場二条大麦育種研究室、栃木県農業試験場栃木分場職員およびビール酒造組合の協力により成果をあげることができたことを付記し、関係各位に深く感謝の意を表する。

平成5年7月

福岡県農業総合試験場長

平川一郎

目 次

| | |
|---|----|
| 第1章 結 論 | 1 |
| 第2章 野生オオムギ (<i>Hordeum bulbosum</i> L.) 利用による半数体の効率的な作出方法の確立 | 5 |
| 1. 胚の摘出適期 | 5 |
| 2. 胚培養における培地の種類および染色体倍加法 | 7 |
| 3. ビール大麦と <i>H. bulbosum</i> 花粉の人工発芽 | 9 |
| 4. 摘 要 | 11 |
| 第3章 半数体作出におけるビール大麦の品種間差 | 12 |
| 1. 半数体作出率の品種間差と花粉管の伸長および染色体消失過程の関係 | 12 |
| 2. 半数体作出率に関する遺伝様式 | 16 |
| 3. 摘 要 | 18 |
| 第4章 半数体作出における <i>H. bulbosum</i> の系統間差 | 19 |
| 1. <i>H. bulbosum</i> の半数体作出能力の差 | 19 |
| 2. <i>H. bulbosum</i> の改良 | 21 |
| 3. 摘 要 | 24 |
| 第5章 <i>H. bulbosum</i> 以外の植物を利用した半数体の作出法 | 25 |
| 1. オオムギ×トウモロコシによるオオムギ半数体の作出 | 25 |
| 2. オオムギ×イタリアンライグラスによるオオムギ半数体の作出 | 28 |
| 3. 摘 要 | 29 |
| 第6章 半数体利用による品種育成 | 31 |
| 1. 半数体における選抜 | 31 |
| 2. 半数体由来ビール大麦品種の育成 | 35 |
| 3. 摘 要 | 43 |
| 第7章 総合考察 | 44 |
| 第8章 摘 要 | 48 |
| 第9章 引用文献 | 50 |
| Summary | 58 |

第1章 緒 論

半数体植物の染色体を倍加することによってホモ接合体（純系）を直ちに得ることができる。従来の変種育成においては自殖による純系化には多くの世代を要するが、半数体の染色体倍加による半数体育種法では純系の作出が一代で達成され、育種年限を大幅に短縮することができる。また、半数体のゲノムが含む遺伝子については単量の状態であるために、劣性遺伝子の作用が優性遺伝子の場合と同様、直接発現するので形質の選抜が可能であり効率的な育種法となる。また、Nitzsche and Wenzel (1977) は半数体に関する総説のなかでモノソミックシリーズを作る基礎材料として適していること、半数体には優劣性がないので突然変異育種に利用できること、遺伝的分離があまり複雑でなく、ある特定遺伝子組合せの個体を選抜するのに必要な集団は比較的小さくてすむことなどを半数体利用の可能性として挙げている。さらに、半数体育種法と系統育種法の比較において、Nei (1963) は育種目標に関与する遺伝子数が多い場合には半数体育種法が有利であることを報告した。一方、Walsh (1974) は組換え型を選抜する場合、半数体育種法は系統育種法より劣り、その理由を系統育種法では組換えが毎世代繰り返行われるのに対し、半数体育種法ではF₁世代の1回に限られるためであるとした。このような不利益もあるものの、Griffing (1975) は短期間で育種できることを半数体育種法の優れた点と評価している。

以上の利点は実際に半数体が得られて初めて達成されるものである。高等植物の半数体が自然に生じた例は *Datura Stramonium* で Blakeslee *et al.* (1922) により最初に発見された。その後、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、トマト、ワタ、タバコ、バレイショなど、ほとんどすべての主要作物で発見されている。しかし、その出現頻度はきわめて低く、*Datura Stramonium* では 5×10^{-3} であった。一方、半数体的人為的作出については、Shimakura (1934) がムラサキツユクサおよびエンレイソウの花粉母細胞の培養を行い、人工培地上で花粉の分裂の可能性を示唆し、Guha and Maheshwari (1964) が *Datura innoxia* で薬培養による花粉起源の半数体作出に初めて成功した。その後、薬培養によりタバコ (中田・田中 1968)、イネ (Niizeki and Oono 1968)、コムギ (Ouyang *et al.* 1973) 等の主要作物で半数体が次々に作出された。オオムギでは薬培養によるカルス形成と半数体植物の分化が Clapham (1971, 1973) によって初めて報告された。また、EMS によって誘発された半数体誘導遺伝子 *hap* によって半数体を得られたが (Hagberg and Hagberg 1980, 1981, Powell and Wood 1984)、これは *hap* 遺伝子をホモあるいはヘテロでもつと、その自殖後代から半数体を得られるというものであった。半数体植物はさらに、受精していない子房を培養することによっても得られることが報告された (San Noeum 1976, Wang and Kuang 1981, Huang *et al.* 1982)。

人為的な半数体の作出法としては上記の他に種間交雑による方法がある。オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の場合、最初はその野生種 (*Hordeum bulbosum* L.) のもつ耐寒性やうどんこ病抵抗性などの育種上望ましい遺伝子をオオムギに導入することを目的として、オオムギと *H. bulbosum* を交雑した。その結果、いくつかの雑種植物は得られたが、成功率はかなり低かった (Kuckuck 1934, Konzak *et al.* 1951, Morrison *et al.* 1959, Morrison and Rajhathy 1959)。その後 Davies (1958) が4倍体の *H. bulbosum* とオオムギ人為4倍体の交雑から2倍性半数体を得たが、それは雌性単為生殖によると説明した。また、Symko (1969), Kasha and Kao (1970), Lange (1971a, b) もこの種間交雑で半数体を得たが、彼らはその理由を染色体の消失によると説明し“雌性単為生殖説”を棄却した。こうした報告に基づき多くの研究者がこの方

法に取り組み、半数体を作成した (Fedak 1973, Jensen 1974, Islam and Sparrow 1974, Pickering 1977, 福山・黒住 1977)。

筆者はビール大麦育種において、良質、多収、大麦萎縮病抵抗性等を育種目標にした品種育成に携わり、ニンノゴールド (伊藤ら 1987) およびアサカゴールド (吉田ら 1991) 等の優良品種の育成を行ってきた。しかし、近年のビール大麦生産においては凸腹粒や側面裂皮粒等の被害粒 (浜地・吉田 1989) の多発によってビール大麦としての検査合格率と上位等級比率が低下し、生産現場から緊急にその問題解決に対応できる品種の育成が求められている。また、現在の抵抗性品種を侵す新しい病原菌系統が出現したり、その他の新たな病害、あるいは予期せぬ育種目標ができた場合にもその早期達成が求められるであろう。そのため、これまで実施してきた初期世代において1年間に2世代を経過させる世代促進法よりも、さらに育種年限を短縮する手法の開発が必要である。

育種年限を短縮するための手段としての半数体育種法には先に述べたように薬培養法、半数体誘導遺伝子の利用および種間交雑による染色体消失を利用した方法があるが、薬培養法や半数体誘導遺伝子の利用では植物体分化率が低いことや白子が多く出現すること (Hagberg and Hagberg 1980, 1981, Hamachi *et al.* 1988), また、薬培養により分化した植物体には異数体や混数体が存在することが報告されており (Grunewaldt and Malepszy 1975, Foroughi-Wehr *et al.* 1976), 実際の育種事業に組み込み品種育成に利用するには問題があると考えられる。そこで筆者は、薬培養より効率的であると報告された (Huang *et al.* 1984), オオムギと *H. bulbosum* との種間交雑を利用した半数体作出法 (*bulbosum*法), 特にオオムギを母に, *H. bulbosum* を花粉親にした方法について、ビール大麦に半数体育種法を適用するための研究を行うこととした。

H. bulbosum (Fig. 1-1) はモロッコ、チュニジア、イタリア、スペイン等の地中海沿岸からアフガニスタン、旧ソビエト連邦南部まで自生している。トルコ中部を境に、2倍体は西方の地中海周辺に、4倍体は東方のアジア大陸に多く分布している (Katznelson and Zohary 1967)。また、自家不和合性であり他殖によって種子繁殖するほか、茎の基部がふくらんだ球茎 (Fig. 1-1) でも繁殖する (Lein 1948, Lundqvist 1962, Katznelson and Zohary 1967, Ofir *et al.* 1967)。

ここで、オオムギと *H. bulbosum* の交雑における半数体作出に関する研究を整理してみると、半数体出現に及ぼす両種間の交雑親和性、得られた雑種胚の培養法、交雑後の *H. bulbosum* 染色体の消失機構が主たる研究課題である。

H. bulbosum はオオムギとは異なるゲノムをもち、容易に交雑できるものではない。交雑親和性の差異については、*H. bulbosum* 系統間で交雑後の胚着生率に差があることが認められている (Pickering and Hayes 1976, Pickering 1980a, 1983b, Simpson *et al.* 1980)。また、オオムギ品種によっても *H. bulbosum* との交雑親和性に差異があり、胚着生率が平均30%以下と大きく低下することが報告されている (Pickering and

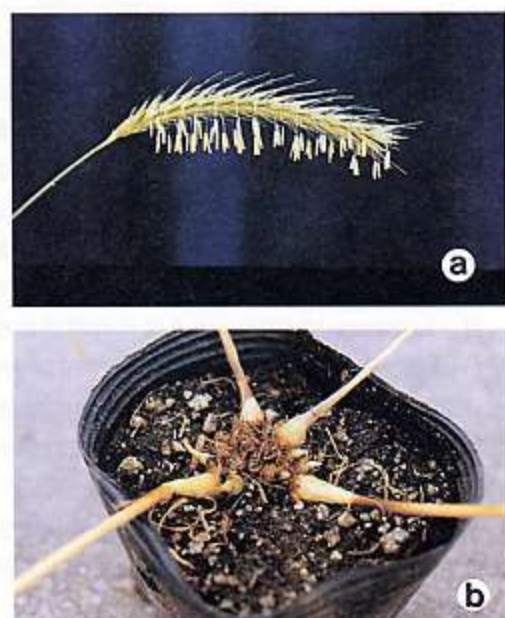


Fig. 1-1. *Hordeum bulbosum* L.
($2n=2x=14$)
a: Spike and anthers, b: Bulbs

Hayes 1976, Bjørnstad 1986, Devaux *et al.* 1990)。その原因を Pickering (1981) はオオムギ柱頭上での花粉管伸長の異常であることを指摘した。さらに、Pickering (1983c) はこの不和合性は DDT 感受性遺伝子と連鎖した優性の単一遺伝子に支配されているとした。

オオムギと *H. bulbosum* の交雑後の雑種幼胚の培養条件については、Jensen (1976) が固形培地と液体培地を比較し、特に液体培地がよいことを報告した。また、交雑後から胚摘出までの期間の穂の養成条件は Pickering (1982) および Chen and Hayes (1989) が、胚摘出時期については Adamski (1979) がそれぞれ効率的な方法を報告している。さらに、半数体を得た後のコルヒチンによる染色体倍加については Subrahmanyam and Kasha (1975), Thiebaut and Kasha (1977, 1978) が効率的な方法を明らかにした。

オオムギと *H. bulbosum* の雑種における *H. bulbosum* 染色体の消失機構について、Fukuyama (1987) は4倍体の *H. bulbosum* と人為4倍体の *H. vulgare* の交雑では交雑後3~5日に最も急速な染色体消失が起こることを、また Subrahmanyam and Kasha (1973) は2倍体の *H. vulgare* × *H. bulbosum* において半数性 ($2n=7$) を示す細胞の割合が交雑5日後で37.03%, 7日後では68.68%, 11日後では93.69%であることを報告している。さらに染色体消失の遺伝的な要因として、Ho and Kasha (1975) はオオムギの第2および第3染色体上の少なくとも三つの遺伝子が関与していることを報告し、福山・黒住 (1977) は4倍体の *H. bulbosum* と人為4倍体のオオムギの交雑では、*H. bulbosum* 側の要因によって染色体消失の程度が異なると述べている。また、*H. bulbosum* の染色体が完全に消失せず、オオムギとの雑種も出現することが Kasha and Sadasivaiah (1971), Subrahmanyam and Kasha (1973), Jensen (1976), Pickering and Morgan (1983) 等によって報告された。さらに、Pickering (1985) は交雑後の温度条件が雑種の出現に影響していることを示した。

このように、*H. bulbosum* を利用した半数体の作出および染色体倍加法については多くの報告がある。しかし、交雑方法、胚培養法、染色体倍加法は研究者によって異なり、それらを日本のビール大麦に直ちに適用できるものではない。そこで、日本のビール大麦品種育成に適した *H. bulbosum* を利用した半数体育種法を確立する必要がある。

半数体育種法をビール大麦において実際の育種技術として確立するためには、育種年限の短縮と同時に半数体の段階で有用形質が選抜できればさらに効率を高めることができる。Foroughi-Wehr and Friedt (1984) は薬培養由来の植物体で大麦萎縮病に対する反応を早期に検定しているが、染色体倍加処理前の半数体を用いて検定した例は未だない。そのため、半数体について農業上重要と思われる形質に対する選抜の可能性についても検討する必要がある。

H. bulbosum を利用した半数体育種法は欧米をはじめ韓国 (Kim *et al.* 1988), 南アフリカ (Littlejohn and Pienaar 1988) 等で広く行われ、カナダでは 'Mingo' (Ho and Jones 1980) と 'Rodeo' (Campbell *et al.* 1984) が飼料用として、イギリスでは 'Doublet' (Jones *et al.* 1985) と 'Pipkin' (Jones *et al.* 1986) がビール大麦の品種として育成されている。また、イギリスで育成された 'Gwylan' がニュージーランドで飼料用オオムギ品種として採用された (Coles 1986)。しかし、高度の醸造適性を要求されるビール大麦品種に対しては、わが国においてこの半数体育種法を利用して有望な品種を育成した報告はない。

筆者は以上の観点から、ビール大麦において半数体育種法を確立する目的で、*H. bulbosum* を利用した半数体の作出における胚摘出時期や培養法の検討、さらに、染色体倍加個体の効率的な作出法を明らかにしようとした。また、半数体作出率におけるビール大麦の品種間差と染色体の消失過程およびその遺伝様式を検討した。さらに、取扱が容易で半数体作出効率の高い *H. bulbosum*

系統の選抜や *H. bulbosum* 以外の植物体の花粉を利用した半数体の作出法についても、その可能性を検討した。また、半数体育種法の効率化を図るために、半数体段階で病害抵抗性の選抜法を検討した。以上の知見をもとにして *H. bulbosum* を利用した半数体由来のビール大麦半数体倍加固定系統の育成を試みた。

その結果、効率的な培養法と染色体倍加法を明らかにすることができた。また、ビール大麦における半数体作出率の品種間差と染色体消失過程との関係および作出率に關与する遺伝子の存在を示した。低温による春化処理を必要としない春播型で半数体作出効率の高い *H. bulbosum* 系統を選抜できることや *H. bulbosum* 以外の植物を利用した半数体作出法についてもここで初めて明らかにした。さらに、大麦萎縮病とうどんこ病に対する抵抗性個体を半数体段階で選抜できることを明らかにし、半数体由来の良質で多収なビール大麦有望系統を実際に得ることができた。このように、ビール大麦における半数体育種法についてその効率化や新手法の開発等、総合的な利用法を明らかにすることができた。

本研究は1986年から1992年まで主に福岡県農業総合試験場農産研究所育種部二条大麦育種研究室（二条大麦育種指定試験地、福岡県筑紫野市吉木）において、指定試験事業「暖地向醸造用二条大麦新品種の育成」および県単独事業「バイオテクノロジー技術開発特別研究（二条大麦の半数体利用による新品種の育成法）」のなかで行ったものであり、一部は農林水産省農業研究センターおよび農業生物資源研究所（茨城県つくば市）において行った。本研究は逐次、日本作物学会九州支部会（古庄ら 1987, 1988b）、日本育種学会（Furusho *et al.* 1990a, 1991, 1993, 古庄ら 1988a, 1990b, 1992b, 1992c）、Barley Newsletter（Furusho 1988）および Crop Science Society of America（Furusho *et al.* 1992a）に投稿し、各学会誌で発表してきたが、未発表のものも含め、ここに成績を取りまとめて報告することにした。本研究のデータは特記する以外はすべて福岡県農業総合試験場の試験圃場および温室での結果である。

本研究の遂行および本論文の取りまとめにあたり、元福岡県農業総合試験場農産研究所育種部長（現九州大学助教授）吉田智彦博士には終始懇篤なる指導を賜った。また、本論文を作成するにあたって、九州大学教授小西猛朗博士ならびに同教授岩田伸夫博士に懇篤なる校閲を賜った。

本研究の端緒は元福岡県農業総合試験場二条大麦育種研究室長（現農林水産省四国農業試験場畑作物育種研究室長）伊藤昌光氏から賜った。研究の着手にあたっては、新潟大学助教授福山利範博士および農林水産省農業研究センター主任研究官牛山智彦氏に温情ある指導と助言をいただいた。研究の遂行にあたっては、福岡県農業総合試験場二条大麦育種研究室（現水稲育種研究室）浜地勇次博士、同室の吉野稔氏、現室長の吉川亮氏に多大の協力と援助をいただいた。また、農林水産省農業生物資源研究所細胞育種部長中島卓介博士および末永一博主任研究官に指導と助言をいただいた。さらに、農林水産省農業研究センター大麦育種研究室長牧野徳彦博士には助言と激励をいただいた。栃木県農業試験場栃木分場ビール麦醸造用品質改善指定試験地の方々には麦芽品質の分析をしていただいた。また、半数体倍加系統の地域適応性検定試験を行うにあたっては、栃木県農業試験場栃木分場二条大麦育種指定試験地、キリンビール株式会社、サッポロビール株式会社、アサヒビール株式会社ならびにサントリー株式会社のビール大麦育種に關係する方々に協力していただいた。

ここに各位に対し深甚なる感謝の意を表する。

第2章 野生オオムギ (*Hordeum bulbosum* L.) 利用による半数体の効率的な作出方法の確立

本章では、野生オオムギ *Hordeum bulbosum* L. を利用して半数体を作成するにあたって、オオムギとの交雑後、雑種胚を抽出する最適時期を検討した。また、胚抽出後、半数体および半数体倍加系統を作成するための効率的な培養条件と染色体倍加法を検討した。さらに、*H. bulbosum* 花粉の貯蔵を目的として花粉発芽試験用培地の選定と花粉発芽能力の経時的变化を検討した。以下では、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) と野生オオムギ (*H. bulbosum* L.) を交雑し、野生オオムギ染色体の特異的消失により半数体を得る方法を *bulbosum* 法と呼ぶことにする。

1. 胚の抽出時期

bulbosum 法においては、交雑によって受精した胚はそのままでは植物体上で発育しないので、胚を無菌的に抽出後、人工培養することが必要である。これまでにオオムギ半数体を得るために適当な胚抽出時期として、交雑8～12日後 (Kao and Kasha 1971), 14～21日後 (Jensen 1974), 15～18日後 (Adamski 1979), 11～20日後 (Pickering 1980b) と報告され、時期が一定していない。そこでビール大麦に *bulbosum* 法を適用するにあたって最も適切な胚の抽出時期を明らかにするために、抽出時期別の半数体作出率を調べた。

材料および方法

交雑は1987年1～2月の期間に温室内で行った。ビール大麦は (ニシノゴールド×あまぎ二条) Fi を、野生オオムギ *H. bulbosum* は Cb2920 と GBC77-1 (いずれも $2n=2x=14$, 岡山大学農業生物研究所より分譲) を用いた。ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑後半数体を得られるまでの過程を Fig. 2-1 から 2-3 までに示した。*H. bulbosum* は秋播性程度が高く、一般的に低温による春化処理を必要とする (Koller and Highkin 1960)。そこで、5℃、8時間日長で8週間の春化処理を行った後、15℃以上、24時間日長の温室内で開花まで養成した。

交雑方法は基本的には Pickering (1980b) の方法によったが *H. bulbosum* の花粉を授粉後直ちに第2節間から切穂し切花延命剤 (ジョンソン(株) 入り) の水に挿すこと、交雑翌日に穂へ75ppm の GA₃ を処理すること、およびその後茶封筒に取り替えて養成することは牛山ら (1987) の方法によった。さらに、除雄後、穂をポリエチレン袋で被覆し内部を高湿度で保つこと、胚抽出までの切り穂の養成条件を25℃、18時間日長にする変更を行った。胚抽出時期は交雑7日、11日、12日、13日および14日後とした。それぞれの抽出時期に胚を無菌的に培地 (B5 および R-M-IS) に置床した。基本的な胚培養法は Jensen (1976) の方法によったが、本研究では胚抽出後の条件を一部変更し、発芽までは暗所、25℃、発芽後は12時間日長、暗：20℃、明：25℃の環境条件下に移した。得られた植物体は2～3葉期に砂：土：パーミキュライト=1：1：1の床土を入れたポリポットに移植した。また、染色体数を確認するために培養中の植物体の根端を0℃の氷水中で24時間前処理し、エタノール：酢酸=3：1の溶液で固定した後、アセトカーミンで染色し、おしつぶし法によってプレパラートを作成し染色体数を観察した。



Fig. 2-1. Dissected embryos at 11 days after pollination.
(left: selfed embryo, right: hybrid embryo)

結果および考察

得られた植物体について、無作為に約100個体を選抜し染色体数を観察したところ、すべて染色体数は $2n=7$ であった (Fig. 2-3)。また、残りの植物体も染色体を観察した個体と形態的に同じであり、得られた植物体はすべてオオムギの半数体であると考えられた。Table 2-1に *H. bulbosum* と交雑後、得られた胚摘出時期別の胚着生率 (胚着生数/授粉小花数) と半数体作出率 (半数体数/授粉小花数) を示した。*H. bulbosum* 系統は2種類を用いたが、両者とも交雑後11~13日の胚着生率は同等であった (Table 2-2) ので、胚摘出時期別の胚着生率と半数体作出率は2種類の *H. bulbosum* の平均値で示した。胚着生率は交雑後7~14日で見ると56.9~63.3%であった。各時期に得られた胚を培養して植物体を養成した場合、半数体の作出率は10.9~23.3%と大きな差があり、交雑後11~12日後に摘出した場合が最も半数体作出率が高かった。交雑後7日の早い時期と、14日後の遅い時期はいずれも半数体作出率が低かった。早い時期で摘出した場合には胚が十分に生長していないために摘出作業が困難であった。また、摘出が遅いと穎果中で胚がカルス化しており、老化の進行により活力が低下してしまうことが考えられた。したがって、ビール大麦において半数体を効率よく作出するための最適な胚摘出時期は交雑後11~12日であった。この結果はこれまでの報告と比較して、胚摘出の適期をより正確に示すものであった。

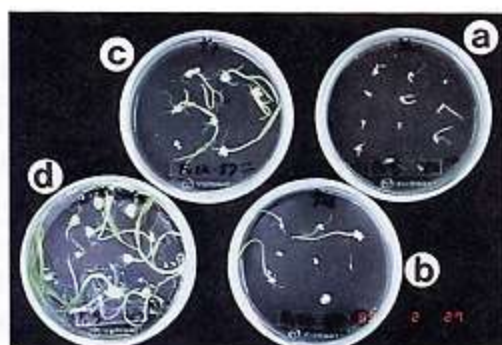


Fig. 2-2. Embryo culturing in the medium (a: 1 week, b: 2 weeks, c: 3 weeks and d: 4 weeks after embryo culturing).



Fig. 2-3. Regenerated haploid plants obtained from barley x *H. bulbosum* 6-7 weeks after embryo culturing (a), and root tip chromosomes of a regenerated plant having 7 chromosomes (b).

Table 2-1. Embryo formation and haploid production efficiency in different dissection date after pollination

| Days after pollination | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | % | |
|------------------------|---------------------------|---|--|--|
| | | | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated |
| 7 | 66 | 63.3 | 12.1 | 19.0 |
| 11 | 434 | 56.9 | 23.3 | 40.9 |
| 12 | 1198 | 59.7 | 22.0 | 36.9 |
| 13 | 529 | 57.3 | 14.6 | 25.4 |
| 14 | 341 | 56.9 | 10.9 | 19.1 |

Table 2-2. Embryo formation efficiency from crosses between *H. vulgare* and two *H. bulbosum* clones

| Year | <i>H. bulbosum</i> clone | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | |
|------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|---|--|
| | | | | % | |
| 1986 | Cb2920 | 1223 | 523 | 42.8 | |
| | GBC77-1 | 494 | 228 | 46.2 | |
| 1987 | Cb2920 | 1554 | 914 | 58.8 | |
| | GBC77-1 | 607 | 351 | 57.8 | |

Note: Embryos were obtained 11-13 days after pollination.

2. 胚培養における培地の種類および染色体倍加法

オオムギと *H. bulbosum* との交雑によって得られた胚を培養し、半数体を作成するための人工培地として、Jensen (1976) は 3 種類の固形培地と 2 種類の液体培地をよい結果をもたらす培地として挙げている。そこで、ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑から半数体を効率よく得るために、それらの中から 2 種類の固形培地を取り上げて半数体作出率を比較した。また、半数体を作成した後、コルヒチンを処理して半数体倍加個体を得るためにコルヒチンの濃度やその他の添加物および処理時期が検討されている (Subrahmanyam and Kasha 1973, Thiebaut and Kasha 1977, 1978, Ho *et al.* 1978, Adamski 1979, Thiebaut *et al.* 1979)。しかし、それらはいずれも人工気象室等環境を十分に制御できる状態で行った試験で処理個体数に制限があり、自然条件下で大量に効率的に倍加個体を得る方法は検討されていない。そこで、人工気象室等を恒常的に使用することなく、半数体倍加個体を大量に得るための処理条件を検討した。

材料および方法

1986年と1987年の2か年において *H. bulbosum* の2系統 (Cb2920および GBC77-1) とビール大麦との交雑によって得られた胚を交雑11~13日後に摘出し、B5 (Gamborg *et al.* 1968) および R-M-IS (Islam and Sparrow 1974) 培地に置床した。交雑に用いたビール大麦品種は1986年ははるな二条、ミサトゴールド、あまぎ二条、ニシノゴールドおよび吉系15、1987年は (ニシノゴールド×あまぎ二条) F₁ であった。交雑と半数体の養成は前節と同じ方法によった。

1988年に (九州二条10号×関東二条25号) F₁、(吉系19×関東二条25号) F₁ および (九州二条10号×吉系15) F₁ に *H. bulbosum* (Cb2920) を交雑して半数体を作出した。半数体は土入りポットに移植し、約1か月後2%のDMSO、約10滴/1,000ccのTween-20を添加した0.05%のホルヒチン溶液に20℃、5時間株元を浸漬し (Jensen 1976)、染色体の倍加を行った (Fig. 2-4)。処理時期は2月12日から3月4日までと3月23日から4月28日までの2時期に分けて行った。半数体および染色体倍加処理個体の養成は最低温度15℃を維持する条件のガラス温室で行った。



Fig. 2-4. The colchicine treatment at 3-5 tiller stage for chromosome doubling (a), and root tip chromosomes of a doubled haploid having 14 chromosomes (b).

結果および考察

Table 2-3に1986年と1987年における培地別の半数体作出率を示した。各培地で培養した胚からの半数体作出率は、1986年はB5が21.0%、R-M-ISでは26.0%で後者がやや優っていたが、1987年では前者が35.4%、後者が34.3%で同等であった。これらの値はBarley Medium 2とLinsmaier and Skoog Mediumを用いたAdamski (1979)の結果やorchid agar mediumを用いたSimpson and Snape (1981)の結果より優れていた。また、Jensen (1976)の示したC-17液体培地での結果よりやや低かったが、同時に比較に用いたC-17固形培地の結果と同等かやや優っていた。したがって、本試験で用いた2種類の培地はともに半数体作出のためには効率のよい培地であると考えられる。オオムギの胚培養においてNorstog (1965)は胚盤と胚軸の向きが効率的な分化に重要であると述べている。液体培地では置床した胚の向きが一定しないことが予想されること、また大量に培養を行う場合には培地の持ち運びや保存などの取扱が固形培地より難しいと考えられたので、液体培地についてはここでは検討しなかった。

Table 2-4には1988年における半数体倍加処理時期の効果について示した。培養により得られた半数体をホルヒチン処理したところ、半数体の44.8~73.4%で倍加系統を得ることができた。このうち、ホルヒチン処理を3月4日までにを行った場合は倍加効率が73.4~79.8%と高く、全授粉数の12.2~21.0%と高い割合で半数体倍加系統を得ることができた。しかし、3月23日以降にホルヒ

Table 2-3. Haploid production efficiency on different medium

| Year | Medium | No. of embryos cultured | No. of haploids obtained | No. of haploids obtained/No. of embryos cultured |
|------|--------|-------------------------|--------------------------|--|
| | | | | % |
| 1986 | B 5 | 533 | 112 | 21.0 |
| | R-M-IS | 218 | 57 | 26.0 |
| 1987 | B 5 | 734 | 260 | 35.4 |
| | R-M-IS | 531 | 182 | 34.3 |

Note: Embryos were obtained 11-13 days after pollination.

Table 2-4. Chromosome doubling efficiency in different treatment date

| <i>H. vulgare</i> | No. of haploids treated | No. of doubled haploids obtained/No. of haploids treated | | | No. of doubled haploids obtained/No. of florets pollinated before Mar.4 |
|---|-------------------------|--|--------------|--------------|---|
| | | Total | before Mar.4 | after Mar.23 | |
| % | | | | | |
| F ₁ (Kyushu Nijo 10 x Kanto Nijo 25) | 230 | 44.8 | 79.8 | 13.2 | 21.0 |
| F ₁ (Yoshikei 19 x Kanto Nijo 25) | 154 | 73.4 | 73.4 | — | 16.8 |
| F ₁ (Kyushu Nijo 10 x Yoshikei 15) | 146 | 53.4 | 74.2 | 36.3 | 12.2 |

チン処理した場合は染色体倍加率が13.2~36.2%と極端に低下した。これはコルヒチン処理時期の高温条件の影響であると考えられた。Simpson and Snape (1981) は秋播型オオムギにおける半数体育種において、コルヒチンによる染色体倍加効率は90%以上であると報告している。しかし、本試験のように、処理後に適温条件を厳密に維持できない条件下で大量に半数体倍加系統を得るためには、3月上旬までにコルヒチン処理を行う必要があった。また、この時期までに処理を終えるには12月~1月中旬に *H. bulbosum* と交雑し、半数体を得ておかなければならなかった。

3. ビール大麦と *H. bulbosum* 花粉の人工発芽

H. bulbosum 花粉を貯蔵することができれば必ずしもオオムギとの開花期を合わせる必要がなくなり、交雑時期の拡大によって大量の半数体を得ることができる。そこで、本実験では花粉貯蔵を前提として花粉発芽試験における人工培地条件を明らかにするとともにビール大麦と *H.*

bulbosum 花粉の発芽能力の経時的变化について検討した。

材料および方法

1) 花粉発芽検定法

固形培地および液体培地で花粉の人工発芽試験を行った。固形培地はショ糖：10%、寒天：1.0%、pH：6.0の培地（中山 1934）およびショ糖：15%、馬鈴薯デンプン10%の培地（穂積・菜崎 1957）を用いた。液体培地はショ糖：15%、CaCl₂：0.1%、H₃BO₃：0.01%、pH：6.0を基本液体培地（花粉の人工発芽試験にこの組成の液体培地を用いることは、農水省農業生物資源研究所の石川雅也博士より教示賜った）とし、Fig. 2-5に示すような組成の異なった液体培地で発芽検定を行った。なお、馬鈴薯デンプンは液体培地に粘性をもたせるために添加した。品種は固形培地ではニシノゴールド、液体培地では吉系21を供試し、ともに新鮮な成熟花粉を各培地に置床し、1時間経過後、顕微鏡下（100倍）5～6視野の花粉を観察して発芽率を求めた。なお、花粉管がわずかも伸長したものは発芽とし、花粉上に突起を生じただけのものは発芽とはしなかった。

2) 花粉発芽能力の経時的变化

H. bulbosum 花粉の発芽能力の経時的变化を検討するために、ニシノゴールドを比較品種とし花粉採集直後から3時間後（室温20～23℃、シャーレ中で保存）まで発芽能力の変化を調査した。培地は最もよい発芽を示した液体培地（ショ糖：15%、馬鈴薯デンプン：1.0%、CaCl₂：0.1%、H₃BO₃：0.01%、pH：6.0）を用いた。

結果および考察

2種類の固形培地を用いて花粉発芽試験を行ったが、いずれの培地でもほとんどの花粉が培地上で破裂し発芽率は0%であった。これに対し、液体培地ではいずれの培地においても花粉の発芽が認められた。Fig. 2-5に液体培地の組成と花粉発芽率の関係を示した。馬鈴薯デンプンを添加しない基本液体培地の発芽率が75.0%に対し、馬鈴薯デンプンを1.0%加えた培地は84.0%と高い発芽率を示した。基本液体培地では花粉管が液体の動揺によって花粉から分離しやすく、発芽した花粉であるのか不発芽花粉であるのかの判別が困難であった。これに対し、馬鈴薯デンプンを添加することによって液体の粘性が高まり、花粉管の分離が少なくなった。また、ショ糖、馬鈴薯デンプンおよびCaCl₂濃度を変えた培地ではいずれも基本液体培地より発芽率が低下した。したがって、最適な培地はショ糖：15%、馬鈴薯デンプン：1.0%、CaCl₂：0.1%、H₃BO₃：0.01%、pH：6.0の液体培地であった。この培地を用い、*H. bulbosum* およびビール大麦花粉の発芽能力の経時的变化について検討した結果をFig. 2-6に示

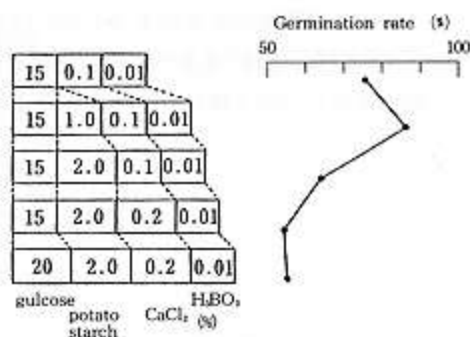


Fig. 2-5. Composition of media for pollen germination and germination rate of *H. vulgare*.

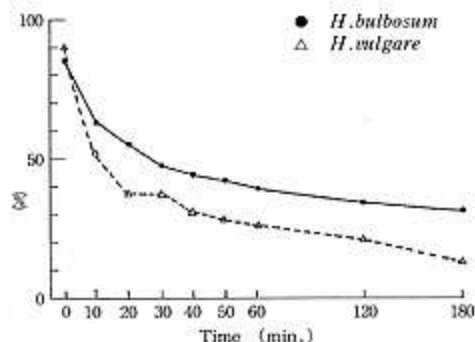


Fig. 2-6. Time course of pollen germination rate of *H. bulbosum* and *H. vulgare*.

した。*H. bulbosum* およびビール大麦ともに花粉の発芽能力は時間の経過とともに低下するが、*H. bulbosum* の方が低下の速度が緩やかであり、いずれの経過時間でも発芽能力はビール大麦より高かった。

以上のように、花粉の人工発芽試験を行うための培地条件と、*H. bulbosum* およびビール大麦花粉の発芽能力の経時的变化を明らかにすることができたので、*H. bulbosum* 花粉の貯蔵について検討する場合の有効な手段になると考えられた。

4. 摘 要

bulbosum 法を確立するために、胚を摘出する適期、胚培養のために効率のよい培地の選定および効率的な染色体倍加法を明らかにした。また、花粉貯蔵を目的として花粉発芽試験用培地の選定とビール大麦と *H. bulbosum* 花粉の発芽能力の経時的变化を明らかにした。

1) ビール大麦と *H. bulbosum* を交雑後、胚を摘出する適期は交雑11~12日後でありこの時期が最も半数体作出率が高かった。

2) 胚培養を行う培地は B5 および R-M-IS ともに半数体作出率が高かった。

3) 半数体倍加系統を適温環境条件の制御が十分できない場所で大量に得るためには、オオムギと *H. bulbosum* の交雑を12月~1月に行い、得られた半数体のコルヒチンによる染色体倍加処理は3月上旬までに行う必要があった。

4) 花粉の発芽能力を検定するためにはショ糖:15%、馬鈴薯デンプン:1.0%、CaCl₂:0.1%、H₃BO₃:0.01%、pH:6.0の組成からなる液体培地が適当であった。また、*H. bulbosum* 花粉の経時的発芽能力の低下はビール大麦花粉より緩慢であり、各経過時間での発芽能力も高かった。

第3章 半数体作出におけるビール大麦の品種間差

本章では *bulbosum* 法におけるビール大麦の半数体作出率の品種間差異とその差異の原因を解析した。また、半数体作出率の品種間差異に関する遺伝様式を検討した。

1. 半数体作出率の品種間差と花粉管の伸長および染色体消失過程の関係

bulbosum 法における胚着生率と半数体作出率のオオムギ品種間差については多くの報告がある (Jensen 1976, Pickering and Hayes 1976, Pickering 1980a, 1980b, 1983a, Simpson *et al.* 1980)。さらに、オオムギ品種によっては *H. bulbosum* との交雑に不和合性があり、胚が着生しないために半数体作出率が大きく低下する報告もあるが (Pickering and Hayes 1976, Bjørnstad 1986, Devaux *et al.* 1990)、その原因を Pickering (1981) はオオムギ柱頭上での花粉管伸長の異常であると指摘した。さらに、Pickering (1983c) はこの不和合性は DDT 感受性遺伝子と連鎖した優性の単一遺伝子に支配されているとした。

ここでは、日本のビール大麦品種での品種間差を明らかにするとともに、品種間差の要因を探る目的で *H. bulbosum* との交雑から受精までの花粉管の伸長過程と、受精から胚形成に至る間の染色体消失過程について検討した。

材料および方法

1) ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑における半数体作出率の品種間差

試験は1988年と1989年に行った。Table 3-1に示したビール大麦品種を用い、両年とも1~2月に *H. bulbosum* 系統 Cb2920と交雑した。胚摘出時期は交雑後11~12日、培地は B5 を用いた。その他の交雑方法および培養方法は前章で示した方法に準じた。品種間差は胚着生率 (胚着生数/授粉小花数) と半数体作出率 (半数体数/授粉小花数) で示した。

2) *H. bulbosum* 花粉管の伸長過程

ビール大麦2品種 (関東二条25号および吉系15) と *H. bulbosum* 系統 Cb2920を1991年3月に交雑した。両品種とも授粉6、12および24時間後に各5穂から雌ずいを取り出し、FAA液 (ホルマリン:氷酢酸:エタノール:蒸留水=5:5:50:50容積比) 中で固定した。固定した雌ずいを1N水酸化ナトリウム溶液で軟化させ、0.5%アニリンブルー溶液で染色後、蛍光顕微鏡下で花粉管の伸長程度を観察した。調査した雌ずいの数は1穂当たり20個、各処理について合計100個とし、交雑時期を変えて2反復とした。花粉管の伸長程度は調査した雌ずいのうち花粉管が胚珠まで到達している数で判定した。また、これとは別に各品種あたり8穂に *H. bulbosum* を交雑し、胚着生率と半数体作出率を交雑11日後の材料を用いて調査した。胚培養および半数体の作出法は前章の方法と同じである。

3) *H. bulbosum* 染色体の消失過程

関東二条25号および吉系15を用い、1990年4月に前章と同様の方法で交雑を行った。交雑後3、5、7、9および11日に、肥大した穎果をそれぞれ20個採取した。採取した穎果を0℃の冷水中に24時間置き、さらにエタノール:酢酸=3:1の溶液で固定した後、アセトカーミンで染色した。解剖顕微鏡下で各穎果から染色した胚を摘出後、押しつぶし法によりプレパラートを作成した。各品種8~15個の染色できた胚について、胚あたり3~11個の細胞の染色体数を観察した。交雑後3

日（各15個）と5日（各13個）の材料については、観察した胚を反復として平均染色体数の t 検定を行い、染色体消失程度の品種間差を調べた。

結 果

1) ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑における半数体作出率の品種間差

Table 3-1に2か年におけるビール大麦品種の胚着生率および半数体作出率を示した。1988年はそれぞれ11.1~59.8%および3.4~29.5%，1989年は1.7~72.7%および0.6~26.5%であった。一般的に胚着生率が高い品種は半数体作出率も高かった。また、2か年とも用いた6品種の胚着生率と半数体作出率の値の順位は同じであった。このようにビール大麦品種には胚着生率と半数体作出率に明らかに品種間差が認められ、関東二条25号は他の品種と比較して有意に高い半数体作出率を示した。

Table 3-1. Varietal difference of Japanese two-rowed barleys in crossability with *H. bulbosum*

| Year | Cultiver | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated | |
|------|----------------|---------------------------|---|--|--|--|
| | | | % | | | |
| 1988 | Kanto Nijo 25 | 400 | 59.8 a ¹⁾ | | 29.5 a ¹⁾ | |
| | Nishinochikara | 159 | 48.4 b | | 15.1 b | |
| | Yoshikei 21 | 340 | 22.1 c | | 8.2 c | |
| | Kyushu Nijo 10 | 273 | 23.4 c | | 6.6 c | |
| | Yoshikei 19 | 290 | 18.3 c | | 5.9 c | |
| | Yoshikei 15 | 386 | 11.1 d | | 3.4 d | |
| 1989 | Kanto Nijo 25 | 392 | 72.7 a | | 26.5 a | |
| | Nishinochikara | 149 | 41.6 b | | 17.4 b | |
| | Yoshikei 21 | 190 | 38.4 bc | | 12.6 bc | |
| | Tsuyushirazu | 249 | 29.7 cd | | 12.4 bc | |
| | Nishino Gold | 351 | 20.8 e | | 10.8 bc | |
| | Kyushu Nijo 10 | 105 | 39.0 bc | | 10.5 bc | |
| | Misato Golden | 98 | 27.6 de | | 10.2 bc | |
| | Haruna Nijo | 89 | 19.1 e | | 7.9 cd | |
| | Kyushu Nijo 9 | 528 | 24.8 de | | 5.1 d | |
| | Yoshikei 19 | 206 | 18.4 e | | 3.9 d | |
| | Amagi Nijo | 52 | 5.8 f | | 3.8 d | |
| | Chikukei 7565 | 402 | 1.7 g | | 0.7 e | |
| | Yoshikei 15 | 491 | 7.7 f | | 0.6 e | |

1) Means followed by the same letter (within a column) are not significantly different at $P \leq 0.05$, as determined by Duncan's multiple range test of arcsine-transformed data.

Table 3-2. Pollen tube growth of *H. bulbosum* to the ovules on *H. vulgare* and the embryo formation by crossing with *H. vulgare* and *H. bulbosum*

| Cultivar | | Pollen tube reaching to ovule | | | | No. of florets pollinated | No. of embryo obtained/No. of florets pollinated |
|---------------|-----------------|--------------------------------|------|------|------|---------------------------|--|
| | | Time after pollination (hours) | | | | | |
| | | 6 | 12 | 24 | mean | | |
| | | % | | | | | % |
| Kanto Nijo 25 | A ¹⁾ | 81 | 79 | 79 | 79.7 | 168 | 81.0 |
| | B | 79 | 79 | 78 | 78.7 | | |
| | mean | 80.0 | 79.0 | 78.5 | 79.2 | | |
| Yoshikei 15 | A | 14 | 15 | 14 | 14.3 | 164 | 15.0 |
| | B | 13 | 14 | 15 | 14.0 | | |
| | mean | 13.5 | 14.5 | 14.5 | 14.2 | | |

1) A, B; Replication.

2) *H. bulbosum* 花粉管の伸長の品種間差

Table 3-2にビール大麦2品種に *H. bulbosum* を授粉後、花粉管が胚珠に到達した割合（到達率）と、別に交雑を行って得られた胚着生率を示した。花粉管の到達率については交雑後の経過時間および交雑時期による差はなかったが品種間で関東二条25号が79.2%、吉系15が14.2%（交雑6, 12, 24時間後の平均値）と大きな差がみられた。特に、吉系15では花粉は柱頭上で発芽していたが、多くは雌ずいの途中で伸長が停止し（Fig. 3-1）、胚珠まで到達したものは少なかった。各品種における花粉管の到達率と交雑11日後の胚着生率とはほぼ一致していた。観察による受精の確認はしなかったが、到達率と胚着生率がほぼ一致していたことから、胚珠まで花粉管が到達した穎果（Fig. 3-1）では受精を完了しているものと考えられた。

3) *H. bulbosum* 染色体の消失過程の品種間差

ビール大麦2品種について、*H. bulbosum* で授粉後の胚の染色体数を Table 3-3に示した。胚の染色体数は交雑後の日数が経過するにつれて14本から7本に減少した。染色体の消失は交雑後3日目には始まるが、細胞によっては染色体が全く消失していないものから、すでに半数（7本）になったものまであり、同じ胚の中でも染色体数の異なる細胞が混在していた。平均染色体数は関東二条25号との雑種で12.7本、吉系15の場合13.0

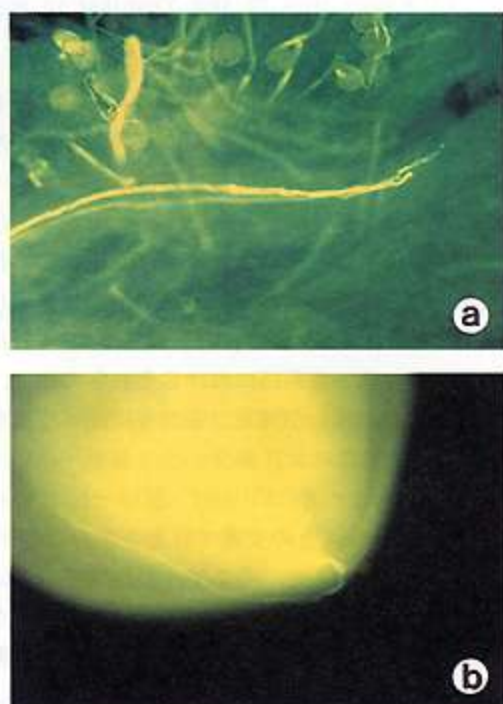


Fig. 3-1. *H. bulbosum* pollen tube elongation, which stopped in the barley stigma (a) and entered into the ovule (b).

Table 3-3. Chromosome elimination process in embryos derived from *H. vulgare* x *H. bulbosum*

| Days after pollination | Cultivar ¹⁾ | Number of embryos scored | Number of cells containing 7 - 14 chromosomes | | | | | | | | Total | Mean chromosome number |
|------------------------|------------------------|--------------------------|---|----|---|----|----|----|----|-----|-------|------------------------|
| | | | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| 3 | Kanto Nijo 25 | 15 | 15 | 2 | 0 | 16 | 2 | 24 | 0 | 117 | 176 | 12.7 |
| | Yoshikei 15 | 15 | 12 | 1 | 0 | 9 | 0 | 13 | 1 | 124 | 160 | 13.0 |
| 5 | Kanto Nijo 25 | 13 | 26 | 10 | 3 | 20 | 1 | 4 | 0 | 15 | 79 | 9.6 |
| | Yoshikei 15 | 13 | 20 | 8 | 0 | 15 | 0 | 11 | 3 | 20 | 77 | 10.4 |
| 7 | Kanto Nijo 25 | 10 | 54 | | | | | | | | 54 | 7.0 |
| | Yoshikei 15 | 10 | 55 | | | | | | | | 55 | 7.0 |
| 9 | Kanto Nijo 25 | 10 | 56 | | | | | | | | 56 | 7.0 |
| | Yoshikei 15 | 10 | 51 | | | | | | | | 51 | 7.0 |
| 11 | Kanto Nijo 25 | 8 | 35 | | | | | | | | 35 | 7.0 |
| | Yoshikei 15 | 8 | 33 | | | | | | | | 33 | 7.0 |

1) Kanto Nijo 25 and Yoshikei 15 are a high and low embryo formation cultivar, respectively.

本であった。交雑後5日では2種の雑種の平均染色体数がそれぞれ9.6本と10.4本となり消失程度が一段と進行した。この時期にも同じ胚の中に14本から7本までの色々な数の染色体をもつ細胞が混在していた。交雑後7日以降になると、すべての胚の染色体数は7本となっており、この時期までに完全な半数性の胚となった。したがって、交雑後3日から7日の間が最も染色体の消失が急激で、交雑後7日以降の染色体数は安定した半数性を示した。交雑3、5日後の平均染色体数で見した場合、染色体の消失程度に品種間差は認められなかった。しかし、胚着生率が高い関東二条25号は染色体数11本以上の細胞の割合が、交雑3日後では81.3%、5日後では25.3%であるのに対して、胚着生率の低い吉系15におけるそれらの値は、それぞれ86.3%、44.2%であり、両時期ともに11本以上の細胞の割合が関東二条25号に比べて高かった。

考 察

H. bulbosum との交雑で胚着生率および半数体作出率に関してビール大麦の品種間差があることが明らかとなった。そこで、品種間差の要因を明らかにするために、胚着生率と半数体作出率が高い関東二条25号と低い吉系15を用いて授粉後の *H. bulbosum* 花粉管の伸長過程と受精後の *H. bulbosum* 染色体の消失過程を検討した。胚着生率が高い品種では花粉管もよく伸長していたが、低い品種では花粉管の伸長は途中で停止していたことから、胚着生率の品種間差は花粉管伸長とその結果の受精率の差によると考えられた。この結果は、Pickering (1981) の報告結果と同様であった。

染色体の消失過程については、胚着生率が高い品種ほど染色体消失が速い傾向にあった。したがって、*H. bulbosum* 染色体の消失が速く進むことにより胚の成長が促進され、健全な胚が多くなり、その結果、半数体植物の分化率も高くなると推察された。Fukuyama (1987) はともに4倍体の *H. bulbosum* と *H. vulgare* の交雑において、交雑後3～5日に最も急速な消失が起こることを

報告している。Subrahmanyam and Kasha (1973) も 2 倍体の *H. vulgare* × *H. bulbosum* において半数性 ($2n=7$) を示す細胞の割合が交雑 5 日後で 37.03%, 7 日後では 68.68%, 11 日後では 93.69% であることを報告している。しかし、いずれの報告とも本研究で得られたような交雑後 7 日での染色体の完全な半減はみられず、7 日以降にわたって不完全な半数性の状態が続くことを示した。さらに、本研究で得られた植物体から無作為に 30 個体を選んで染色体数を観察したところ、それらはすべて半数体であり、また、その他の植物体もすべて半数体に特徴的な形態のみを示した。これに対し、既報の *H. vulgare* と *H. bulbosum* との交雑においては半数体だけでなく、雑種が含まれることが示されている (Kasha and Sadasivaiah 1971, Subrahmanyam and Kasha 1973, Jensen 1976, Pickering 1980b, 1985, Pickering and Morgan 1983)。これらの違いの要因として、今回用いた *H. bulbosum* 系統 Cb2920 は、染色体が完全に消失し、半数体が得られやすい系統であるためと推察された。

以上の結果から、ビール大麦における胚着生率および半数体作出率に品種間差があり、品種間差の要因として、授粉後の花粉管伸長程度の違いに基づく受精率の差および染色体消失の速さの二つが考えられた。

2. 半数体作出率に関する遺伝様式

オオムギと *H. bulbosum* の交雑により半数体を作成する場合に、オオムギ品種のなかに低い胚着生率をもたらす優性の単一遺伝子が存在し、それは DDT 感受性の遺伝子と連鎖しているという報告がある (Pickering 1983c)。しかし、高い胚着生率をもたらす遺伝要因についての報告はない。高い胚着生率に関する遺伝様式が明らかになればそれに関する遺伝子の単離や導入等によって半数体作出率が向上する可能性がある。

そこで、前節で特異的に胚着生率と半数体作出率が高いことが認められた、関東二条 25 号について *H. bulbosum* との和合性の遺伝様式を検討した。

材料および方法

1) F_1 の胚着生率と半数体作出率

試験は 1988 年、1989 年および 1991 年の 3 か年行った。いずれの年も 1 ~ 2 月に Table 3-4 および Table 3-5 に示した F_1 と *H. bulbosum* 系統 Cb2920 を交雑した。交雑方法および培養方法は前節と同様である。組合せあたり交雑した穂数は 1988 年に 51 ~ 89 穂、1989 年に 136 ~ 166 穂、1991 年は 9 穂であった。

2) F_2 の胚着生率

1991 年 1 ~ 2 月に関東二条 25 号 × 九州二条 9 号の F_2 76 個体についてそれぞれ 4 穂ずつを Cb2920 と交雑し、胚着生率および半数体作出率を調査した。交雑方法と培養方法は前節と同様である。

結果および考察

1) F_1 の胚着生率と半数体作出率

1988 年と 1989 年における 3 組合せずつの F_1 の胚着生率および半数体作出率を Table 3-4 に示した。また、それぞれの親の値は Table 3-1 に示した。1991 年の F_1 とその組合せ親の値は Table 3-5 に示した。1988 年の胚着生率は 46.6 ~ 57.3%, 半数体作出率は 14.1 ~ 23.8% であった。1989 年

Table 3-4. Differences of Japanese two-rowed barley F_1 hybrids in crossability with *H. bulbosum* in 1988 and 1989

| Year | Cross combination | No. of florets pollinated | % | |
|------|--------------------------------|-------------------------------|---|--|
| | | | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated |
| 1988 | Kyushu Nijo 10 x Kanto Nijo 25 | 1029 | 57.3 a ¹⁾ | 23.8 a ¹⁾ |
| | Yoshikei 21 x Kanto Nijo 25 | 1537 | 53.0 ab | 21.7 a |
| | Kyushu Nijo 10 x Yoshikei 15 | 1209 | 46.6 b | 14.1 b |
| | Kanto Nijo 25 x Nishino Gold | 3018 | 54.8 a | 23.9 a |
| | 1989 | Kanto Nijo 25 x Kyushu Nijo 9 | 2567 | 49.8 b |
| | Kyushu Nijo 9 x Nishinochikara | 2849 | 34.8 c | 12.1 c |

1) Means followed by the same letter (within a column) are not significantly different at $P < 0.05$, as determined by Duncan's multiple range test of arcsine-transformed data.

は前者は34.8~54.8%, 後者は12.1~23.9%であった。両年とも関東二条25号を片親にもつ組合せでは胚着生率および半数体作出率が関東二条25号に近い値を示した。片親に関東二条25号をもたない組合せについては1989年の九州二条9号×ニシノチカラでは胚着生率および半数体作出率は両親の中間の値を示したが、1988年の九州二条10号×吉系15では両親の値を上回った。1991年はすべての組合せが片親に関東二条25号をもつ組合せを用い、二つの値とも関東二条25号に近い値を示した。したがって、胚着生率および半数体作出率は優性の効果によって発現されることが推察された。

2) F_2 の胚着生率

関東二条25号×九州二条9号の組合せから得られた F_2 76個体の胚着生率の頻度分布をFig. 3-2に示した。胚着生率は30%台と70%台の二つのピークをもつ分布を示した。胚着生率を40%以下と50%以上に分けた場合、1:3の分離比によく適合した。したがって、関東二条25号には高い胚着生率を示す優性の単一遺伝子が存在することが推察された。

これまでオオムギと*H. bulbosum*の交雑による半数体作出において、交雑不和合性に関与する遺伝子の存在は明らかにされているが、本研究においては胚着生率に関与する遺伝子の存在が示された。

Table 3-5. Differences of Japanese two-rowed barley and its F₁ hybrids in crossability with *H. bulbosum* in 1991

| Cultivars and cross combination | No. of florets pollinated | % | |
|---------------------------------|---------------------------|---|--|
| | | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated |
| Kanto Nijo 25 | 190 | 81.6 | 29.5 |
| Yoshikei 21 | 172 | 45.8 | 17.9 |
| Haruna Nijo | 172 | 37.2 | 15.7 |
| Kyushu Nijo 9 | 176 | 35.2 | 10.8 |
| Nishino Gold | 178 | 19.7 | 9.6 |
| Yoshikei 15 | 184 | 13.0 | 4.3 |
| Kanto Nijo 25 x Yoshikei 21 | 186 | 70.4 | 33.3 |
| Kanto Nijo 25 x Haruna Nijo | 194 | 74.7 | 29.4 |
| Kanto Nijo 25 x Kyushu Nijo 9 | 184 | 74.5 | 24.5 |
| Kanto Nijo 25 x Nishino Gold | 184 | 64.7 | 30.4 |
| Kanto Nijo 25 x Yoshikei 15 | 182 | 53.3 | 19.2 |

3. 摘 要

bulbosum 法における胚着生率と半数体作出率のビール大麦の品種間差を調べた。また、それらの品種間差の要因を明らかにするとともに、遺伝様式を検討した。

1) ビール大麦で胚着生率および半数体作出率に品種間差が認められた。また、胚着生率が高い品種ほど半数体作出率も高くなった。

2) 胚着生率の品種間差は授粉後の花粉管伸長程度の違いに基づく受精率の差および染色体消失の速さの二つの要因によると考えられた。

3) 胚着生率と半数体作出率が特に高い関東二条25号には、*H. bulbosum* との胚着生率に関して優性の単一遺伝子が存在することが示された。

4) ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑では雑種は出現せず、すべてオオムギ半数体が得られた。また、交雑7日目までに *H. bulbosum* 染色体は完全に消失していた。

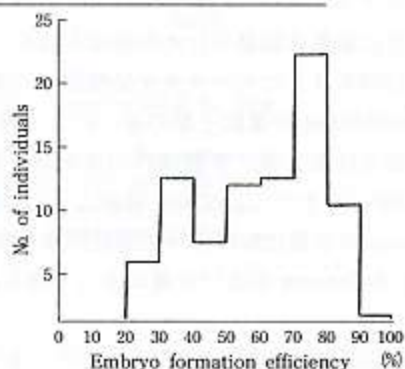


Fig. 3-2. Frequency distribution of embryo formation efficiency in F₂ individuals crossed with *H. bulbosum*.

Note: In case of embryo formation efficiency of F₂ plants divided less than 40% and over 50%, the chi square value for expected 1:3 ratio was 0.12 (0.7 < P < 0.8) and did not deviate significantly from that expected for segregation dominant gene conferring high embryo formation ability.

第4章 半数体作出における *H. bulbosum* の系統間差

bulbosum 法による半数体作出においては、オオムギの品種間差のみでなく *H. bulbosum* にも系統間差があることが予想される。

そこで、本章では半数体作出率をさらに向上させるために、*H. bulbosum* の半数体作出率における系統間差を調べた。さらに、*H. bulbosum* は秋播型と言われてきたが、春化処理を行わなくても開花する春播型系統があるか否かについて検討した。

1. *H. bulbosum* の半数体作出能力の差

半数体作出率に及ぼす *H. bulbosum* の遺伝子型の影響は一部明らかにされている (Pickering and Hayes 1976, Pickering 1980a, 1983b, Simpson *et al.* 1980)。したがって、多くの *H. bulbosum* の遺伝子型について作出率を調べることによって、効率のよい *H. bulbosum* を選抜することができるのではないかと考えた。筆者は1987年6月に農林水産省農林水産ゾーンバンク事業によりモロッコにおいて麦類遺伝資源探索を行い (Damania *et al.* 1987), *H. bulbosum* を収集した。そこで、これらの *H. bulbosum* について半数体作出率および形態形質を調査することにより、作出率が高く栽培面でも利用しやすい遺伝子型を選抜し、半数体育種法の効率化を図ろうとした。

材料および方法

1987年6月にモロッコにおいて収集した *H. bulbosum* 種子の中から30粒を同年11月に1/5000アールのワグネルポットにポット当たり1粒播きした。養成した植物体から無作為に選んだ16系統を1988年6月に染色体観察のための根端を採取すると同時に同じ大きさのポットに移植した。それらの系統は1989年3月にビール大麦品種関東二条25号と交雑し、前章と同様の方法で半数体を作成した。*H. bulbosum* の遺伝子型の違いによる稈長、穂長、1株当たり穂数、花粉生成量、開花まで日数等の形質と胚着生率、半数体作出率を調査した。*H. bulbosum* の比較系統として従来から半数体作出に用いてきた Cb2920 を供試した。胚着生率と半数体作出率については分散分析を行い、Duncan の多重比較によって系統間差を検定した。

H. bulbosum および交雑によって得られた植物体は根端の染色体を観察した。

結 果

染色体数の観察結果から、モロッコ産の *H. bulbosum* はすべて2倍体 ($2n=2x=14$) であった。また、植物体を5℃、8時間日長、8週間の春化処理を行った結果、すべての系統は出穂、開花した。オオムギとの交雑により得られた植物体はすべて染色体数7の半数体であった。

Table 4-1に各系統の形態形質を示した。各形質とも系統間で変異があり稈長は65~127cm、穂長は7.0~10.0cmであった。稈長は比較系統の Cb2920並のものが多かったが、穂長はそれよりやや短かった。1株あたりの穂数は5~16本で系統間差が大きかった。春化処理後、長日条件に移してから開花するまでの日数は35~44日であった。1穂あたりの花粉の生成量にも大きな差があったが、Cb2920と同様に多量の花粉を生成する系統が多かった。

各系統の胚着生率と半数体作出率を Table 4-2に示した。胚着生率は3.7~67.8%、半数体作出

Table 4-1. Morphological characters of *H. bulbosum* clones collected in Morocco

| Clone No. | Length | | Spikes/ plant | Days to ¹⁾ flowering | Pollen ²⁾ producing ability |
|--------------------|--------|-------|------------------|------------------------------------|--|
| | Culm | Spike | | | |
| | cm | | no. | | |
| Hb254- 1 | 110 | 9.0 | 15 | 42 | High |
| Hb254- 2 | 80 | 7.0 | 10 | 40 | Medium |
| Hb254- 5 | 105 | 9.0 | 6 | 40 | High |
| Hb254- 6 | 115 | 10.0 | 10 | 42 | High |
| Hb254- 7 | 105 | 8.0 | 5 | 44 | High |
| Hb254- 8 | 100 | 9.0 | 5 | 44 | Medium |
| Hb254- 9 | 98 | 9.0 | 10 | 41 | Medium |
| Hb254-10 | 65 | 8.0 | 11 | 43 | High |
| Hb254-12 | 118 | 10.0 | 8 | 35 | Medium |
| Hb254-13 | 105 | 10.0 | 16 | 38 | Low |
| Hb254-15 | 108 | 9.0 | 10 | 40 | Medium |
| Hb254-16 | 115 | 10.0 | 11 | 40 | High |
| Hb254-17 | 115 | 10.0 | 15 | 37 | High |
| Hb254-18 | 115 | 9.0 | 9 | 39 | High |
| Hb254-29 | 108 | 8.0 | 10 | 39 | High |
| Hb254-30 | 127 | 10.0 | 9 | 40 | Medium |
| Cb-2920 (Check) | 110 | 10.0 | 10 | 39 | High |

- 1) Number of days to flowering after transferring to the greenhouse.
- 2) Evaluated by observation as High(sufficient for crossing with *H. vulgare* to produce barley haploid) and Medium (though less than high, it could be used for crossing). Low clones could not be used for the *bulbosum* method as the pollen plant.

率は1.2~35.7%であり系統間に有意差が認められた。胚着生率はCb2920より有意に高い系統はなかったが、Hb254-17の半数体作出率はCb2920より有意に高かった。

考 察

モロッコにおいて収集した種子から育成した *H. bulbosum* の形質および半数体作出率は幅広い変異を示した。標準として用いたCb2920は長稈で倒伏しやすく、開花期にはそのために支柱を必要とし、やや扱いにくい系統である。しかし、モロッコ産の系統の中には短稈の系統があり、倒伏対策の上からは都合がよいと考えられた。また、穂数や1穂あたりの花粉生成量が多いことや穂長が長いことは大量の花粉を得ることができるのでオオムギとの交雑に十分な花粉を利用できる利点がある。さらに、高温、長日条件に移してから開花まで日数にも系統間差があったが、日数が短い

Table 4-2. Embryo formation and haploid production from *H. vulgare* crossed with *H. bulbosum* clones collected in Morocco

| Clone No. | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | % | |
|-------------------|---------------------------|---|-----------------------|--|
| | | | | |
| Hb254- 1 | 171 | 49.7 cde ¹⁾ | 26.3 bc ¹⁾ | |
| Hb254- 2 | 61 | 67.2 ab | 19.7 c | |
| Hb254- 5 | 160 | 48.8 cde | 8.8 def | |
| Hb254- 6 | 178 | 37.6 ef | 6.7 def | |
| Hb254- 7 | 81 | 3.7 g | 1.2 g | |
| Hb254- 8 | 82 | 42.7 def | 4.9 f | |
| Hb254- 9 | 111 | 48.6 cde | 18.9 c | |
| Hb254-10 | 88 | 60.2 abcd | 33.0 ab | |
| Hb254-12 | 102 | 52.0 abcde | 5.9 ef | |
| Hb254-13 | 89 | 28.1 f | 11.2 de | |
| Hb254-15 | 149 | 55.0 abcde | 26.8 bc | |
| Hb254-16 | 130 | 41.5 def | 9.2 def | |
| Hb254-17 | 143 | 67.8 a | 35.7 a | |
| Hb254-18 | 117 | 47.9 cde | 12.0 d | |
| Hb254-29 | 98 | 50.0 bcde | 20.4 c | |
| Hb254-30 | 93 | 59.1 abcd | 9.7 def | |
| Cb2920 (Check) | 161 | 64.0 abc | 27.3 bc | |

1) Means followed by the same letter (within a column) are not significantly different at $P \leq 0.05$, as determined by Duncan's multiple range test of arcsine-transformed data.

系統は花粉親として温室を効率的に利用できると考えられた。

オオムギと *H. bulbosum* の交雑においては両親の染色体をもつ雑種が出現することが報告されている (Kasha and Sadasivaiah 1971, Subrahmanyam and Kasha 1973, Jensen 1976, Pickering 1980b, 1985, Pickering and Morgan 1983)。しかし、本研究では雑種の出現はなく、すべてオオムギの半数体であった。供試した *H. bulbosum* 系統のうち Hb254-17はこれまでに半数体育種に用いてきた Cb2920より作出率が有意に高く植物体の養成もしやすい系統であった。また、Hb254-10は Cb2920と同様、作出率は比較的高く、特に短程で取扱性に優れ養成が容易な系統であった。これらの系統を利用することによってオオムギにおける半数体育種法の効率を向上させることができると考えられた。

2. *H. bulbosum* の改良

H. bulbosum は秋播型であるために開花させるには春化处理が必要である (Koller and

Highkin 1960)。前節で用いた *H. bulbosum* も春化処理を行った後に開花させ、花粉親としてビール大麦と交雑したときの半数体作出率を調査した。また、*H. bulbosum* を半数体育種法の手段として利用している他の研究者もすべて春化処理を行い開花させている (Pickering 1980b, Jensen 1976, Sitch and Snape 1986, Devaux 1987, 1988)。春化処理は 5℃、8 時間日長条件下で 8 週間経過させるのが一般的である (Jensen 1974)。また、処理のためには人工気象室が必要であり、処理準備、人工気象室への出し入れ等、操作が煩雑である。したがって、春化処理を必要としない春播型の *H. bulbosum* があれば、花粉を得るまでの操作が簡便化され、効率的である。

オオムギおよびコムギでは春播型と秋播型が分化していることが知られており、オオムギでは春播型の遺伝子が同定され (Takahashi and Yasuda 1956)、また放射線および化学物質処理によって春播型突然変異体を得られている (Ukai 1983)。したがって、*H. bulbosum* にも春播型が存在する可能性があると考えた。

そこで、多数の *H. bulbosum* 系統を調べることにより春播型の *H. bulbosum* の選抜を試みた。また、得られた *H. bulbosum* についてビール大麦と交雑し胚着生率と半数体作出率を調査した。

材料および方法

1987年にモロッコから種子で導入した 2 倍体の *H. bulbosum* 約 30 系統を個体栽培し、1989 年春に集団内で自然交雑させた。得られた約 200 粒の種子は 1990 年 7 月 19 日に直径 12cm のポリポットに 1 粒ずつ播種した。自然条件下で養成した後、まず 93 個体を 11 月 2 日 (Treatment 1) に最低温度が 15℃ 以下にならないように設定した温室に移し 24 時間日長の長日条件で経過させた。12 月 1 日 (Treatment 2) にはさらに 90 個体を同じ条件下の温室に移した。

春化処理なしで開花した *H. bulbosum* については温室に移してから開花するまでの日数を調査した。また、観察により花粉の生成量を高、中、低で判定した。低と判定される系統は半数体作出には不相当であると考えられる。

春化処理なしで開花した *H. bulbosum* 個体はビール大麦 (品種：関東二条 25 号) と交雑し、胚着生率と半数体作出率を調査した。交雑から半数体を得るまでは前章の方法によった。比較系統として、通常半数体育種に利用している *H. bulbosum* 系統 Cb2920 を用いた。Cb2920 は春化処理を行った後、出穂、開花させた。開花した個体は、個体あたり 4 穂、1 穂あたり約 20 小花のオオムギと交雑し、穂を反復として得られた値は角度変換した後、分散分析を行い系統間差を比較した。

結果および考察

供試した 183 個体のうち 23 個体が春化処理なしで開花した。これらの個体は春播型の *H. bulbosum* であると考えられた。他の個体はすべて出穂、開花することなく枯死した。染色体観察による倍数性の調査は行っていないが、2 倍体の集団から得られた個体であることと、形態的な特徴からすべて 2 倍体の *H. bulbosum* であると考えられる。温室条件に移すまで養成した戸外の日平均温度はそれぞれ 17.3℃ (10 月)、13.4℃ (11 月) であった。一般的に冬作物の春化処理には 2～10 週間、0～10℃ の温度条件が適当であるとされ、Trione and Metzger (1970) はオオムギでは 9℃ で 12 日以上処理が最も効果的であり、4℃ 以下および 12℃ 以上では効果が急速に低下することを報告した。したがって、本研究において、*H. bulbosum* 個体を温室に搬入するまでの戸外温度は春化処理には影響していないと考えられた。Table 4-3 に温室に搬入後、開花するまでの日数と花粉生成量を示した。開花まで日数は Treatment 1 が 58～72 日、Treatment 2 が 53～65 日でいずれも変異の幅が大きかった。花粉生成量はいずれも中以上で半数体作出の操作ができないほ

Table 4-3. Days to flowering and pollen producing ability of spring type *H. bulbosum* clones

| Treatment 1 | | | Treatment 2 | | |
|-------------|---------------------------------|--|-------------|-------------------|--------------------------|
| Clone No. | Days to flowering ¹⁾ | Pollen producing ability ²⁾ | Clone No. | Days to flowering | Pollen producing ability |
| 1 | 58 | Medium | 14 | 53 | High |
| 2 | 72 | High | 15 | 53 | Medium |
| 3 | 72 | High | 16 | 55 | High |
| 4 | 69 | Medium | 17 | 59 | Medium |
| 5 | 69 | High | 18 | 60 | Medium |
| 6 | 70 | Medium | 19 | 61 | High |
| 7 | 61 | High | 20 | 61 | High |
| 8 | 68 | High | 21 | 62 | High |
| 9 | 70 | High | 22 | 62 | High |
| 10 | 62 | High | 23 | 65 | High |
| 11 | 64 | High | | | |
| 12 | 69 | High | | | |
| 13 | 69 | High | | | |

- 1) Day to flowering from transferring to greenhouse (Treatment 1: transferred in Nov.2, Treatment 2: transferred in Dec.1). Other clones tested ceased to grow and could not head.
- 2) Evaluated by observation as High (sufficient amount for crossing with *H. vulgare* to produce barley haploid) and Medium (though less than high, it could be used for crossing). Low clones could not be used for the *bulbosum* method as the pollen plant.

どの低い生成量を示す個体はなかった。なお、開花した23個体の中から無作為に選んだ4個体について、球茎から再生させた植物体を最低温度が15℃以下にならない温室条件で養成したところ、いずれも1991年6月20日から7月13日の間に開花した。したがって、これらの個体は春播型であることが再確認できた。これまで、*H. bulbosum* を利用した半数体育種では *H. bulbosum* を開花させるための春化処理は不可欠であった。しかし、本研究において春播型の *H. bulbosum* が選抜されたことにより、開花操作がより単純化されると考えられた。

春播型として選抜された個体のうちビール大麦と開花期が一致し、交雑することができた15個体について胚着生率と半数体作出率を調べた。春播型の *H. bulbosum* と交雑することによって胚とそれから分化した植物体を得ることができた。得られた植物体の染色体は観察しなかったが、形態的に判断してすべて半数体であると考えられた。Table 4-4に胚着生率と半数体作出率を示した。胚着生率は26.3~86.5%、半数体作出率は8.2~41.9%と幅広い変異を示した。Clone16は胚着生率および半数体作出率とも最も高く、特に半数体作出率は比較系統 Cb2920より有意に高かった。本研究において選抜できた系統は半数体作出率が高く、しかも春播型で開花操作を単純化できるので、オオムギ半数体育種の効率化にさらに貢献できると考えられる。

Table 4-4. Mean numbers of embryos/florets pollinated and haploid production efficiency achieved using an array of spring habit *H. bulbosum* clones and *H. vulgare* cultivar Kanto Nijo 25

| Clone No. | No. of florets pollinated | % | |
|-----------|---------------------------|---|--|
| | | No. of embryos obtained/No. of florets pollinated | No. of haploids obtained/No. of florets pollinated |
| 16 | 74 | 86.5 o ¹⁾ | 41.9 o ¹⁾ |
| Cb2920 | 88 | 84.1 no | 27.3 mn |
| 2 | 100 | 83.0 mno | 26.0 lmn |
| 12 | 94 | 79.8 lmno | 17.0 fghi |
| 9 | 90 | 78.9 klmno | 25.6 klm |
| 13 | 88 | 78.4 jklmno | 23.9 jklm |
| 17 | 86 | 73.3 ijklmno | 32.6 n |
| 14 | 70 | 71.4 hijklmn | 22.9 ijklm |
| 15 | 72 | 65.3 ghijkl | 18.1 ghij |
| 23 | 82 | 64.6 fghijkl | 20.7 hijklm |
| 3 | 98 | 44.9 e | 8.2 abcd |
| 21 | 78 | 35.9 de | 10.3 abcde |
| 22 | 76 | 32.9 cde | 13.2 defg |
| 18 | 80 | 28.8 bcd | 12.5 cdefg |
| 20 | 80 | 28.8 abcd | 13.8 efg |
| 19 | 76 | 26.3 abcd | 11.8 bcdef |

1) Means followed by the same letter (within a column) are not significantly different at $P \leq 0.05$, as determined by Duncan's multiple range test of arcsine-transformed data.

3. 摘 要

bulbosum 法の効率化を図るために、*H. bulbosum* 系統について半数体作出率の系統間差を調べるとともに *H. bulbosum* 系統の改良を行った。

1) モロッコにおける遺伝資源探索により得られた *H. bulbosum* の中から花粉の生成量が多く、取扱が容易で、半数体作出率が高い系統を選抜した。

2) *H. bulbosum* の交雑後代系統から春播型の *H. bulbosum* 系統を選抜した。さらに、これらの系統の胚着生率、半数体作出率および花粉生成量等を調べた結果、これまで用いていた系統より半数体作出率が高い系統が見いだされた。

第5章 *H. bulbosum* 以外の植物を利用した半数体の作出法

本章では、オオムギにおける半数体育種法の適用範囲を広げる目的で、*H. bulbosum* 以外の植物の花粉を利用して半数体を作成することが可能であるかどうかを検討した。また、その場合の交雑手法や培養条件についても検討を行った。なお、本章の研究結果は1989年12月から1990年3月まで農林水産省依頼研究員として滞在した農業生物資源研究所で得られたものである。

1. オオムギ×トウモロコシによるオオムギ半数体の作出

近年、コムギとトウモロコシ (*Zea mays* L.) の属間交雑によってコムギ半数体を作成できることが報告された (Laurie and Bennett 1986, 1987, 1988, 1989, Suenaga and Nakajima 1989, Inagaki and Tahir 1990)。さらに、エンバク×トウモロコシによるエンバク半数体の作出 (Rines and Dahleen 1990) やコムギ×テオシントによるコムギ半数体の作出 (Ushiyama *et al.* 1991) が報告された。しかし、オオムギにおいてはトウモロコシを利用した半数体作出例の報告はない (Chen *et al.* 1991 がトウモロコシとの交雑でオオムギ半数体を得ているが筆者が本研究を行った時点では報告はなかった)。そこで、オオムギとトウモロコシの交雑からオオムギ半数体を作成できるかどうかを検討した。また、授粉後のホルモン剤2,4-D処理についてはKruse (1974) がオオムギを含む属間交雑で、Inagaki (1986) がコムギ×*H. bulbosum* で着粒率を向上させるのに有効であると報告している。Suenaga and Nakajima (1989) はコムギ×トウモロコシでトウモロコシ花粉を授粉後2,4-Dをコムギの節間に注入することによって半数体作出率が向上することを報告している。そこで、オオムギ×トウモロコシにおける2,4-D処理効果についてもあわせて検討した。

材料および方法

1) 試験材料の養成

Table 5-2 に示したビール大麦14品種をポリポットに播種した後、4週間、10~20℃、10時間日長の温室で経過させた。その後、23℃、16時間日長に制御された温室内に移動し、試験が終了するまで同条件下で経過させた。花粉親としてのトウモロコシFi 雑種 (B14×CI64) も同条件下で養成した。

2) 交雑および培養方法

オオムギとトウモロコシを交雑後、直ちに穂首節間に0.3~0.5mlの2,4-D溶液を注射器を用いて注入した。本試験においては授粉後切り穂することなく、オオムギの養成と同じ条件下で胚の摘出 (交雑10~11日後) まで経過させた。除雄方法、授粉後のGA₃処理方法、培地、培養方法および得られた植物体の養成方法は *bulbosum* 法で用いた方法と同じである。

3) 胚着生に及ぼす2,4-D濃度の影響

ビール大麦として筑系7565, 吉系21, 九州二条9号および関東二条25号を用いた。2,4-D濃度を無処理, 25, 50, 75および100ppmの5段階設定し、胚着生に及ぼす影響を検討した。処理は授粉直後にオオムギの穂首節間に0.3~0.5mlの溶液を注射器で注入することによって行った。

4) オオムギ柱頭上でのトウモロコシ花粉の発芽と得られた植物体の染色体観察

オオムギ柱頭上でのトウモロコシ花粉の発芽を観察するために交雑9時間後のオオムギ柱頭をFAA溶液で固定し、アニリンブルーで染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。また、交雑により得られた胚を培養して分化した植物の根端を採取し、前章と同様に前処理と固定を行った後、アセトカーミンで染色し、染色体数を観察した。

結果および考察

1) オオムギ×トウモロコシからの半数体の作出

オオムギとトウモロコシの交雑においてトウモロコシ花粉は柱頭上で発芽していた (Fig. 5-1)。そして、交雑10~11日後に胚を抽出し、培養することによって植物体を得た。その中から無作為に10個体を選抜しその染色体数を観察したところ、すべて染色体数は7であった。したがって、オオムギとトウモロコシを交雑して得た植物体はオオムギ半数体であると考えられる。また、染色体を観察しなかった植物体もその形態的な特徴からオオムギの半数体であると考えられた。Laurie and Bennett (1986, 1987) はコムギとトウモロコシの交雑においては *H. bulbosum* と同じように、トウモロコシの染色体が消失してコムギ半数体を得たと報告している。本研究におけるオオムギとトウモロコシの場合も同様の機作により半数体を得られたと考えられる。

2) オオムギ×トウモロコシによる半数体の作出における2,4-Dの効果

Table 5-1 に交雑直後の2,4-D処理濃度の違いによる胚着生率と半数体作出率を示した。肥大した粒すべてが胚を含むとは限らなかったため、2,4-Dの効果は結実率ではなく、胚着生率および半数体作出率で評価した。ビール大麦4品種を用いてオオムギ×トウモロコシにおける最も効果的な2,4-D濃度を調査した。2,4-Dの処理を行わない場合はいずれの品種とも交雑後、粒は肥大せず、また胚も分化しなかった (Fig. 5-2)。胚着生率および半数体作出率は2,4-Dの濃度に影響を受け、用いた4品種においていずれも75ppmが最も効果的で、25, 50および100ppmでは胚着生率および半数体作出率が低かった。

3) オオムギ×トウモロコシによる半数体の作出におけるビール大麦の品種間差

Table 5-2 にオオムギ×トウモロコシにおける胚着生率および半数体作出率のビール大麦品種間差を示した。供試した14品種のうち9品種から胚が、また7品種から半数体を得られた。胚着生率および半数体作出率はそれぞれ0.0~19.6%、0.0~6.9%と品種間差があった。筑系7565は供試したオオムギのなかで最も高い胚着生率 (15.7%) および半数体作出率 (6.9%) を示した。なお、この筑系7565は *H. bulbosum* との交雑においては低い胚着生率 (1.7%) と半数体作出率 (0.7%) を示した品種であった (Table 3-1)。 *H. bulbosum* との交雑において高い交雑率を示した関東二条25号はトウモロコシとの交雑では胚着生率および半数体作出率とも1.0%と低かった。

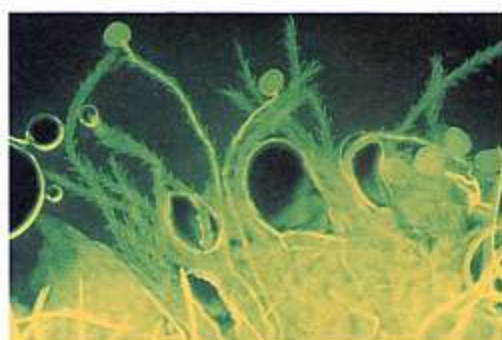


Fig. 5-1. Pollen tube elongation of maize on the barley stigma.

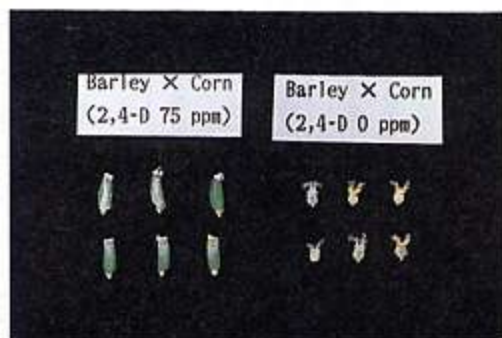


Fig. 5-2. Effect of 2,4-D treatments on barley embryo development after pollination with maize.

Table 5-1. Effect of 2,4-D treatment on embryo formation and haploid production in a cross of barley x maize

| Concentration of 2,4-D (ppm) | barley cultivar | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Chikukei 7565 | | | Yoshikei 21 | | | Kyushu Nijo 9 | | | Kanto Nijo 25 | | |
| | No. of florets pollinated | E/P ²⁾ % | H/P ³⁾ % | No. of florets pollinated | E/P ²⁾ % | H/P ³⁾ % | No. of florets pollinated | E/P ²⁾ % | H/P ³⁾ % | No. of florets pollinated | E/P ²⁾ % | H/P ³⁾ % |
| Non | 70 | 0 | 0 | 119 | 0 | 0 | 126 | 0 | 0 | 102 | 0 | 0 |
| 25 | 80 | 3.8 | 1.3 | 56 | 0 | 0 | 54 | 1.9 | 0 | 59 | 1.7 | 0 |
| 50 | 60 | 5.0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 53 | 5.7 | 0 | 66 | 0 | 0 |
| 75 | 204 | 15.7 | 6.9 | 104 | 2.9 | 2.9 | 101 | 7.9 | 3.0 | 104 | 1.0 | 1.0 |
| 100 | 129 | 3.1 | 2.3 | 54 | 0 | 0 | 62 | 4.8 | 0 | 54 | 0 | 0 |

1) 2,4-D was injected into the stem immediately after pollination.

2) No. of embryos obtained/No. of florets pollinated.

3) No. of haploids obtained/No. of florets pollinated.

Table 5-2. Varietal difference in embryo formation and haploid production through barley x maize crosses

| Cultivar | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained | No. of haploids obtained |
|----------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Chikukei 7565 | 204 | 32 (15.7) ¹⁾ | 14 (6.9) ²⁾ |
| Yoshikei 15 | 64 | 6 (9.4) | 1 (1.6) |
| Yoshikei 19 | 88 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Yoshikei 21 | 104 | 3 (2.9) | 3 (2.9) |
| Yoshikei 28 | 42 | 1 (2.4) | 0 (0.0) |
| Kyushu Nijo 9 | 101 | 8 (7.9) | 3 (3.0) |
| Kyushu Nijo 10 | 74 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Nishino Gold | 122 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Kanto Nijo 25 | 104 | 1 (1.0) | 1 (1.0) |
| Misato Golden | 117 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Amagi Nijo | 93 | 1 (1.1) | 0 (0.0) |
| Haruna Nijo | 56 | 11 (19.6) | 2 (3.6) |
| Tsuyushirazu | 127 | 3 (2.4) | 3 (2.4) |
| Nishinochikara | 119 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

1) Figures in parentheses indicate the percentage of embryo formation (No. of embryos obtained/No. of florets pollinated).

2) Figures in parentheses indicate the percentage of haploid production (No. of haploids obtained/No. of florets pollinated).

以上のようにオオムギとトウモロコシの交雑から75ppmの2,4-Dを処理することによって半数体を得られることおよび半数体作出率に品種間差があることを初めて明らかにすることができた。また、得られた植物体はすべて半数体で雑種植物は出現しなかった。なお、オオムギ×トウモロコシによる半数体作出法は *bulbosum* 法と比較して作出率が低いこと、2,4-D処理の操作が加わること等の欠点はあるが、トウモロコシは種子繁殖性で生育が旺盛であり、温度条件の設定によって比較的容易に大量の花粉が得られ、オオムギの生育に合わせて周期的に半数体作出操作ができる等の利点が考えられる。

2. オオムギ×イタリアンライグラスによるオオムギ半数体の作出

オオムギとイネ科牧草 (*Agropyron repens*, *Alopecurus agrestis*, *Lolium perenne*, *Pennisetum americanum*) との交雑において球状胚を得た報告がある (Zenkeler and Nitzsche 1984)。しかし、これらの交雑からオオムギ半数体を作成した報告はない。ここでは、イネ科の牧草のなかで、種子繁殖性で開花期に葯が抽出し花粉が得られやすいイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) との交雑による半数体の作出法を検討した。

材料および方法

オオムギ品種として筑系7565, 吉系15および関東二条25号を用いた。イタリアンライグラス (品

種：ワセアオバ）は20株を農林水産省草地試験場の中嶋紘一育種素材研究室長より分譲していただいた。1989年12月26日に株毎に1/5000アールのワグネルポットに移植し、最低温度約25℃の温室で活着させた後、23℃、16時間日長の人工気象室で開花まで養成した。交雑方法、ホルモン処理、培養方法等はすべてオオムギ×トウモロコシの場合に用いた方法と同じであった。

結果および考察

イタリアンライグラス花粉はオオムギ柱頭上で発芽していた。交雑10～11日後には胚が得られ、培養によって植物体を得ることができた。また、得られたすべての植物体の染色体数は7であり、オオムギ半数体であった。なお、胚着生および半数体作出にはトウモロコシの場合と同じように交雑直後に75ppmの2,4-Dを処理する必要があるが、無処理の場合は子房は萎縮し、生長しなかった。

Table 5-3にオオムギ3品種の胚着生率および半数体作出率を示した。3品種のうち2品種から胚が得られ、1品種から半数体を得ることができた。オオムギ×トウモロコシの場合と同様に筑系7565は胚着生率が16.7%、半数体作出率は10.4%と高かった。関東二条25号との交雑では低い割合で胚は着生したが、半数体を得ることはできなかった。このようにイタリアンライグラスとの交雑においても半数体が得られることをここで初めて明らかにした。なお、オオムギとイタリアンライグラスとの交雑により半数体が得られる機作は、*H. bulbosum* やトウモロコシの場合と同様にイタリアンライグラス染色体の受精後の選択的な消失によると考えられる。本研究においてもトウモロコシの場合と同様にオオムギとの雑種は出現しなかった。また、2,4-D処理操作は必要であるが、イタリアンライグラスも種子繁殖性であるため、播種時期を変えることにより、周年、花粉を採取できるので半数体作出時期の拡大が可能であると考えられる。さらに、*bulbosum* 法で半数体作出率が低いオオムギ品種でもトウモロコシまたはイタリアンライグラスとの交雑では作出率を向上させることも考えられる。したがって、半数体作出法の一つとして十分利用可能であると思われる。

Table 5-3. Varietal difference in embryo formation and haploid production through barley x Italian ryegrass crosses

| Cultivar | No. of florets pollinated | No. of embryos obtained | No. of haploids obtained |
|---------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Chikukei 7565 | 336 | 56 (16.7) ¹⁾ | 35 (10.4) ²⁾ |
| Yoshikei 15 | 84 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Kanto Nijo 25 | 126 | 5 (4.0) | 0 (0.0) |

1), 2) See notes of Table 5-2.

3. 摘 要

H. bulbosum 以外の植物の花粉を利用して半数体を作成する方法を検討した。

1) オオムギとトウモロコシの交雑からオオムギ半数体を作成した。また、この場合交雑直後に75ppmの2,4-Dを穂首節間に処理する必要がある。

2) イタリアンライグラスの花粉を利用してもオオムギ半数体を得られた。なお、2,4-D処理

がトウモロコシの場合と同様に必要であった。

3) *bulbosum* 法では低い作出率を示すオオムギ品種でもトウモロコシおよびイタリアンライグラスとの交雑では作出率が改善されることも考えられるので、属間交雑と *bulbosum* 法を適宜使い分けることによって、半数体育種の適用範囲を拡大し、効率をさらに高めることが可能と考えられた。

第6章 半数体利用による品種育成

これまでに、*bulbosum*法での効率的な培養方法、交雑方法、オオムギ品種間差や*H. bulbosum*系統間差などを明らかにした。

そこで、本章ではこれらの知見をもとにして*bulbosum*法により新品种の育成を行った。また、半数体育種法の効率化を図るために、半数体段階での病害抵抗性の選抜方法を検討した。

1. 半数体における選抜

半数体を利用した育種法の利点は固定系統を短時間で獲得できることである。その後は、通常の育種法と同様に、特性検定や生産力検定を行い品種が育成されるのであるが、特性検定を半数体段階で行うことができれば半数体育種法の効率がさらに高まる。これまでに、大麦縞萎縮病を薬培養由来の植物体で検定した報告はある(Foroughi-Wehr and Friedt 1984)。しかし、*H. bulbosum*利用により得られた半数体で大麦縞萎縮病やうどんこ病に対する抵抗性個体を選抜した報告はない。また、近年大麦縞萎縮病については木石港3由来の抵抗性遺伝子 Ym は第3染色体の長腕部にあるエステラーゼ遺伝子ブロック(*Est 1-Est 2-Est 4*)と組換え価2.45%で連鎖しており、エステラーゼアイソザイムのバンドパターンを調べることにより抵抗性個体を選抜できることが報告された(小西・松浦 1987, Konishi *et al.* 1989, Konishi and Kaiser 1991)。この方法を半数体段階で利用できればさらに効果的な選抜が可能となると考えられた。

そこで、半数体育種法の効率化を図るために、半数体段階でビール大麦の重要病害であるうどんこ病と大麦縞萎縮病に対する抵抗性個体の選抜法を検討した。

材料および方法

1) うどんこ病に対する選抜

うどんこ病に対する選抜は1988年と1989年に Table 6-1 に示したビール大麦 F_1 から得られた半数体を用いて行った。関東二条25号、吉系15およびニシノチカラがうどんこ病抵抗性品種で、吉系21、九州二条9号、九州二条10号およびニシノゴールドは感受性品種である。胚摘出から約7週間後(ポリポットに移植してから約3週間後)の生育ステージの半数体個体を用いた。温室内で自然発病させうどんこ病胞子(判別品種による判定結果から菌系はレースIXであった)を採集し、半数体に散布して人工接種した。菌接種後は発病に適する条件である15℃以上の温度を保った。約1~2週間後に発病の程度を判定した。さらに、半数体を染色体倍加したのち次代系統を試験圃場に播種し、自然条件で発病させ倍加系統での抵抗性検定も行った。また、関東二条25号およびニシノチカラのうどんこ病抵抗性の遺伝様式を明らかにするために、1989年の組合せからの F_2 世代でうどんこ病抵抗性の分離を調査した。

2) 大麦縞萎縮病に対する選抜

1991年に半数体の作出、半数体でのエステラーゼアイソザイム分析および半数体倍加系統の作出を行った。また、1992年には大麦縞萎縮病汚染圃場で半数体倍加系統の発病程度を検定した。半数体はTable 6-3 に示した3組合せのオオムギ F_1 から作出した。関東二条25号と九州二条9号は木石港3由来の抵抗性遺伝子(Ym)を、吉系15ははがねむぎ由来の抵抗性遺伝子($ym3$)をもっている。3組合せとも片親には大麦縞萎縮病に感受性であるはるな二条を用いた。胚摘出後6~7

週間養成した半数体の上位から2番目の葉の粗抽出液を試料としてでんぷんゲル電気泳動を行い、エステラーゼアイソザイムの遺伝子型を判定した。エステラーゼアイソザイムの電気泳動については Hvid and Nielsen (1977) の方法に準じ、九州大学農学部付属遺伝子資源研究センターで行った。供試したすべての半数体は分析後に染色体倍加を行った。得られた半数体倍加系統は、農林水産省農業研究センター内の汚染圃場（大麦縞萎縮病ウイルス系統はI型である）に播種して発病程度を検定した。

うどんこ病および大麦縞萎縮病の抵抗性、感受性の分離比は χ^2 法により検定した。

結果および考察

1) うどんこ病に対する選抜

Table 6-1 に半数体段階で検定した、うどんこ病抵抗性と感受性の分離を示した。うどんこ病はこれまでに胞子をオオムギ幼苗に接種することによって抵抗性選抜が可能とされてきた (Hiura 1960) が、半数体段階でもうどんこ病は発病し、抵抗性と感受性の個体を判別することができた。抵抗性と感受性の分離はうどんこ病抵抗性親の吉系15およびニシノチカラを片親とするオオムギF₁からの半数体では理論分離比1:1によく適合していた。しかし、抵抗性親として関東二条25号を用いたオオムギF₁からの半数体では分離が抵抗性の方へ偏っていた。第3章において関東二条25号が他の品種と比較して半数体作出率が特異的に高く、関東二条25号には半数体作出に関与する単一遺伝子が存在することを示した。その遺伝子がうどんこ病抵抗性の遺伝子と連鎖している可能性が考えられる。なお、関東二条25号およびニシノチカラを片親にもつF₂世代での抵抗性と感受性

Table 6-1. Segregations of powdery mildew resistant and susceptible plants in haploids obtained from Japanese two-rowed barley F₁ hybrids crossed with *H. bulbosum*

| Year | Cross combination | Number of haploids | | | χ^2 (1:1) | Probability |
|------|---|--------------------|-------------|-------|-------------------|-------------|
| | | Resistant | Susceptible | Total | | |
| 1988 | Kyushu Nijo 10 x Kanto Nijo 25 ¹⁾ | 69 | 52 | 121 | 2.39 | 0.2 - 0.1 |
| | Yoshikei 21 x Kanto Nijo 25 ¹⁾ | 173 | 133 | 306 | 5.23 | 0.05 > |
| | Kyushu Nijo 10 x Yoshikei 15 ¹⁾ | 113 | 100 | 213 | 0.79 | 0.5 - 0.3 |
| 1989 | Kanto Nijo 25 ¹⁾ x Nishino Gold | 331 | 175 | 506 | 48.09 | 0.001 > |
| | Kanto Nijo 25 ¹⁾ x Kyushu Nijo 9 | 199 | 126 | 325 | 16.40 | 0.001 > |
| | Kyushu Nijo 9 x Nishinochikara ¹⁾ | 84 | 88 | 172 | 0.093 | 0.8 - 0.7 |

1) Powdery mildew resistant cultivar.

の分離は3 : 1であったことから両品種のうどんこ病抵抗性は単一の優性遺伝子により支配されていると考えられた (Table 6-2)。

また、半数体段階で判定した半数体から得られた半数体倍加系統の圃場での発病判定結果は半数体の場合と同じであった。したがって、うどんこ病は半数体段階で効果的に選抜できると考えられた。

Table 6-2. Segregations of powdery mildew resistant and susceptible F₂ plants from crosses between resistant and susceptible cultivars

| Cross combination | Number of F ₂ plants | | | χ ² (3 : 1) | Probability |
|---|---------------------------------|-------------|-------|---------------------------|-------------|
| | Resistant | Susceptible | Total | | |
| Kanto Nijo 25 ¹⁾ x Nishino Gold | 61 | 21 | 82 | 0.016 | 0.9 - 0.8 |
| Kanto Nijo 25 ¹⁾ x Kyushu Nijo 9 | 66 | 19 | 85 | 0.318 | 0.7 - 0.5 |
| Kyushu Nijo 9 x Nishinochikara ¹⁾ | 74 | 26 | 100 | 0.053 | 0.9 - 0.8 |

1) Powdery mildew resistant cultivar.

2) 大麦縮萎病に対する選抜

半数体段階で電気泳動を行った結果、エステラーゼアイソザイムの遺伝子型 (*Est 1-Est 2-Est 4*) はそれぞれの遺伝子座の複対立遺伝子の組合せからなる *Ca-null-Nz* および *Pr-Fr-Su* の2つの型に分類できた (Fig. 6-1)。前者は木石港3由来の大麦縮萎病抵抗性遺伝子 *Ym* をもつ九州二

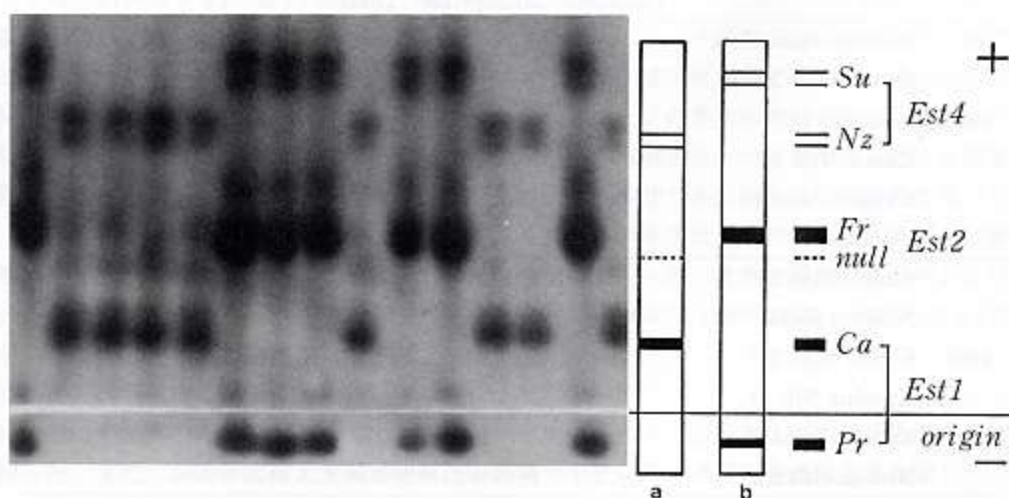


Fig. 6-1. Photograph and diagram of the esterase isozyme zymograms of barley haploids. a : *Ca-null-Nz*, b : *Pr-Fr-Su*

Table 6-3. Segregation of esterase isozyme genotypes in haploid plants

| Cross combination | No. of haploids | Genotype | | χ^2 (1 : 1) | Probability |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------------|-------------|
| | | <i>Ca-null-Nz</i> | <i>Pr-Fr-Su</i> | | |
| Haruna Nijo x Kanto Nijo 25 | 120 | 54 | 66 | 1.20 | 0.30 - 0.20 |
| Kyushu Nijo 9 x Haruna Nijo | 142 | 74 | 68 | 0.25 | 0.70 - 0.50 |
| Yoshikei 15 x Haruna Nijo | 144 | 0 | 144 | - | - |

Note : Haruna Nijo and Yoshikei 15 : (*Pr-Fr-Su*), Kanto Nijo 25 and Kyushu Nijo 9 : (*Ca-null-Nz*).

Table 6-4. Reactions of doubled haploids to Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) in infested field

| Cross combination | Esterase isozyme genotype | No. of doubled haploids | Reaction to BaYMV in infested field | | χ^2 (1 : 1) | Probability |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | | | resistance | susceptible | | |
| Haruna Nijo x Kanto Nijo 25 | <i>Ca-null-Nz</i> | 31 | 31 | 0 | 3.28 | 0.05-0.10 |
| | <i>Pr-Fr-Su</i> | 47 | 0 | 47 | | |
| Total | | 78 | 31 | 47 | | |
| Kyushu Nijo 9 x Haruna Nijo | <i>Ca-null-Nz</i> | 25 | 25 | 0 | 0.0 | 0.90 < |
| | <i>Pr-Fr-Su</i> | 25 | 0 | 25 | | |
| Total | | 50 | 25 | 25 | | |
| Yoshikei 15 x Haruna Nijo | <i>Ca-null-Nz</i> | 0 | - | - | 0.07 | 0.75-0.90 |
| | <i>Pr-Fr-Su</i> | 54 | 26 | 28 | | |
| Total | | 54 | 26 | 28 | | |

Note : Haruna Nijo (*Pr-Fr-Su*): susceptible, Yoshikei 15 (*Pr-Fr-Su*): resistant by *ym3* gene. Kanto Nijo 25 and Kyushu Nijo 9 (*Ca-null-Nz*): resistant by *Ym* gene.

条9号および関東二条25号, 後者は感受性のはるな二条と同じ遺伝子型であった。なお, はがねむぎ由来の抵抗性遺伝子 *ym3* をもつ吉系15は後者の遺伝子型を示した。九州二条9号および関東二条25号を片親にもつF₁からの半数体において, *Ca-null-Nz* および *Pr-Fr-Su* の分離は半数体段階で示す理論分離比1:1に高い確率で適合していた (Table 6-3)。吉系15×はるな二条のF₁からの半数体はすべて *Pr-Fr-Su* を示し, *ym3* の抵抗性をもつ個体の判別は不可能であった。

エステラーゼアイソザイムの分析に供試した半数体から得られた半数体倍加個体を大麦萎縮病汚染圃場に播種し発病を検定したところ, 半数体段階で *Ca-null-Nz* を示した半数体倍加系統はすべて抵抗性, *Pr-Fr-Su* を示した系統はすべて感受性であり, エステラーゼアイソザイムの遺伝子

型による選抜結果と完全に一致していた (Table 6-4)。小西・松浦 (1987), Konishi *et al.* (1989) および Konishi and Kaiser (1991) は木石港 3 由来の抵抗性遺伝子 (*Ym*) はエステラーゼ遺伝子ブロック (*Est 1-Est 2-Est 4*) と強く連鎖しているため、エステラーゼアイソザイムのバンドパターンから抵抗性個体を選抜できることを報告しているが、同様の方法を半数体に適用しても大麦縞萎縮病抵抗性の選抜が可能であることが明らかとなった。なお、*ym 3* 抵抗性遺伝子については特定のエステラーゼアイソザイム遺伝子型との連鎖がまだ認められていないことから本方法での選抜はできなかった。エステラーゼアイソザイム分析はオオムギ遺伝資源の地理的分化 (Konishi and Matsuura 1991) やオオムギの受精競争遺伝子分析 (Konishi *et al.* 1992) に精力的に利用されている。したがって、*Ym* 以外の遺伝子との連鎖関係が明らかにされ、選抜に利用できるようになる可能性がある。

以上の結果から、半数体段階でうどんこ病および大麦縞萎縮病 (*Ym*) の選抜は可能であり、染色体倍加処理の前に抵抗性個体を選抜することによって半数体育種法の一層の効率化が図れることを明らかにした。なお、ここで選抜した抵抗性はいずれも優性あるいは不完全優性遺伝子支配の形質であったが、うどんこ病の *ml-o* や大麦縞萎縮病の *ym 3* などの劣性抵抗性遺伝子も存在するのでそれらについても半数体選抜ができれば、交雑育種法での選抜と比較してさらに選抜効率が向上すると考えられる。さらに、優性および劣性遺伝子の作用が 1:1 の分離比で直接発現する半数体植物においては並渦性や播性 (特に 3 種類の春播型遺伝子が単独で作用している場合) など目的とする形質をもった個体を半数体段階で選抜する技術を開発することも品種育成のみならず実験系統を作出する上で重要であると考えられる。

2. 半数体由来ビール大麦品種の育成

育種年限を短縮することを目的として *bulbosum* 法を実際の育種事業の中に組み込んでビール大麦新品種の育成を試みた。これまでに *bulbosum* 法を利用して育成された品種は、飼料用オオムギとしてカナダの 'Mingo' (Ho and Jones 1980), 'Rodeo' (Campbell *et al.* 1984), ニュージーランドの 'Gwylan' (Coles 1986) がある。また、ビール大麦ではイギリスの 'Doublet' (Jones *et al.* 1985), 'Pipkin' (Jones *et al.* 1986) がある。Reinbergs *et al.* (1978), Friedt and Foroughi-Wehr (1983), Powell *et al.* (1986) はビール大麦を含む半数体倍加系統を用いて交雑育種法との手法の比較および交雑育種法で育成した品種との農業特性の比較を行っているが、有望系統の育成を行うまでには至っていない。また、国内でもオオムギ育種に半数体育種法を適用した新品種育成や半数体倍加系統の圃場試験についての報告は未だない。そこで、前章までに明らかにした方法で半数体を得た後、その染色体倍加固定系統について栽培特性や収量等の農業形質と麦芽品質を調査し、有望系統の選抜を行った。さらに、選抜した系統を地域適応性検定試験に供試し、ビール大麦新品種の育成を試みた。

材料および方法

ビール大麦として九州二条 10 号 × 関東二条 25 号と吉系 19 × 関東二条 25 号の 2 組合せの F_1 を用いた。母の九州二条 10 号と吉系 19 は栽培特性に優れているが麦芽品質が中程度、一方、父の関東二条 25 号は麦芽品質が良く、うどんこ病抵抗性を有するが、栽培特性がやや劣る系統であった。また、これらの系統はすべて大麦縞萎縮病に対し抵抗性である。前章と同様の方法により半数体を作成し、半数体倍加個体を得た。半数体の作出から圃場試験までの過程を Fig. 6-2 に示した。1988 年 6 月

に2組合せからそれぞれ111個体と98個体の半数体倍加個体を得た。各組合せからの半数体倍加個体には前者にDH 1、後者にDH 2の組合せ番号を付けた。同年秋の播種までに種子増殖を温室内で行い、一定量以上の種子を確保できたDH 1の78系統とDH 2の65系統を各系統の種子量に応じて播種面積(0.5~2.8㎡)を設定し、1988年度(播種年度)の圃場試験および選抜を1反復で行った。1989年度の圃場試験は各組合せから選抜した各々28系統を播種面積7.0㎡、1反復で行った。標準品種としてニシノゴールドを供試した。1990年度に過去2か年の結果から4系統を選抜し、これらの地域適応性をみるためにビール大麦育成系統合同比較試験(佐々木 1990)に参加している栃木県農業試験場栃木分場(栃木県栃木市)とビール各社の試験地(キリンビール(株):栃木県喜連川町, サッポロビール(株):群馬県新田町, アサヒビール(株):滋賀県野洲町およびサントリー(株):栃木県岡本町)に配付し収量, 千粒重等を検討した。各試験地の播種面積はそれぞれ4.8~9.6㎡でいずれも2反復, 標準品種はあまぎ二条であった。同時に福岡県農業総合試験場で播種面積7.5㎡, 2反復で, 標準品種にあまぎ二条, 比較品種としてニシノゴールドを用い圃場試験を行った。なお, 1990年度の福岡での稈長, 穂長, 穂数, 倒伏程度, 子実重, 千粒重(2.5mm以上の粒), 整粒歩合(2.5mm以上の粒の割合)および整粒重(子実重×整粒歩合)の各形質について分散分析を行い標準品種と比較した。さらに, うどんこ病は1988年に半数体が得られた段階で病菌を人工接種して抵抗性検定を行い, 1988年度以降は圃場試験を行いながら自然発病させ検定した。大麦萎縮病は

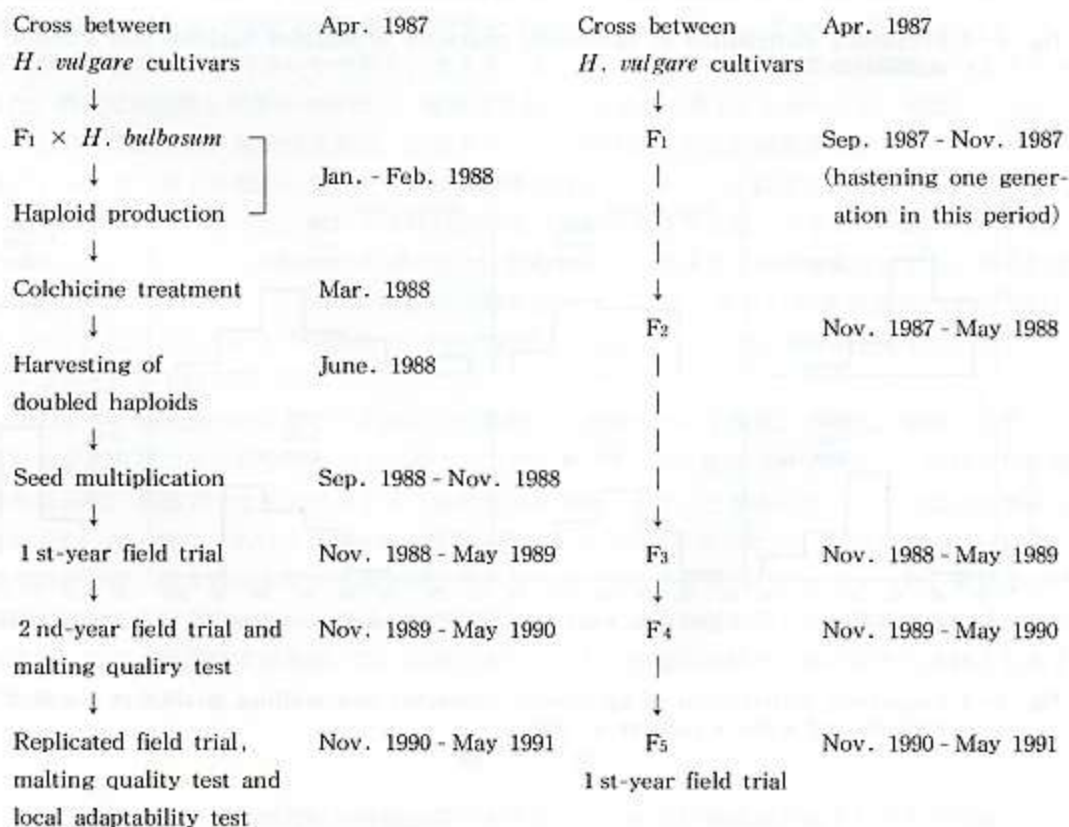


Fig. 6-2. Scheme for the production and evaluation of doubled haploids (left) and comparison to the conventional pedigree method employed in Fukuoka Agric. Res. Cent. (right).

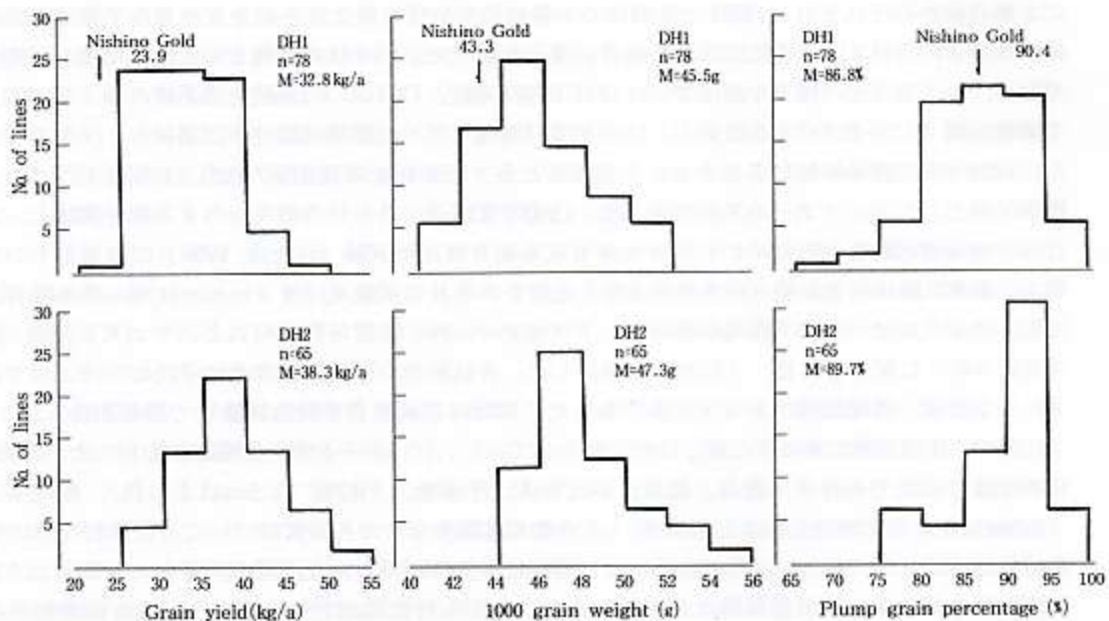


Fig. 6-3. Frequency distribution of agronomic character of doubled haploids and a check cultivar in 1988.

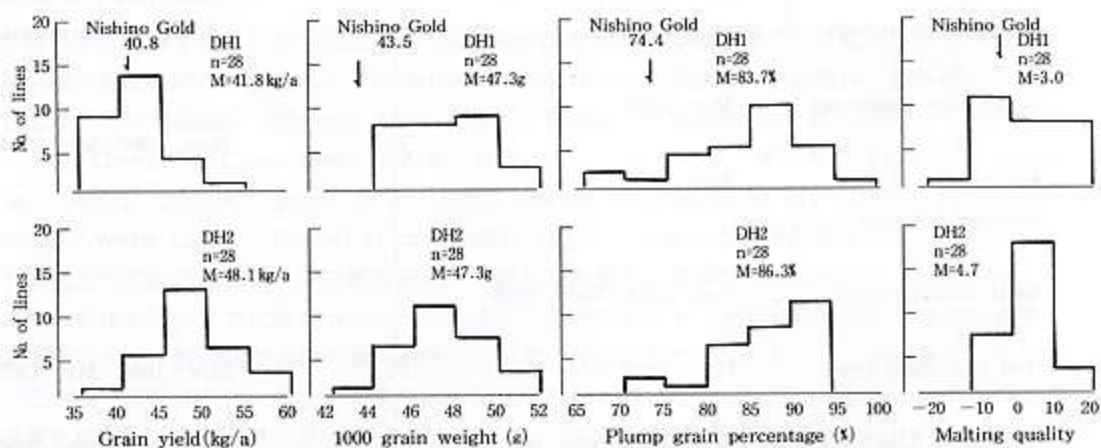


Fig. 6-4. Frequency distribution of agronomic character and malting quality of doubled haploids and a check cultivar in 1989.

1988年度以降に圃場試験に供試した系統を同病汚染圃場に同時に播種し、抵抗性を検定した。麦芽品質は1988年度は60g製麦とし、DH1から63系統、DH2から37系統、1989年度は250g製麦とし、DH1から25系統、DH2から22系統について、ニシノゴールドを標準品種として栃木県農業試験場栃木分場に分析を依頼した。

結 果

1988年度におけるDH1およびDH2の子実重、千粒重および整粒歩合の頻度分布をFig. 6-3に示した。各組合せともに子実重と千粒重の平均値は標準品種より大きかった。整粒歩合の平均は標準品種より小さかったが80%以上の高い値を示す系統が多かった。いずれの形質も系統間での変異が大きかった。稈長、倒伏程度、成熟期、千粒重、整粒歩合およびうどんこ病抵抗性をもとに各組合せからそれぞれ28の優れた系統を選抜した。それらの系統の1989年度における子実重、千粒重、整粒歩合および麦芽品質（1988年度材料）の頻度分布をFig. 6-4に示した。各組合せともにいずれの形質も平均値は標準品種より大きかった。麦芽品質の評点はニシノゴールドに比較して高い評点を示す系統が多かった。1988年度および1989年度の圃場試験と麦芽品質分析の結果から、地域適応性検定試験に供試する系統として、千粒重と整粒歩合が高く、多収で、麦芽品質もニシノゴールド並かより優れた4系統（DH1由来の吉系30, 31, DH2由来の吉系32, 33, Fig. 6-5）を選抜した。いずれの系統ともうどんこ病と大麦縞萎縮病に抵抗性を示した。吉系30, 31, 32, 33の1989年度と1990年度の福岡での圃場試験結果をTable 6-5に示した。2か年の結果を総合すると、成熟期はあまぎ二条と同等かやや早く、あまぎ二条とニシノゴールドの中間の熟期をもつと考えられた。稈長は両品種と同等かやや短く、穂長は吉系31があまぎ二条並に長かったが、他はニシノゴールドと同等であった。穂数は吉系32, 33が多かった。倒伏は吉系31が微程度であったがいずれの系統ともあまぎ二条より強かった。子実重は両標準品種より大きく、千粒重は1990年度の吉系30を除き標準品種より大きかった。整粒歩合は1990年度の吉系31が標準品種と同等であったが他の系統はいずれも高かった。ビール大麦生産者の収入に最も大きな影響を及ぼす整粒重はいずれも標準品種を上回っていた。また、これら4系統の1988年度および1989年度材料の麦芽品質の値をTable 6-6に示した。2か年の分析の結果、いずれの系統とも品質はよく、高い麦芽品質をもつニシノゴールド並かそれを上回っていた。

1990年度に地域適応性をみるため供試した系統の各試験地での子実重、千粒重、整粒歩合および整粒重をあまぎ二条に対する比率で比較した（Fig. 6-6）。子実重についてみると、試験地では滋賀県野洲町、系統では吉系30があまぎ二条を下回る成績を示すことがあったが、その他はいずれも多収であった。特に吉系31は各試験地で標準品種以上の子実重を示した。千粒重は栃木県喜連川町、群馬県新田町、栃木県岡本町で吉系30が小さかったが、他の系統は同じか大きかった。整粒歩合は喜連川町で4系統とも小さかったが、他の試験地では同じか高い値を示した。整粒重は喜連川町で吉系30, 31が、野洲町で吉系30, 32, 33が小さかったものの他の試験地ではいずれの系統ともあまぎ二条より大きかった。

考 察

近年、ビール大麦では被害粒や外観品質の劣化により生産契約達成率が低下し大きな問題となっている。その問題の根本的な解決策としては緊急に優良な形質をもつ新品種の育成が望まれるところである。そこで、育種年限を短縮する半数体育種法の一つである *bulbosum* 法のビール大麦育種への適用を図るとともに本法によって育成された系統の農業形質、麦芽品質および地域適応性につ

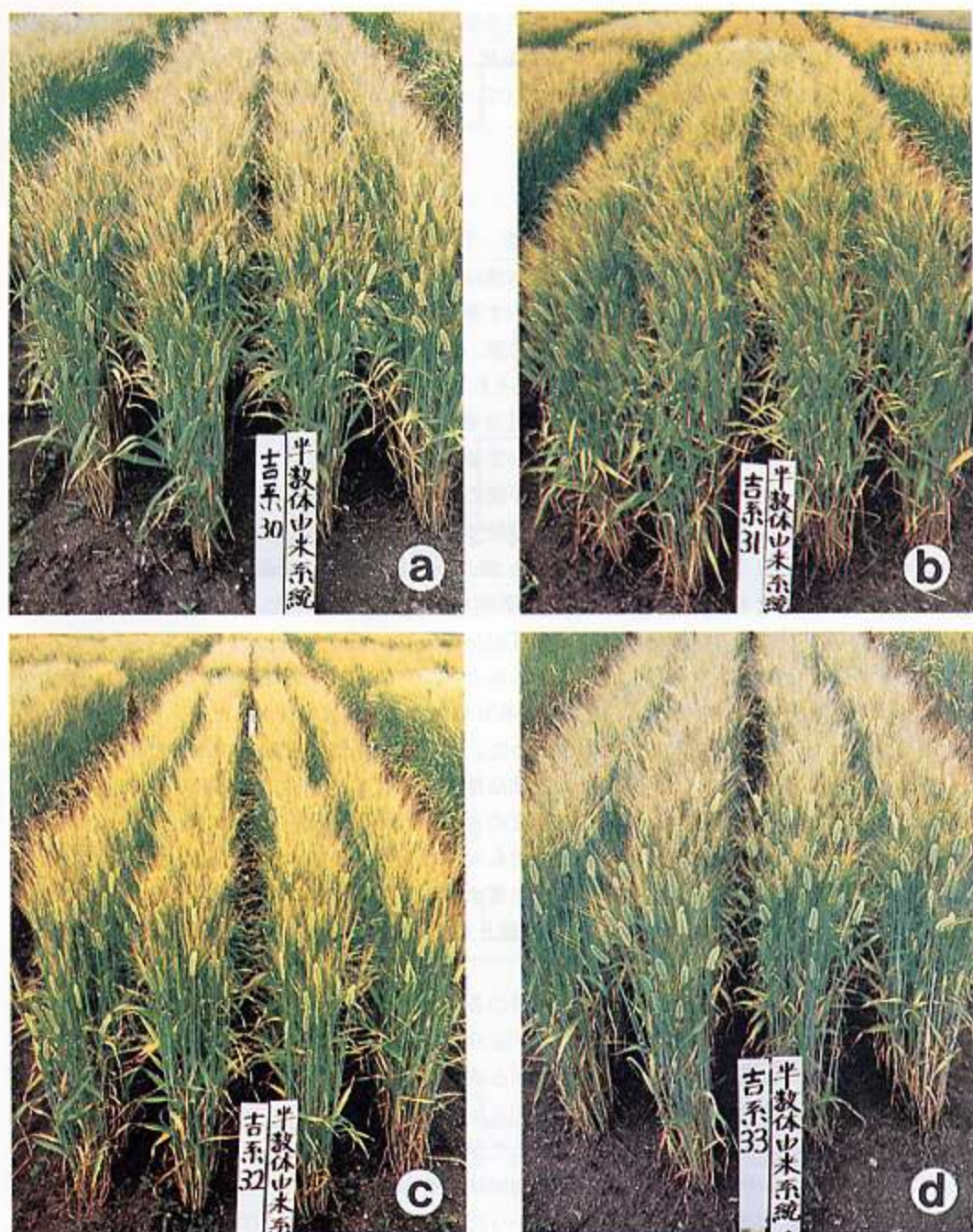


Fig. 6-5. The elite doubled haploid lines obtained from barley haploid breeding with favorable agronomic performance and malting quality.
 (a : Yoshikei 30, b : Yoshikei 31, c : Yoshikei 32, d : Yoshikei 33)

Table 6-5. Agronomic performance of elite doubled haploid lines (Yoshikei 30, 31, 32 and 33) and check cultivars

| Year | Cultivar | Culm length (cm) | No. of spikes / m ² | Lodg-ing ¹⁾ | Grain yield (kg/a) | 1000 grain weight (g) | Plump | |
|-------------------------|-------------|------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|
| | | | | | | | grain (%) | grain yield (kg/a) |
| 1989 | Yoshikei 30 | 83.2 | 414 | 0 | 41.9(103) ²⁾ | 45.1 | 88.3 | 37.0(122) ³⁾ |
| | Yoshikei 31 | 93.8 | 551 | 1.0 | 50.5(124) | 48.7 | 88.5 | 44.7(147) |
| | Yoshikei 32 | 90.0 | 533 | 0 | 48.8(120) | 46.7 | 83.8 | 40.9(135) |
| | Yoshikei 33 | 87.2 | 529 | 0 | 53.0(130) | 47.2 | 85.2 | 45.2(149) |
| Nishino Gold | | 93.4 | 492 | 0 | 40.8(100) | 43.5 | 74.4 | 30.4(100) |
| 1990 | Yoshikei 30 | 83.5 * | 539ns | 0 ** | 50.0(106)ns | 42.3ns | 82.3 * | 41.1(119) ** |
| | Yoshikei 31 | 87.5ns | 529ns | 0.5 * | 53.7(115) ** | 46.2 ** | 78.5ns | 42.2(122) ** |
| | Yoshikei 32 | 84.5 * | 619 ** | 0 ** | 53.5(114) ** | 44.9 ** | 84.5 ** | 45.2(131) ** |
| | Yoshikei 33 | 84.0 * | 620 ** | 0.3 ** | 52.6(112) * | 46.2 ** | 81.5 * | 42.8(124) ** |
| Nishino Gold | | 89.0ns | 534ns | 1.0 ns | 42.0(90) * | 42.7ns | 78.3ns | 32.9(95)ns |
| Amagi Nijo | | 88.0 - | 517 - | 1.5 - | 46.9(100) - | 43.0 - | 73.6 - | 34.5(100) - |
| LSD(0.05) ³⁾ | | 3.1 | 61 | 0.8 | 4.1 | 1.0 | 6.3 | 3.5 |
| (0.01) | | 4.7 | 93 | 1.2 | 6.2 | 1.4 | 9.6 | 5.4 |

1) Lodging evaluated by observed values as 0:none, 1:1-10%, 2:10-30%, 3:30-50%, 4:50-70%, 5:70-100% lodging per plot.

2) Figures in parentheses indicate the percentage comparing to the check cultivar.

3) ANOVA was performed for the test in 1990. * and ** show that the differences from the check cultivar 'Amagi Nijo' are significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

All doubled haploid lines were resistant to Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) and Powdery mildew.

Table 6-6. Malting quality of elite doubled haploid lines (Yoshikei 30, 31, 32 and 33) and check cultivars¹⁾

| Year | Cultivar | Malt extract (%) | Kolbach index (%) | Diastatic power (° WK) | Examination marks |
|------|--------------|------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|
| 1988 | Yoshikei 30 | 85.0 | 55.3 | 194 | 74.0(15.7) ²⁾ |
| | Nishino Gold | 84.6 | 46.5 | 161 | 58.3 |
| | Yoshikei 31 | 84.9 | 62.6 | 192 | 79.7(0.0) |
| | Nishino Gold | 86.1 | 60.4 | 204 | 79.7 |
| | Yoshikei 32 | 85.4 | 52.0 | 201 | 69.9(7.9) |
| | Yoshikei 33 | 84.2 | 56.1 | 201 | 75.3(13.3) |
| | Nishino Gold | 84.1 | 44.7 | 237 | 62.0 |
| | Yoshikei 30 | 85.1 | 48.8 | 219 | 66.5(1.0) |
| | Yoshikei 31 | 82.7 | 50.6 | 222 | 64.7(-0.8) |
| | Amagi Nijo | 81.6 | 51.6 | 256 | 61.3(-4.2) |
| 1989 | Nishino Gold | 83.6 | 47.5 | 238 | 65.5 |
| | Yoshikei 32 | 83.4 | 48.3 | 209 | 63.0(6.5) |
| | Yoshikei 33 | 82.7 | 52.2 | 224 | 68.3(11.8) |
| | Amagi Nijo | 81.3 | 48.2 | 226 | 54.3(-2.2) |
| | Nishino Gold | 82.5 | 45.5 | 218 | 56.5 |

1) Malting quality was tested at Tochigi Branch, Tochigi Agric. Exp. Station.

2) Figures in parentheses indicate the differences in examination marks from the check cultivar 'Nishino Gold'.

いて検討した。本研究の結果、*bulbosum* 法によるオオムギ半数体育種法により短期間の内に、また通常の育種事業の中に組み込んで有望系統を育成することができた。半数体倍加系統を作出するにあたっては、栽培特性と麦芽品質がよく、複合病害抵抗性をもつ系統の育成を目的とした。そこで、栽培特性は優れているが麦芽品質が中程度の系統と麦芽品質は優れているが栽培特性がやや劣る系統の組合せの F₁ を半数体育種に使用し、所期の目標にかなった系統を選抜できた。本研究で得られた植物体は、染色体の観察結果から半数体倍加系統であった。通常の変異育種法によると純系を得るためには自殖に多くの世代を要する。しかし、本法では半数体の染色体倍加によって純系が一代で得られ、ビール大麦において *bulbosum* 法は実用的な育種技術として確立できたと考えられる。また、2 組合せの F₁ から得られた半数体倍加系統の農業形質はいずれも系統間での変異が大きく、その中から優良な形質をもつ系統を選抜できた。したがって、ビール大麦においてはオオムギ F₁ から半数体を作成し、遺伝的組換えを固定する本法は実用的に十分利用できると思われる。さらに、ビール大麦の交配から地域適応性検定試験に供試する系統を決定するまでに 3 か年を要したが、これは通常の系統育種法における F₂ から F₄ の間の世代を省略することにより育種年

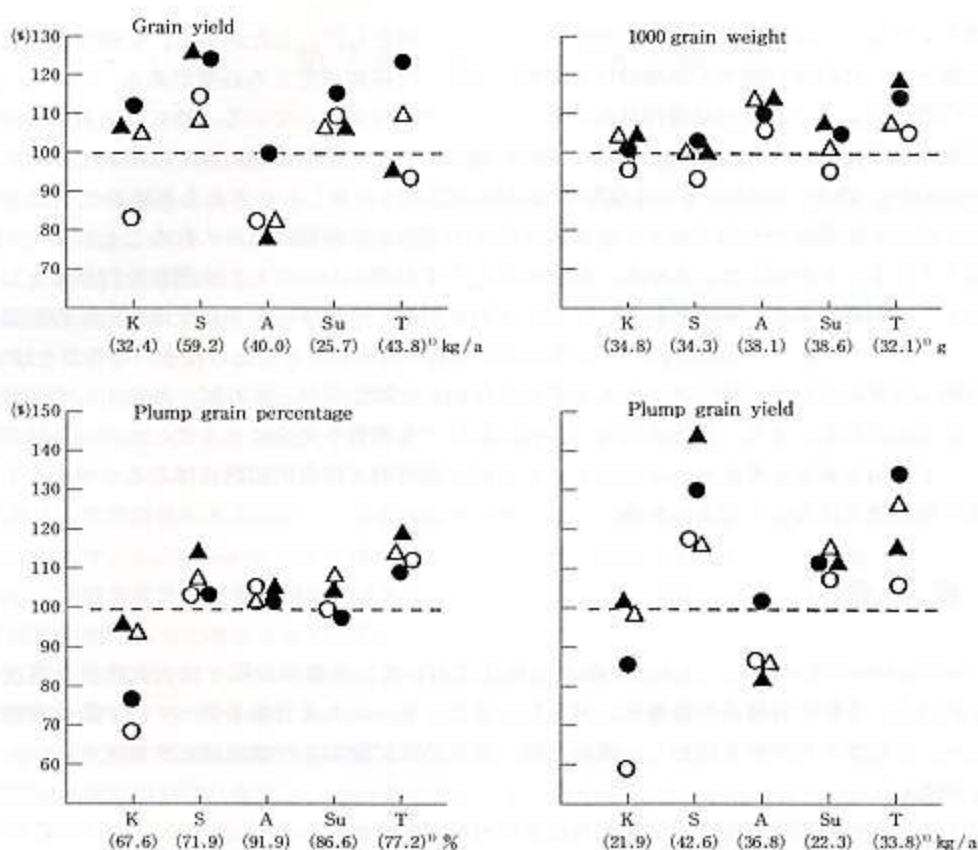


Fig. 6-6. Agronomic performance of four elite doubled haploid lines (○: Yoshikei 30, ●: Yoshikei 31, △: Yoshikei 32, ▲: Yoshikei 33) compared to the check cultivar 'Amagi Nijo' at 5 experiment stations (K: Kitsuregawa, S: Nitta, A: Yasu, Su: Okamoto, T: Tochigi) in 1990.

1) Figures in parentheses indicate the value of four agronomic traits of 'Amagi Nijo' at each experiment station.

眼を約2年短縮でき、半数体育種法の利点を生かすことができた。また、本研究で得られた有望系統は農業形質、麦芽品質とも標準品種を上回っていた。このようにビール大麦品種育成において、半数体育種法は育種年限を短縮し、有望系統を育成することができた。

なお、半数体および半数体倍加系統を作出するためには培養が必要不可欠である。そのために、無菌条件や人工的な生育環境などの設備、培地や染色体倍加のための薬品類等の経済的要因と半数体倍加系統を得るまでに必要な時間や操作上の熟練度等の技術的要因が問題点として挙げられる。さらに、ビール大麦の場合は後期世代での合同比較試験や現地試験での評価に年月がかかるのが実情であり、初期世代での育種年限短縮の効果はあまり大きくないことも考えられる。しかし、1年でも早く新品種を普及させるためには、現在のところ *bulbosum* 法が最も効果的であり、育種事業の中で利用できると思われる。

また、ここで半数体を倍加した完全なホモ系統が品種として必要であるかについて考察したい。まず、交雑育種法で育成された品種は普及に移される時点では雑種第10世代以降であるのが一般的であり、すべての形質が固定しているとは限らない。Jain and Allard (1960) によると、オオム

ギではF₁₈でもヘテロ個体がかかなりの頻度で存在すると報告した。したがって、交雑育種法においては品種となった時点以降でも品種特性を維持するような採種法をとる必要がある。しかし、採種圃場での選抜によって本来の品種特性から離れていく危険性をもっている。特に不可視的な形質である収量や品質については、望ましくない方向に偏っていても圃場観察のみでは排除できず、より危険性が高い。酒井(1954a, b)は交配育成品種は混系性が著しいと考えられるので育種家の手を離れた後の二次選抜が有効であり、生産力に関する選抜を原種圃に組み入れることによって採種法を改善することを提案した。しかし、収量のみならず品質についても二次選抜を行うことは実際問題としては困難であると考えられる。一方、半数体由来の染色体倍加系統ではすべての形質が固定されているはずであり、採種においても常に固定系統が得られると考えられる。このことはまた、交雑育種法で育成された品種であっても半数体を経由した固定系統とすれば、採種上の問題は解決できると考えられる。また、遺伝分析等の研究においても形質を完全にホモ化した固定系統は実験材料として有用であると考えられる。以上のように、経済的、技術的問題点はあるものの、半数体育種法の利用価値は高いと考えられる。

3. 摘 要

H. bulbosum を用いたビール大麦半数体育種法において、半数体段階で病害抵抗性を選抜する手法を検討し、半数体育種法の効率化を図った。また、ビール大麦育種事業の中に半数体育種法を組み込み、半数体倍加系統を作出し、圃場試験、麦芽品質試験および地域適応性検定を行い、有望系統を育成した。

- 1) うどんこ病は半数体段階で選抜することが可能であった。
- 2) 大麦萎縮病に対して抵抗性遺伝子 (*Ym*) をもった個体は、半数体段階でのでんぷんゲル電気泳動によるエステラーゼアイソザイム分析によって選抜することが可能であった。
- 3) 2組合せのオオムギF₁ から209系統の半数体由来の固定系統を作出し、その中から4系統の地域適応性試験に供試する有望系統を交配から3か年という短期間のうちに選抜することができた。
- 4) これら4系統は収量性や生育特性等の農業形質が標準品種のあまぎ二条より優れ、うどんこ病および大麦萎縮病に抵抗性であった。また、麦芽品質がニシノゴールド並かより優れ、地域適応性も高かった。

第7章 総合考察

作物の品種育成は交配後、毎世代遺伝的な固定を図りながら選抜を進めて行かなければならないために多くの年限を必要とする。しかし、より短い期間で新品種を育成するために世代促進育種法の開発が行われ、イネやムギ類の普通作物では広く用いられている。一方、培養技術の発展に伴って多くの作物で半数体植物が得られるようになり、半数体の染色体を倍加することによって、極めて短時間で遺伝的に固定した系統が作出できる半数体育種法が開発され、新しい育種法として種々の作物で利用されるようになった。

半数体作出法のうち薬培養によって半数体を作成する薬培養法はタバコ(中田・田中 1968)、イネ(Niizeki and Oono 1968)、コムギ(Ouyang *et al.* 1973)、オオムギ(Clapham 1971, 1973)等、多くの作物で利用されてきた。薬培養法では1小花から大量の花粉を利用できるが葉緑素変異体や異常個体が多く出現し、正常な緑色植物体を得る確率が低いことが大きな問題点である。これに対して、*bulbosum*法では交雑に用いた小花の数に制約はあるものの、半数体作出率は比較的高く、葉緑素変異体や異常個体もほとんど出現しないので、現在のところ本法が半数体育種法としては効率的であると考えられている。

そこで、本研究ではビール大麦の品種育成において*bulbosum*法により作出した半数体を利用した育種法を確立するため、*H. bulbosum*との交雑親和性、半数体の作出法、半数体作出効率の向上、病害抵抗性に関する半数体選抜法を明らかにした。さらに、本法を利用して染色体倍加ビール大麦固定系統を短期間に育成し、その農業特性、麦芽品質および地域適応性について検討した。

オオムギの*H. bulbosum*との交雑親和性については、オオムギの品種間で差異のあることが多く報告されている(Jensen 1976, Pickering and Hayes 1976, Pickering 1980a, b, 1983a, Simpson *et al.* 1980, Bjørnstad 1986, Devaux *et al.* 1990)。Pickering (1983c)は交雑親和性の極めて低い性質は優性の単一遺伝子によって支配されていると報告している。一方、本研究では、半数体作出率が特異的に高い品種の交雑親和性は優性の単一遺伝子により支配されていることが明らかになった。今後、この遺伝子は半数体作出率を向上させる遺伝資源として利用できると考えられる。なお、半数体作出率についてのオオムギ品種間差の要因として、交雑後*H. bulbosum*花粉管が柱頭から胚珠まで伸長する程度の差が大きく影響し、作出率が高い品種はほとんど胚珠まで花粉管が到達するが、低い品種では柱頭内で伸長が停止すること、さらに、受精後の染色体の消失の速さが異なり、高い品種ほど消失するスピードが速いことを明らかにすることができた。

一方、*H. bulbosum*系統の違いによる半数体作出率の差異も明らかにした。これまでに*H. bulbosum*の違いによって作出率に差があることが一部報告されている(Pickering and Hayes 1976, Pickering 1980a, 1983b, Simpson *et al.* 1980)。本研究では、モロッコから導入した多くの系統を用いて半数体作出率を調べたところ、極めて高い系統が選抜できた。また、春播型で、半数体作出率が高い*H. bulbosum*系統も選抜することができた。そのため春化処理を行うことなく出穂し、花粉が得られる系統を選抜できた。このことは、半数体作出までの操作を簡略化でき、半数体育種法の効率化には、*H. bulbosum*側からの改良もまた重要であることを明らかにすることができた。

*bulbosum*法においては、オオムギとの交雑後に胚を人工培養する必要がある。培養のために胚を摘出する時期はこれまでの報告によると研究者の間で異なり、最適な胚摘出時期を特定することが必要であったが、交雑後11~12日が摘出適期であることを明らかにすることができた。また、胚

摘出後の培地条件は半数体植物を得るための重要な要因となるので胚培養に適した培地の選定が必要である。胚培養のための培地を2種類(B5, R-M-IS)検討したが両者とも半数体作出率は高く、効率的な培地であった。環境条件を厳密に制御できない場合に半数体倍加系統を大量に作出するためには、コルヒチン処理後の生育条件がオオムギの圃場栽培環境に近いことが望ましいと考えられる。そこで、本試験場の無加温のガラス室で半数体倍加個体を大量に得るための処理適期を検討したところ、3月上旬までにコルヒチン処理を行うことが重要であった。また、この時期までに処理を終えるには12月～1月に *H. bulbosum* と交雑し、半数体を得ておくことが必要であった。

さらに、交雑時期の制約を回避するために、*H. bulbosum* の花粉を貯蔵できれば効果的である。そこで、人工培地上での *H. bulbosum* 花粉の発芽能力の経時的変化を調べたところ、オオムギより活力の低下が緩やかであった。このことは花粉の発芽能力を長く維持できることが考えられ、花粉貯蔵の可能性がオオムギより高いことを示唆した。貯蔵した花粉を利用していつでも半数体が作出できれば *bulbosum* 法をより効率的に運用できるようになる。

本研究では、*H. bulbosum* 以外の植物の花粉を用いたオオムギ半数体作出法も試みた。花粉親として用いたトウモロコシおよびイタリアンライグラスは他家受精植物であり、花粉の生成量も多い植物であった。いずれの花粉を用いても胚が着生し、それを培養することによって半数体植物が分化することを初めて明らかにした。その機作は *H. bulbosum* との交雑と同様にトウモロコシおよびイタリアンライグラス染色体の特異的消失によるものであると考えられた。また、*bulbosum* 法では半数体作出率が低い品種でもトウモロコシおよびイタリアンライグラスとの交雑では作出率が向上した。このように新しい半数体の作出法を開発し、半数体作出に用いるオオムギの品種によって交雑する花粉を適宜かえたり、任意の時期に花粉を利用することにより半数体の作出を効率化し、半数体育種法の適用範囲を広げることができるようになった。

半数体育種法を実際の新品種育成に利用するためには、半数体での有用形質の選抜法の確立も重要であると考えられる。ここでは半数体段階で選抜する形質としてビール大麦の重要病害であるうどんこ病と大麦縞萎縮病について検討した。うどんこ病菌を染色体倍加前の半数体植物に接種することによって、抵抗性個体を選抜することができた。また、大麦縞萎縮病については、幼苗の葉の粗抽出液のでんぷんゲル電気泳動によるエステラーゼアイソザイム分析によって抵抗性個体の選抜が可能であった。半数体段階で両病害の抵抗性に関する選抜が可能となったことにより染色体倍加にあたっては抵抗性を示す半数体のみを処理すればよいことになり半数体育種法がさらに効率的になった。なお、ここで選抜した抵抗性はいずれも優性あるいは不完全優性遺伝子支配の形質であったが、うどんこ病の *ml-o* や大麦縞萎縮病の *ym3* などの劣性抵抗性遺伝子も存在するのでそれらについても半数体選抜ができれば交雑育種法での選抜と比較してさらに選抜効率が向上すると考えられる。

このように培養条件、品種間差、*H. bulbosum* の改良と総合的に半数体育種法を改良した上で、それらの知見をもとに実際のビール大麦育種事業に組み込んで209系統の半数体倍加系統を得た。そこで、これらについて3か年の圃場試験および2か年の麦芽品質分析を行った結果、うどんこ病と大麦縞萎縮病に複合抵抗性で農業形質および麦芽品質ともに優れた四つの有望系統を育成することができた。さらに、育成した4系統は国内5か所のビール大麦育種試験地に配付し、その特性を評価したところ、広域地域適応性を持っていることがわかった。このように、半数体育種法を利用することによって従来から行われてきた系統育種法よりも育種年限を約2年短縮し、優良個体を育成できることが明らかとなった。短期間で品種育成技術は、例えば各種の病害において病原菌レースの分化による抵抗性の崩壊で、新たな抵抗性品種が緊急に必要な場合やその他の予期しな

い育種目標ができた場合の対応手段として特に利用価値が高くなると思われる。

なお、自殖性作物では多くの世代にわたる自殖によって育成された純系といえども厳密に言えば十分ではない。Jain and Allard (1960)によると、オオムギでは F_{18} でもヘテロ個体かなりの頻度で存在するという。これらは固定困難な形質であることが考えられる。しかし、半数体を利用することによってこれらの形質の固定をも図ることができる。また、一般の採種事業においては分離個体の出現により品種の維持に問題が生じる場合が考えられるが、品種を育成した後にそれを半数体を経由した固定品種とすれば遺伝的分離の問題がなくなり、採種事業にとっての利点も大きいと考えられる。さらに、収量や品質等の形質が採種事業の過程で本来の特性から離れていく危険性を回避できる利点もある。

問題点としては、半数体作出から半数体倍加個体の養成までに無菌環境や培養のための人工気象室、また種々の薬品類、さらには作出操作に技術的な習熟が必要なこと等が挙げられる。しかも、本法で育種年限を短縮できるのは交雑育種法の場合の分離初期世代であり、固定した後の地域適応性試験や奨励品種決定試験に要する期間は同じである。しかし、半数体倍加系統に対する選抜はすべての遺伝子座について固定化した系統が対象となる。したがって、収量や品質などポリジーンによって支配される形質の選抜においても交雑育種法による系統がもつであろう程度のヘテロ性を考慮する必要がない。さらに、半数体段階での特性検定の実施や得られた半数体倍加個体の効率的な種子増殖によって、初期世代の短縮とはいえ1年でも早い品種の育成が可能となるので、育種的に十分効果的な年限短縮法であると言えよう。

また、半数体育種の効果を優良遺伝子型の選抜効率の面から見た場合、組換えが1回だけの F_1 を材料にして固定化するより、特定の形質を選抜できる F_2 で固定化の方が効率的であると推論した報告がある(Choo 1981, Snape and Simpson 1981)。しかし、形質を選抜した F_2 個体に*bulbosum*法を適用するには、開花時期を合わせる困難性や交雑時期の遅れによる染色体倍加効率の低下、さらに材料養成に1世代経過させなければならないことなど F_1 を用いる場合と比較して育種の実際場面での問題点も考えられる。そこで、選抜対象となる育種目標によって固定化する世代を考慮することも必要であろう。なお、半数体育種において選抜対象となる集団の理論的規模について米澤(1986)はコンピュータシミュレーションから通常育種法の場合の $1/5 \sim 1/2$ 程度の倍加個体を養成する必要があることを報告した。通常育種法で F_2 世代を2,000個体養成していれば、半数体育種では400~1,000個体が必要となる。本研究では1組合せあたり約100個体を選抜対象として優良系統を得たが、今後理論的な必要個体を選抜対象として養成することも半数体作出効率の高い本法を用いることによって十分可能であると考えられる。

以上のように、ビール大麦において*H. bulbosum*を利用した半数体作出法、半数体作出率に関する遺伝様式、効率的な*H. bulbosum*の選抜や他の植物の花粉を用いた半数体作出法を明らかにし、半数体の作出効率の向上を図ることができた。一方で、半数体での形質選抜法を明らかにし、実際の育種事業の中で育種年限を短縮し、有望系統を育成することができる半数体育種法を確立した。

近年、オオムギにおける遺伝子の詳細なマッピングを行うためのゲノム研究が世界的にも精力的に行われている。ゲノム研究には染色体変異を伴わない完全にホモになった個体が不可欠である。したがって、実験材料となるオオムギのホモ化にも本法は有用である。特に、本研究において明らかにした半数体作出技術は、効率および手法ともにこれまでの方法より改良されており、オオムギの遺伝解析研究や半数体育種法へ利用できるであろう。

さらに、コムギと*H. bulbosum*との交雑でもコムギ半数体得られることが報告されており

(Barclay 1975), *bulbosum* 法は単にオオムギだけでなくコムギの半数体育種にも利用されている(牛山ら 1987, 牛山 1989)。したがって、今後ともオオムギやコムギの品種育成や基礎研究材料を作出する実用技術としての活用が期待される。

第8章 摘 要

本研究は、ビール大麦において半数体育種法を確立する目的で、半数体作出法の一つである *H. bulbosum* を利用した方法の効率化や半数体作出に関する遺伝様式を解析した。また、*bulbosum* 法以外での半数体作出法を検討した。さらに、半数体段階での病害抵抗性の選抜法を検討し、実際の育種事業のなかで半数体由来のビール大麦有望系統の育成を行った。研究結果を要約すると以下のとおりである。

1. ビール大麦と *H. bulbosum* を交雑後、胚を摘出する適期は交雑11~12日後であり、この時期の半数体作出率は22.4%と最も高かった。また、胚培養を行う培地は B5および R-M-IS ともに適しており、培養した胚から30.3%の効率で半数体が得られた。

2. 半数体倍加固定系統を大量に効率的に得るためには、ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑を12月~1月に行い、染色体倍加処理を3月の上旬までに行う必要があることを明らかにした。この場合の倍加効率は76.4%であった。

3. 人工培地上での *H. bulbosum* 花粉の発芽能力はビール大麦花粉より高く、経時的発芽能力の低下も緩慢であった。

4. 胚着生率および半数体作出率にそれぞれ1.7~72.7%、0.6~29.5%とビール大麦品種間差が認められ、胚着生率が高い品種ほど半数体作出率も高かった。また、胚着生率の品種間差は、授粉後の花粉管伸長程度の違いに基づく受精率の差および交雑後3~5日目までの染色体消失の速さの二つの要因によると考えられた。

5. ビール大麦と *H. bulbosum* の交雑では雑種は出現せず、すべてオオムギ半数体が出た。また、交雑7日目までに *H. bulbosum* 染色体は完全に消失した。

6. 胚着生率と半数体作出率が特異的に高いビール大麦品種を見いだした。また、その品種には *H. bulbosum* との交雑による和合性に関して優性の単一遺伝子が存在すると考えられた。

7. モロッコにおける遺伝資源探索により得られた *H. bulbosum* 系統の中から花粉の生成量が多く、半数体作出率が高い系統を選抜できた。

8. *H. bulbosum* 同士の交雑後代から春播型の *H. bulbosum* 系統を選抜した。これらの系統から胚着生率および半数体作出率が、これまで用いていた系統より優れた系統を見いだした。

9. ビール大麦にトウモロコシおよびイタリアンライグラスの花粉を授粉し、交雑直後に2,4-Dを穂首節間に処理することにより、授粉小花数あたりそれぞれ最高で6.9%と10.4%の効率でオオムギ半数体を作成した。また2,4-Dの濃度は75ppmが適当であった。

10. うどんこ病菌を接種することによって半数体段階で抵抗性の選抜をすることができた。また、大麦萎縮病についてはエステラーゼアイソザイムのバンドパターンから抵抗性遺伝子 (*Ym*) をもった抵抗性の半数体を選抜できた。

11. 以上の知見をもとに209系統の半数体由来の固定系統を作成し、その中から4系統の有望系統を育成することができた。育成までにはビール大麦の両親の交配から3か年を要したが、従来の方法と比較すると約2年育種年限を短縮できた。

12. 育成した4系統は収量性や生育特性等の農業形質が標準品種より優れ、うどんこ病および大麦萎縮病に抵抗性を有していた。また、麦芽品質は優れ、地域適応性も高かった。

13. 以上の結果、ビール大麦において品種育成や半数体選抜に利用できる効率的な半数体の作出

法を確立することができた。また、半数体作出率の品種間差の要因を明らかにし、新たに作出率に関与する交雑和合性遺伝子の存在を指摘した。さらに、半数体段階での病害抵抗性選抜法の開発、利用価値の高い *H. bulbosum* の選抜および *H. bulbosum* 以外の花粉を利用した半数体作出法が開発できたことによって、育種事業における半数体育種法の利用性をより高めることができたと考えられた。本研究においては、このような半数体育種法の総合的な改良とともに実際の育種事業の中で短期間にビール大麦の有望系統を育成することができた。したがって、ここで明らかにした *bulbosum* 法を中心とした半数体育種法は今後とも遺伝的ホモ個体の作出法や育種年限を短縮した新品種育成法として利用できる有用な技術であると考えられた。

第9章 引 用 文 献

- Adamski, T. 1979. The obtaining of autodiploid barley lines using haploids from the cross *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. Genet. Pol. 20 : 31-42.
- Barclay, I. R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. Nature (Lond.) 256 : 410-411.
- Bjørnstad, Å. 1986. Partial incompatibility between Scandinavian six-rowed barleys (*Hordeum vulgare* L.) and *Hordeum bulbosum* L., and its genetical basis. Hereditas 104 : 171-191.
- Blakeslee, A. F., J. Belling, M. E. Farnham and A. D. Bergner 1922. A haploid mutant in the Jimson Weed, "*Datura Stramonium*". Science 55 : 646-647.
- Campbell, K. W., R. I. Brawn and K. M. Ho 1984. Rodeo barley. Can. J. Plant Sci. 64 : 203-205.
- Chen, F. Q. and P. M. Hayes 1989. A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. Theor. Appl. Genet. 77 : 701-704.
- , ——— and C. J. Rivin 1991. Wide hybridization of *Hordeum vulgare* x *Zea mays*. Genome 34 : 603-605.
- Choo, T. M. 1981. Doubled haploids for studying the inheritance of quantitative characters. Genetics 99 : 525-540.
- Clapham, D. 1971. In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z. Pflanzenzüchtg. 65 : 285-292.
- 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. Z. Pflanzenzüchtg. 69 : 142-155.
- Coles, G. D. 1986. 'Gwylan' barley (*Hordeum vulgare* L.). N. Z. J. Exp. Agric. 14 : 101-103.
- Damania, A. B., S. Miyagawa, T. Kuwabara, M. Furusho, F. Llabas and I. Ali. 1987. Cereal germplasm collection mission to Morocco. Rachis 6 : 50-51.
- Davies, D. R. 1958. Male parthenogenesis in barley. Heredity 12 : 493-498.
- Devaux, P. 1987. Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. I. Production of green plants. Plant Breeding 98 : 215-219.
- 1988. Comparison of anther culture and the *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploids in winter barley. II. Variation of chromosome number and seed set in the progeny. Plant Breeding 100 : 181-187.
- , T. Adamski and M. Surma 1990. Studies on low crossabilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. Plant Breeding 104 : 305-311.
- Fedak, G. 1973. Production of haploids in barley. Barley Newsl. 16 : 36-37.
- Foroughi-Wehr, B., G. Mix, H. Gaul and H. M. Wilson 1976. Plant production from

- cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. Z. Pflanzenzüchtg. 77 : 198-204.
- and W. Friedt 1984. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theor. Appl. Genet. 67 : 377-382.
- Friedt, W. and B. Foroughi-Wehr 1983. Field performance of androgenetic doubled haploid spring barley from F₁ hybrids. Z. Pflanzenzüchtg. 90 : 177-184.
- Fukuyama, T. 1987. Studies on chromosome elimination in the hybrids between *Hordeum bulbosum* and *H. vulgare*. Ber. Ohara Inst. landwirtsch. Biol., Okayama Univ. 19 : 101-129.
- 福山利範・黒住 徹 1977. 野生大麦 *Hordeum bulbosum* L. と栽培大麦 *H. vulgare* L. との交雑に関する研究 第1報 *H. bulbosum* (4X) × *H. vulgare* (4X) の雑種について. 農学研究 56 : 179-194.
- Furusho, M. 1988. Malting barley breeding using bulbosum technique. Barley Newsl. 32 : 120.
- 古庄雅彦・浜地勇次・伊藤昌光 1987. 半数体利用によるビール大麦の育種方法 1. 効率的な半数体の作出法. 日作九支報 54 : 92-94.
- ・ ——— ・ 吉田智彦 1988a. オオムギ半数体倍加系統の大量作出法と半数体におけるうどんこ病抵抗性の選抜. 育種 38 (別2) : 336-337.
- ・ 森山友幸・浜地勇次・吉田智彦 1988b. 栽培大麦と *Hordeum bulbosum* 花粉の人工発芽. 日作九支報 55 : 73-74.
- Furusho, M., Y. Hamachi and T. Yoshida 1990a. Varietal difference in crossability between Japanese two-rowed barley and *Hordeum bulbosum* L. Japan. J. Breed. 40 : 411-417.
- 古庄雅彦・浜地勇次・吉田智彦・中島阜介 1990b. 半数体におけるオオムギ縮萎病の選抜. 育種 40 (別1) : 290-291.
- Furusho, M., K. Suenaga and K. Nakajima 1991. Production of haploid barley plants from barley x maize and barley x Italian ryegrass crosses. Japan. J. Breed. 41 : 175-179.
- , M. Yoshino and T. Yoshida 1992a. Selection for spring-habit clones of *Hordeum bulbosum*. Crop Sci. 32 : 384-385.
- 古庄雅彦・吉野 稔・浜地勇次・吉田智彦 1992b. *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* において *H. bulbosum* 花粉管の伸長と染色体消失が胚形成に及ぼす影響. 育種 42 : 115-120.
- ・ 吉田智彦 1992c. *Bulbosum* 法により得られたビールオオムギの半数体倍加系統の農業形質と麦芽品質. 育種 42 : 631-639.
- Furusho, M., Y. Hamachi and T. Yoshida 1993. A highly efficient haploid producing clone of *Hordeum bulbosum* collected in Morocco. Japan. J. Breed. 43 : 41-44.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50 : 151-158.
- Griffing, B. 1975. Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. Theor. Appl. Genet. 46 : 367-385.
- Grunewaldt, J. and S. Malepszy 1976. Observations on anther callus from *Hordeum*

- vulgare* L. p.367-373. In Gaul, H. (ed.) Barley Genetics III. Thiemig, Munich.
- Guha, S. and S. C. Maheshwari 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature (Lond.) 204 : 497.
- Hagberg, A. and G. Hagberg 1980. High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. Hereditas 93 : 341-343.
- Hagberg, G. and A. Hagberg 1981. Haploidy initiator gene in barley. p.686-689. In Asher, M. J. C., R. P. Ellis, A. M. Hayter and R. N. H. Whitehouse (eds.) Barley Genetics IV. Edinb. Univ. Press, Edinburgh.
- Hamachi, Y., T. Komatsuda and K. Nakajima 1988. Embryoid formation and plant regeneration in anther culture of two-rowed barley cultivars in Japan. Japan. J. Breed. 38 : 363-366.
- 浜地勇次・吉田智彦 1989. 最近のビール大麦における品質低下の実態・原因・対策. 農及園 64 : 395-402.
- Hiura, U. 1960. Studies on the disease-resistance in barley IV. Genetics of the resistance to powdery mildew. Ber. Ohara Inst. landwirtsch. Biol., Okayama Univ. 11 : 235-300.
- Ho, K. M. and K. J. Kasha 1975. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. Genetics 81 : 263-275.
- , D. P. Shanks, W. C. Smith and P. C. Ma 1978. Chromosome doubling at various growth stages of barley haploids with colchicine. Barley Genet. Newsl. 8 : 51-52.
- and G. E. Jones 1980. Mingo barley. Can. J. Plant Sci. 60 : 279-280.
- 穂積清之・菜崎 健 1957. 大麦花粉の人工発芽. 日作紀 25 : 138.
- Huang, B., J. M. Dunwell, W. Powell, A. M. Hayter and W. Wood 1984. The relative efficiency of microspore culture and chromosome elimination as methods of haploid production in *Hordeum vulgare* L. Z. Pflanzenzüchtg. 92 : 22-29.
- Huang, Q. F., H. Y. Yang and C. Zhou 1982. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. Acta Bot. Sin. 24 : 295-300.
- Hvid, S. and G. Nielsen 1977. Esterase isoenzyme variants in barley. Hereditas 87 : 155-162.
- Inagaki, M. 1986. Crossability of Japanese wheat cultivars with *Hordeum bulbosum* L. Japan. J. Breed. 36 : 363-370.
- and M. Tahir 1990. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. Japan. J. Breed. 40 : 209-216.
- Islam, R. and D. H. B. Sparrow 1974. Production of haploids in barley. Barley Newsl. 17 : 40-42.
- 伊藤昌光・浜地勇次・古庄雅彦・篠倉正住・北原操一・藤井敏男・鈴木崇之 1987. 二条大麦新品種「ニシノゴールド」の育成. 福岡農総試研報 A-6 : 17-24.
- Jain, S. K. and R. W. Allard 1960. Population studies in predominantly self-pollinated

- species, I. Evidence for heterozygote advantage in a closed population of barley. Proc. Nat. Acad. Sci. 46 : 1371-1377.
- Jensen, C. J. 1974. Production of monoploids in barley : A progress report. p.167-179. In Polyploidy and induced mutations in plant breeding. Proc. FAO/IAEA and EUCARPIA Meeting., Bari, Italy, 1972. IAEA, Vienna.
- 1976. Barley monoploids and doubled monoploid: Techniques and experience. p.316-345. In Gaul, H.(ed.) Barley Genetics III. Thiemeig, Munich.
- Jones, D. L., D. M. Jones, B. C. Clifford, R. B. Clothier, R. Cook, T. E. R. Griffiths, E. W. C. Jones and I. T. Jones 1985. Cereal breeding, barley. Rep. Welsh Plant Breed. Stn. 1984 : 65-66.
- Jones, D. M., R. B. Clothier and T. E. R. Griffiths 1986. Cereal breeding, barley. Rep. Welsh Plant Breed. Stn. 1985 : 74-75.
- Kao, K. N. and K. J. Kasha 1971. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. p.82-88. In Nilan, R. A.(ed.) Barley Genetics II. Wash. State Univ. Press.
- Kasha, K. J. and K. N. Kao 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (Lond.) 225 : 874-876.
- and R. S. Sadasivaiah 1971. Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. Chromosoma 35 : 264-287.
- Katznelson, J. and D. Zohary 1967. Diploid and tetraploid *Hordeum bulbosum* L. Isr. J. Bot. 16 : 57-62.
- Kim, B. Y., D. L. Johnson and D. U. Kim 1988. Barley haploid production using interspecific crosses between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*. Korean J. Crop Sci. 33 : 392-399.
- Koller, D. and H. R. Highkin 1960. Environmental control of reproductive development in *Hordeum bulbosum*, a perennial pasture grass. Am. J. Bot. 47 : 843-847.
- 小西猛朗・松浦誠司 1987. わが国の二条大麦品種の変遷とエステラーゼ同位酵素の変異. 育種 37 : 412-420.
- Konishi, T., N. Kawada, H. Yoshida and K. Sohtome 1989. Linkage relationship between two loci for the barley yellow mosaic resistance of Mokusekko 3 and esterase isozymes in barley (*Hordeum vulgare* L.). Japan. J. Breed. 39 : 423-430.
- and S. Matsuura 1991. Geographic differentiation in isozyme genotypes of Himalayan barley (*Hordeum vulgare*). Genome 34 : 704-709.
- and R. Kaiser 1991. Genetic difference in barley yellow mosaic virus resistance between Mokusekko 3 and Misato Golden. Japan. J. Breed. 41 : 499-505.
- , K. Abe and Y. Yano 1992. Allelic variation at the *Gaz* locus for distorted segregation in Japanese two-rowed barley. Japan. J. Breed. 42 : 103-107.
- Konzak, C. F., L. F. Randolph and N. F. Jensen 1951. Embryo culture of barley species hybrids. Cytological studies of *Hordeum sativum* x *Hordeum bulbosum*. J. Hered. 42 : 125-134.
- Kruse, A. 1974. A 2,4-D treatment prior to pollination eliminates the haplontic (gametic) sterility in wide intergeneric crosses with 2-rowed barley, *Hordeum vulgare* ssp.

- disticum*, as maternal species. *Hereditas* 78 : 319. (Abstract)
- Kuckuck, H. 1934. Artkreuzungen bei Gerste. *Züchter* 6 : 270-273.
- Lange, W. 1971a. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica* 20 : 14-29.
- 1971b. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica* 20 : 181-194.
- Laurie, D. A. and M. D. Bennett 1986. Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28 : 313-316.
- and ——— 1987. The effect of the crossability loci *Kr1* and *Kr2* on fertilization frequency in hexaploid wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 73 : 403-409.
- and ——— 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 393-397.
- and ——— 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. *Genome* 32 : 953-961.
- Lein, A. 1948. Natürliche Standorte von diploidem und tetraploidem *Hordeum bulbosum* L. *Züchter* 19 : 6-9.
- Littlejohn, G. M. and R. de V. Pienaar 1988. Haploids in barley breeding. *S. Afr. J. Plant Soil* 5 : 158-160.
- Lundqvist, A. 1962. Self-incompatibility in diploid *Hordeum bulbosum* L. *Hereditas* 48 : 138-152.
- Morrison, J. W., A. E. Hannah, R. Loiselle and S. Symko 1959. Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. II. Interspecific and intergeneric crosses. *Can. J. Plant Sci.* 39 : 375-383.
- and T. Rajhathy 1959. Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. III. Pairing in some interspecific and intergeneric hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* 1 : 65-77.
- 中田和男・田中正雄 1968. 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化. *遺雜* 43 : 65-71.
- 中山林三郎 1934. 稲花粉の人工発芽に就て. *農及園* 9 : 1917-1926.
- Nei, M. 1963. The efficiency of haploid method of plant breeding. *Heredity* 18 : 95-100.
- Niizeki, H. and K. Oono 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 44 : 554-557.
- Nitzsche, W. and G. Wenzel 1977. Haploids in plant breeding. *Fortschr. Pflanzenzücht, Beiheft. Z. Pflanzenzüchtg.* H. 8.
- Norstog, K. 1965. Development of cultured barley embryos. I. Growth of 0.1-0.4-mm embryos. *Am. J. Bot.* 52 : 538-546.
- Ofir, M., D. Koller and M. Negbi 1967. Studies on the physiology of regeneration buds of *Hordeum bulbosum*. *Bot. Gaz.* 128 : 25-34.
- Ouyang, T., H. Hu, C. Chuang and C. Tseng 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 16 : 79-95.
- Pickering, R. A. 1977. Production of doubled haploid barley. *Rep. Welsh Plant Breed. Stn.* 1976 : 61-63.

- 1980a. Attempts to overcome partial incompatibility between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Euphytica* 29 : 369-377.
- 1980b. Use of the doubled haploid technique in barley breeding at the Welsh Plant Breeding Station. Rep. Welsh Plant Breed. Stn. 1979 : 208-226.
- 1981. Pollen tube-stylodium interaction in *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. p.666-676. In Asher, M. J. C., R. P. Ellis, A. M. Hayter and R. N. H. Whitehouse(eds.) Barley Genetics IV. Edinb. Univ. Press, Edinburgh.
- 1982. The effect of pollination bag type on seed quality and size in *Hordeum* inter- and intraspecific hybridization. *Euphytica* 31 : 439-449.
- 1983a. The influence of genotype on doubled haploid barley production. *Euphytica* 32 : 863-876.
- 1983b. The assessment of variation in two populations of *Hordeum bulbosum* L. for improving success rates in a doubled haploid barley programme. *Euphytica* 32 : 903-910.
- 1983c. The location of a gene for incompatibility between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Heredity* 51 : 455-459.
- 1985. Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. *Euphytica* 34 : 869-874.
- and J. D. Hayes 1976. Partial incompatibility in crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Euphytica* 25 : 671-678.
- and P. W. Morgan 1983. Plant regeneration from cultured embryos derived from *Hordeum vulgare* L. pollinated with *H. bulbosum* L. *Euphytica* 32 : 585-591.
- Powell, W. and W. Wood 1984. An assessment of the *hap* initiator gene for haploid production in *Hordeum vulgare*. *J. Agric. Sci. Camb.* 103 : 253-255.
- , P. D. S. Caligari and J. M. Dunwell 1986. Field performance of lines derived from haploid and diploid tissues of *Hordeum vulgare*. *Theor. Appl. Genet.* 72 : 458-465.
- Reinbergs, E., L. S. P. Song, T. M. Choo and K. J. Kasha 1978. Yield stability of doubled haploid lines of barley. *Can. J. Plant Sci.* 58 : 929-933.
- Rines, H. W. and L. S. Dahleen 1990. Haploid oat plants produced by application of maize pollen to emasculated oat florets. *Crop Sci.* 30 : 1073-1078.
- 酒井寛一 1954a. イネムギの育成品種における Secondary selection の問題. *農及園* 29 : 241-244.
- 1954b. 米麦原種圃の改善案. *農及園* 29 : 1103-1104.
- San Noeum, L. H. 1976. Haploïdes d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d' ovaires non fécondés. *Ann. Amélior. Plantes* 26 : 751-754.
- 佐々木昭博 1990. 作物育種と食品加工 [4] ビールオオムギ. *農及園* 65 : 537-542.
- Shimakura, K. 1934. The capability of continuing divisions of the *Tradescantia* pollen mother-cell in saccharose solution. *Cytologia* 5 : 363-372.
- Simpson, E., J. W. Snape and R. A. Finch 1980. Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids of barley, *Hordeum vulgare*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 85 : 205-211.
- and J. W. Snape 1981. The use of doubled haploids in a winter barley

- programme. p.716-720. In Asher, M. J. C., R. P. Ellis, A. M. Hayter and R. N. H. Whitehouse (eds.) Barley Genetics IV. Edinb. Univ. Press, Edinburgh.
- Sitch, L. A. and J. W. Snape 1986. The influence of the *Hordeum bulbosum* and the wheat genotype on haploid production in wheat (*Triticum aestivum*).
Z. Pflanzenzüchtg. **96** : 304-319.
- Snape, J. W. and E. Simpson 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. Theor. Appl. Genet. **60** : 123-128.
- Subrahmanyam, N. C. and K. J. Kasha 1973. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. Chromosoma **42** : 111-125.
- and ——— 1975. Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments. Can. J. Genet. Cytol. **17** : 573-583.
- Suenaga, K. and K. Nakajima 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). Plant Cell Rep. **8** : 263-266.
- Symko, S. 1969. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) x *Hordeum vulgare* (2x). Can. J. Genet. Cytol. **11** : 602-608.
- Takahashi, R. and S. Yasuda 1956. Genetic studies of spring and winter habit of growth in barley. Ber. Ohara Inst. landwirtsch. Biol., Okayama Univ. **10** : 245-308.
- Thiebaut, J. and K. J. Kasha 1977. Experiments on chromosome doubling of barley haploids with colchicine. Barley Genet. Newsl. **7** : 63-66.
- and ——— 1978. Modification of the colchicine technique for chromosome doubling of barley haploids. Can. J. Genet. Cytol. **20** : 513-521.
- , ——— and A. Tsai 1979. Influence of plant development stage, temperature, and plant hormones on chromosome doubling of barley haploids using colchicine. Can. J. Bot. **57** : 480-483.
- Trione, E. J. and R. J. Metzger 1970. Wheat and barley vernalization in a precise temperature gradient. Crop Sci. **10** : 390-392.
- Ukai, Y. 1983. Early maturing mutations as germplasm stocks for barley breeding. Gamma Field Symp. **22** : 49-70.
- 牛山智彦 1989. *Bulbosum* 法によるコムギ半数体育種と今後の展望. 農業技術 **44** : 289-293.
- ・泉 克明・桑原達雄・斉藤 稔・田中幹男 1987. 野生大麦 (*Hordeum bulbosum* L.) によるコムギ半数体育種法の研究. 長野農事試報 **44** : 15-28.
- Ushiyama, T., T. Shimizu and T. Kuwabara 1991. High frequency of haploid production of wheat through intergeneric cross with teosinte. Japan. J. Breed. **41** : 353-357.
- Walsh, E. J. 1974. Efficiency of the haploid method of breeding autogamous diploid species: A computer simulation study. p.195-209. In Kasha, K. J. (ed.) Haploids in higher plants. Univ. Guelph.
- Wang, C. C. and B. J. Kuang 1981. Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. Acta Bot. Sin. **23** : 329-330.
- 米澤勝衛 1986. シミュレーションによる半数体育種法の効率評価. “育種学最近の進歩 第27集”

- 日本育種学会編，啓学出版，東京，43-49.
- 吉田智彦・伊藤昌光・浜地勇次・古庄雅彦・篠倉正住・吉野 稔 1991. ビール大麦新品種「アサカゴールド」の育成. 福岡農総試研報 A-11: 27-30.
- Zenkter, M. and W. Nitzsche 1984. Wide hybridization experiments in cereals. Theor. Appl. Genet. 68: 311-315.

Studies on Haploid Breeding for Malting Barley

by

Masahiko FURUSHO

Summary

Combined procedures between production of haploids and their chromosome doubling enable to save time in plant breeding programs. Barley haploids can be obtained by interspecific hybridization between barley (*Hordeum vulgare* L.) and *H. bulbosum* L. The *H. bulbosum* chromosomes are usually eliminated following fertilization during subsequent cell divisions and result in haploid barley embryos being formed. The objectives of the present study were to improve the efficiency of the haploid production and to breed elite malting barley lines by using the *bulbosum* method. The inheritance of crossability between barley and *H. bulbosum*, haploid selection for disease resistance, and the haploid production by hybridization of barley with maize or Italian ryegrass were also studied.

Results obtained in this study were as follows:

1. The most suitable time for embryo dissection and transfer to the medium corresponded to the period from 11 to 12 days after pollination, when the rate of haploid production was 22.4%. Both B5 and R-M-IS media were effective for embryo culture and the percentage of haploid production from embryo culture was 30.3%.
2. To obtain doubled haploids efficiently under greenhouse conditions, crossing barley with *H. bulbosum* should be performed during the period from December to January. Colchicine treatment for chromosome doubling in haploids should be conducted before the beginning of March, resulting in the success rate of chromosome doubling was 76.4%.
3. Germination ability of *H. bulbosum* pollen was higher than that of barley on the nutrient medium.
4. There were varietal differences among the barley genotypes in embryo formation (1.7 to 72.7%) and haploid production (0.6 to 29.5%) in the crosses between barley and *H. bulbosum*, suggesting that the varietal differences in embryo formation were due to the difference in the pollen tube growth and the rate of chromosome elimination 3 to 5 days after pollination.
5. All the regenerated plants obtained in this study were haploid and *H. bulbosum* chromosomes were eliminated completely by 7 days after pollination.
6. Barley cultivar Kanto Nijo 25 showed an exceptionally high crossability with *H. bulbosum*.

F₁ hybrids having a parent of Kanto Nijo 25 in their parentage had high crossability as that of Kanto Nijo 25. The frequency distribution of crossability in F₂ individuals having Kanto Nijo 25 in their parentage showed bimodal distribution, suggesting that this cultivar possessed a single dominant gene for crossability with *H. bulbosum*.

7. To select superior *H. bulbosum* clones for haploid production, *H. bulbosum* genotypes introduced from Morocco were evaluated for their ability to produce haploids. Two clones were selected for the high haploid production efficiency, high pollen producing ability and easy handling for obtaining pollen.

8. *H. bulbosum* requires vernalization treatment to produce pollen because of its winter habit. The selection of spring habit clones from obtained clones by natural outcrossing among introduced clones from Morocco were made to facilitate the crossing of barley with *H. bulbosum*. Twenty-three out of 183 clones flowered without a vernalization treatment. These clones produced sufficient pollen and some clones showed a high haploid producing ability.

9. Barley haploids were also obtained from two intergeneric crosses (barley x maize and barley x Italian ryegrass). The efficiency of haploid production was 6.9 % and 10.4 %, respectively. In both crosses, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment after pollination was necessary to obtain the barley haploid embryos, and optimum concentration of the solution was 75ppm. A proper use of three techniques (barley x *H. bulbosum*, maize and Italian ryegrass crosses) may widen a range of application of haploid breeding method in barley.

10. The selection of powdery mildew and barley yellow mosaic disease (BaYMV) resistance were made in haploid plants. Haploid plants resistant to powdery mildew could be selected by artificial inoculation of fungi to haploid plants. The haploid plants resistant to BaYMV carrying the *Ym* gene could be easily obtained by selecting the plants showing the same banding pattern of esterase isozyme genotype as that of the resistant cultivar Mokusekko 3 by starch gel electrophoresis.

11. F₁ plants derived from two cross combinations of barley cultivars were crossed with *H. bulbosum*, and their haploid hybrids were treated by 0.05% colchicine solution to produce the doubled haploid. As the results, 209 doubled haploid plants were obtained by the *bulbosum* method, and 4 elite lines were selected. Two years were saved by the application of the *bulbosum* method compared to the conventional pedigree method.

12. These lines were superior to the check cultivar in agronomic performance and malting quality with a wide local adaptability, and they were resistant to powdery mildew and BaYMV.

13. In conclusion, an efficient haploid production method was developed for malting barley breeding. The mechanism and inheritance of the varietal difference of crossability with *H. bulbosum* were clarified. Superior *H. bulbosum* clones were selected. Haploid selection method for the resistance to several diseases was developed and highly promising doubled haploid lines were obtained in a short period of time by the *bulbosum* method.

福岡県農業総合試験場特別報告
第7号

ビール大麦における半数体育種に
関する研究

発行 平成5年7月
福岡県農業総合試験場
(福岡県筑紫野市大字吉木)

著者 古庄雅彦

印刷所 城島印刷有限公司