

# 異なる種子令のオオムギ未熟胚におけるカルス形成能 および再分化能の比較

福山 利範・佐藤 新吾\*

(平成8年10月31日受付)

**要約** オオムギ未熟胚からのカルス形成能および再分化能の品種間差異を、とくに種子令に着目して調査した。供試品種は世界各地産の栽培オオムギで、1990年は11、91年は23品種である。開花後、12、14、16および18日目の未熟胚を培養したところ、16、18日目の胚からは、ほとんどの品種でカルスが誘導された。一方、12および14日目の胚からのカルス形成率には、0～100%の著しい品種間差異が認められた。品種と種子令との交互作用は統計的に有意であり、この時期の未熟胚ではカルス形成能が大きく変化し、その程度が品種によって異なることが確認された。再分化能についても、0～17.2%の品種間差異が見られ、種子令の若い胚に由来したカルスで再分化能が高かった。

カルス形成能、再分化能ともに品種の他に、種子令の影響の大きいことが確認され、これらと胚の内部組成、とくに植物ホルモンとの関連が議論された。

キーワード：オオムギ、カルス形成能、再分化能、未熟胚、種子令

## 緒 言

植物組織から誘導されるカルス細胞は、適切な培養条件下できわめて活発に分裂、増殖する能力を有し、さらに培地組成を変えることで、これらのカルスから植物体を再分化させることが可能であり、多くの植物でこうした培養系が確立されている。この組織培養系は、一時に大量の材料を扱えること、さらに遺伝子導入の系として利用可能であることから、従来の育種技術を飛躍的に高めるものとして期待される。しかしながら、その前提条件として、カルス形成あるいはそれからの植物体再分化が効率的に安定して行われる培養系の確立が不可欠である。

栽培オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) では、頂端分裂組織、未熟胚、完熟胚、未熟花序など様々な組織でカルス誘導が試みられており、いずれの場合にもそのカルス形成能には品種間差異のあることが報告されている<sup>1,3-5,10,15,18</sup>)。また、カルスからの植物体再分化能についても、明らかな遺伝的差異のあることが報告されている<sup>5,9,12,13</sup>)。Komatsuda *et al.*<sup>7)</sup>は、未熟胚由来カルスからの再分化について遺伝解析を行い、再分化率に関する広義の遺伝力が0.76と高く、とくに第2染色体上の条性を支配する *Vv* 遺伝子座と連鎖する遺伝子(群)が再分化能に関与していることを明らかにした。最近、Mano *et al.*<sup>11)</sup>はQTL(量的形質遺伝子座)解析により、カルス増殖に関与する遺伝子座が第2および3染色体上に、植物体再分化に関する遺伝子座が第2、3、6および7染色体上に存在することを報告している。しかしながら、こうした遺伝子がカルス形成やその増殖、あるいは植物体再分化の機構にどのように関与しているのかについては、ほとんど明らかにされていない。

一方、遺伝子型の影響の他に、供試する材料の発育状態がカルス形成や再分化に大きく関与することが知られている。たとえば、成熟した組織よりも未熟組織からのカルスの方が、再分化能の高いことが報告されている<sup>6,8,17</sup>)。また、Vasil<sup>10)</sup>は、再分化能に関して遺伝子型の効果は認めつつも、材料とする組織における植物ホルモンの合成、移動、その作用程度が強く関与することを指摘している。

そこで、本実験では多様な品種を用いて、開花後日数の異なる胚におけるカルス形成能および再分化能を比較し、胚の発育状態がこれらに及ぼす影響について検討した。以下に、結果の概要を記す。

## 材料および方法

カルス形成能を比較するために、1990年には11品種、1991年には23品種の未熟胚を供試した。表1に、これ

\*現住所：青森県農業試験場(036-03 黒石市境松1-1)

Table 1. Characteristics of cultivars used for the experiment

OU No.*	Name	Origin	Ear type**	Kernel type***	Year tested
J180	Bozu	Japan	6	N	90 ; 91
J184	Tokushima Mochimugi 2	Japan	6	N	90 ; 91
J203	Konosu 30	Japan	2	N	91
K050	Milyang Naked 3	Korea	6	N	91
K131	Akimaki Chosen Domugi	Korea	6	C	90
C010	Vladivostok	China	6	C	91
C013	1703-1	China	2	C	91
C041	Chiaochuang 4	China	6	C	91
C042	Hsiping	China	6	C	91
N011	Thonje 11	Nepal	6	C	91
N015	Annapurna B. C. 2	Nepal	6	N	91
N056	Ulleri 4	Nepal	6	C	91
I018	Quetta 2	Pakistan	2	C	91
I027	Aleppo 1	Syria	2	C	91
T029	Turkey 85	Turkey	2	C	90 ; 91
T034	Turkey 100	Turkey	2	C	90 ; 91
T064	Turkey 190	Turkey	6	C	90 ; 91
T144	Turkey 430	Turkey	2	C	90
U034	Germany 17	Germany	2	C	91
U049	Jubilee	Czechoslovakia	2	C	91
U074	Russia 45	Russia	2	C	90 ; 91
B005	Argentine	N. Africa	6	C	90 ; 91
E181	Ethiopia 543	Ethiopia	D	C	91
E234	Addis Ababa 7	Ethiopia	2	C	91
E241	Addis Ababa 28	Ethiopia	L	C	90
A023	Hannchen N. S.	USA	2	C	90 ; 91

\*: Accession number of Barley Germplasm Center, Okayama University.

\*\* : 2, 6, D and L refer to two-rowed, six-rowed, deficiens and irregulare ear types, respectively.

\*\*\* : N and C refer to naked and covered kernels, respectively.

らの品種名と主要な特性を示した。これらの品種を選ぶにあたっては、できるだけ広い遺伝的変異を比較するために世界各地の品種を取り上げた。また、開花時期の違いがカルス形成に影響を及ぼすことが予測されたので、出穂日が著しく異なるものは除外した。いずれの品種も、岡山大学大麦系統保存施設より分譲され、当研究室で保存しているものである。

1990, 91年ともに各品種ごとに開花日を調査し、開花後12, 14, 16および18日目に2~3穂を採取した。そして、各穂の上下3~4小穂を除き、中央部の主列から種子を採り、以下の滅菌処理を行った。まず、内外穎を除去した後、70%エタノールに30秒間、2%次亜塩素酸ソーダに8分間浸漬した。滅菌水で4~5回洗浄した後、解剖顕微鏡下で胚を摘出した。各品種の異なる開花後日数(以下、種子令と呼ぶ)の胚を、直径90mmのプラスチックシャーレに約15個置床し、2反復とした。カルス誘導のための培地としては、MS基本培地にショ糖20g/l、寒天8.5g/l、2, 4-D2 mg/lを加え、pH 5.7に調整したものをを用いた。25±1℃の暗黒条件下で培養し、置床後20日目にカルス形成率(%)を調査した。なお、カルス形成率のパーセントは角度に変換後、統計

Table 2. Percentages of callus formation in the cultivars with different seed age

Year Seed age* Cultivar	1990				1991			
	12	14	16	18	12	14	16	18
J180	20.0	100.0	100.0	100.0	0.0	31.0	100.0	100.0
J184	27.6	100.0	96.7	96.7	0.0	70.0	96.6	100.0
J203	—**	—	—	—	0.0	92.6	100.0	100.0
K050	—	—	—	—	0.0	24.1	96.7	100.0
K130	82.2	100.0	100.0	100.0	—	—	—	—
C010	—	—	—	—	0.0	40.0	100.0	100.0
C013	—	—	—	—	0.0	6.7	100.0	96.7
C041	—	—	—	—	7.7	70.4	96.7	96.7
C042	—	—	—	—	0.0	50.0	100.0	100.0
N011	—	—	—	—	0.0	50.0	96.7	100.0
N015	—	—	—	—	0.0	17.2	96.7	100.0
N056	—	—	—	—	0.0	43.3	93.3	96.7
I018	—	—	—	—	0.0	86.7	96.7	100.0
I027	—	—	—	—	0.0	53.3	96.7	100.0
T029	10.0	83.3	100.0	93.3	3.3	86.7	100.0	100.0
T034	14.8	69.2	100.0	93.1	0.0	7.7	82.8	96.7
T064	22.2	53.6	90.0	90.0	0.0	33.3	96.7	100.0
T144	0.0	90.0	82.1	96.7	—	—	—	—
U034	—	—	—	—	0.0	66.7	76.7	100.0
U049	—	—	—	—	0.0	3.3	90.0	100.0
U074	3.3	93.3	100.0	100.0	0.0	4.3	96.7	100.0
B005	0.0	81.5	89.7	100.0	0.0	20.7	55.2	100.0
E181	—	—	—	—	0.0	48.3	83.3	100.0
E234	—	—	—	—	0.0	10.0	70.0	96.7
E243	53.9	90.0	100.0	100.0	—	—	—	—
A023	46.7	90.0	82.1	100.0	0.0	39.9	91.0	99.3
Mean	25.5	86.4	94.6	97.3	0.5	41.6	91.8	99.3

\*Days after anthesis. \*\*Not tested.

処理を行った。

カルスからの植物体再分化能を知るために、1990年の実験では胚置床後45～50日目のカルスを、91年の実験では30～35日目のカルスを、それぞれ再分化培地に移植した。培地組成は、カルス誘導培地から2, 4-Dを除いたものである。25±1℃, 14時間日長下で培養し、2週間ごとに培地を交換した。培養56日後に、莖葉および根の再分化率を調査した。

## 結 果

### 1. カルス形成能の比較

1990年に供試した11品種の開花日は、早い品種が4月21日、遅いものが5月1日であった。91年の23品種の開花日は4月24日から29日であった。

1990年、91年の胚置床後20日目のカルス形成率を表2に示す。両年次とも種子令が16及び18日目の胚からは高率のカルス形成が認められ、品種の平均値は90%以上であった。しかしながら、これらの種子令の胚は、き

Table 3. Variance analysis of callus formation in 1990 (a) and in 1991 (b)

(a) 1990

Variables	d.f.	MS	F value
Cultivar (C)	10	661.421	15.34***
Seed age (A)	3	15218.093	352.88***
C×A	30	277.050	6.42***
Error	44	43.125	

(b) 1991

Variables	d.f.	MS	F value
C	22	392.393	11.63***
A	3	73915.645	2190.48***
C×A	66	240.649	7.13***
Error	92	33.744	

\*\*\*: Significant at the 0.1% level.

Table 4. Variance analysis of callus formation in 8 cultivars with different seed ages grown in 1990 and 1991

Variables	d.f.	MS	F value
Cultivar (C)	7	251.2041	2.529*
Seed age (A)	3	18333.6114	184.566***
Year (Y)	1	2428.8446	24.451***
C×A	21	155.5020	1.565
A×Y	3	1407.1816	14.166***
Y×C	7	131.8562	1.327
Error	21	99.3335	

\*, \*\*\*: Significant at the 5 and 0.1% level, respectively.

わめて高頻度の発芽を伴っており、誘導されたカルスの生長は貧弱であった。一方、種子令が12及び14日目の場合には、カルス形成率に顕著な品種間差異が認められた。1990年の種子令12日目の11品種をみると、2品種(T144とB005)は全くカルスを形成しなかったが、K130は82.2%と高い値を示した。これら11品種の平均カルス形成率は25.5%であった。種子令が2日進行した14日目の胚ではカルス形成率が高まり、最も低い品種でもT064の53.6%であり、品種平均値は86.4%であった。1991年の材料では、12日目の胚からはほとんどカルスが誘導されず、C041およびT019の2品種のみがそれぞれ3.3%および7.7%のカルス形成率を示した。しかし、種子令が14日目の胚では著しいカルス形成率の品種間差異が認められ、J203やT029は85%以上の高率を示し、一方T144およびU049は3.3%とともに低かった。23品種の平均では41.6%であった。

品種および種子令によるカルス形成率の違いについて分散分析を行い、結果を表3に示した。これによると、両年次とも品種、種子令および両者の交互作用は0.1%水準で有意であった。交互作用については、とくに種子令12日目および14日目の各品種の反応の差異が有意となった要因と思われる。すなわち、1990年の11品種については、T144が0%から90%と急激なカルス形成率の上昇を示したのに対して、T064は22.2%から53.6%と増加が緩やかであった。同様に、1991年の23品種についても、J203は0%から92.6%と高くなったのに対して、

Table 5. Rate of regeneration in calli derived from immature embryos with different seed age in 23 cultivars tested in 1991

Cultivar	Seed age (days after anthesis)			Mean
	14	16	18	
J180	0.0%	0.0	3.5	1.2
J184	14.3	7.4	10.0	10.6
J203	14.3	0.0	0.0	4.8
K050	—*	17.2	6.7	11.9
C010	0.0	0.0	0.0	0.0
C013	5.6	3.3	3.3	3.3
C041	0.0	14.8	10.7	10.4
C042	7.1	6.9	0.0	2.3
N011	—	0.0	0.0	2.4
N015	0.0	3.4	3.3	3.4
N056	12.0	0.0	0.0	0.0
I018	0.0	0.0	3.3	5.1
I027	0.0	0.0	0.0	0.0
T029	—	0.0	0.0	0.0
T034	0.0	—	0.0	0.0
T064	—	0.0	0.0	0.0
U034	—	0.0	0.0	0.0
U049	—	3.3	0.0	1.7
U074	0.0	0.0	0.0	2.2
B005	6.7	0.0	0.0	0.0
E181	0.0	0.0	0.0	0.0
E234	—	0.0	0.0	0.0
A023	—	0.0	0.0	0.0
Mean	4.0	2.4	1.6	2.7

\*: Data not obtained.

U049は0%から3.3%と変化が少なかった。わずか2日間の種子令の差異が、上述のようなカルス形成能の変異をもたらし、しかも品種によって傾向の異なることが注目された。

つぎに、供試年次間のカルス形成率を比較するために、2年次で共通に調べられた8品種について分散分析を行い、結果を表4に示した。これによると、品種間差異は5%水準で、種子令および年次間差異はいずれも0.1%水準で有意であった。交互作用では、種子令と年次間でのみ5%水準で有意となり、品種×種子令、品種×年次では有意ではなかった。

本実験の材料には、既述のごとく多様な品種が含まれている。そこで、カルス形成率について最も顕著な品種間差異が見出された91年の種子令14日の結果を使って、供試品種の特性とカルス形成率との関連を検討した。角度変換後のt検定結果によると、品種の産地間（ネパール以東の東亜地域と以西の西域）、条性間（2条と6条）および皮裸性間のいずれにおいても、カルス形成率には有意な差は認められなかった。

## 2. 再分化能の比較

1990年の11品種については、胚置床後45～50日目のカルスを、また91年の23品種については30～35日目のカルスを、再分化培地に移植した。いずれの年次も、種子令が16あるいは18日の胚は、前述のごとく大部分が発

芽を伴っていた。そこで、これらについては、莖葉および根を除去してカルス部分のみを移植した。移植したカルスの数は、品種によって異なり、14～30個であった。

90年、91年ともに、移植後約1週間でカルスの表面にグリーンスポットが形成された。そして、グリーンスポットを形成したカルスから、植物体の再分化が観察された。90年の品種では、種子令14日の1品種(J184)のみが再分化を示し、その率は37.9%であった。他の品種は、いずれも再分化に至らなかった。

91年の23品種については、すでに表2で示したように、種子令12日の胚はほとんどカルスを形成しなかったため、種子令14、16および18日目のカルスが移植された。これらのカルスにおける再分化率を表5に示す。まず、種子令14日の胚に由来するカルスでは、雑菌などの混入で結果の得られなかった8品種を除く15品種で、0%から14.3%の品種間差異がみられた。J184およびJ203がともに14.3%であり、ついでI018が12%と高かった。これら15品種の再分化率の平均は、4.0%であった。種子令が16日のカルスでは、再分化率は0～17.2%の変異を示し、その平均は2.4%と14日目に比べやや低かった。種子令が18日の場合は、品種平均値が1.6%とさらに低く、最も高いものでもC041の10.7%であった。品種の再分化率を3種の種子令を混みにしてみると、K050が11.9%と最も高く、ついでJ184の10.6%、C041の10.4%と高かった。一方、C010をはじめとする11品種からは、いずれの種子令のカルスからも再分化個体は得られなかった。以上の結果から、再分化率は品種およびカルスが誘導された種子令のいずれにも影響を受けることが明らかとなった。

## 考 察

オオムギ胚からのカルス形成能およびそのカルスからの再分化能には明らかな品種間差異がみられ、それが遺伝的特性であることは、緒言で紹介したように多数報告されている。しかし、こうした遺伝的差異が何に起因するかについては、まだ十分には解明されていない。

本実験では、産地の異なる多様な品種を用い、とくに胚の発育程度(種子令=開花後日数)に着目して、カルス形成能および再分化能を比較した。その結果、カルス形成能については、種子令が16および18日の胚ではほとんどの品種が80%以上の高いカルス形成率を示したのに対して、12および14日の種子令では0～100%の顕著な品種間差異が認められた。分散分析の結果、品種間、種子令間の他に、これら両者の交互作用も有意であった。このことは、開花後12～18日という比較的短い期間で、胚に内在するカルス形成に関する要因が顕著に変化し、しかも品種によってその様相が異なることを示している。とくに、種子令12および14日のわずか2日間で、著しいカルス形成率の差異のもたらされたことが注目された。これらの結果は、本実験に供試されたオオムギ品種は、いずれもカルスを誘導する能力を潜在的に有しているが、カルス形成能の向上の時期および程度が品種間で異なっていたということを示唆している。オオムギの胚の発育はS字型の生長曲線を示し、開花(受精)後12～15日は生長量の最も盛んな時期であり、子葉鞘、第1葉および根鞘がこの時期に分化する<sup>14)</sup>。こうした胚の急激な生長に伴って、その内部の組成、とくに植物ホルモンのバランスも急変していることが推測される。こうした組成変化が、種子令12および14日のカルス形成能における品種間差異をもたらしたと解釈される。コムギにおいても、出穂期の早晚による胚発育の相違がカルス形成率に大きく影響することが報告されている<sup>2)</sup>。したがって、カルス形成能の遺伝分析にあたっては、胚の発育状態に細心の注意が払われるべきで、例えば雑種世代での解析では出穂期その他の特性が分離するため、かなりの困難が伴うものと思われる。受精後の胚発育に伴う内生ホルモンレベルの変化は、まだ十分に解明されておらず、カルス形成能の差異を明らかにする上で今後の課題であろう。

再分化能については、90年の実験では種子令14日の1品種(J184)のみが再分化を示し、他はいずれも再分化に至らなかった。これは、この年のカルスの再分化培地への移植が胚置床後45～50日と遅かったことに起因するものと思われる。30～35日後に移植した91年の実験では、再分化率に著しい品種間差異が認められた。最も高い再分化率を示したのは、K050で11.9%、ついでJ184、C041がそれぞれ10.6%および10.4%であった。品種間差異の他に、種子令によっても再分化率は異なり、平均値でみると種子令14日が4%、16日が2.4%、18日は1.6%と、胚の発育が進むにつれて再分化率は低下した。したがって、再分化能においても、そのカルスが由来した品種および種子令が影響していることは間違いないものと思われ、カルス形成能の場合と同様に胚の内的組成変化を明らかにすることが、再分化能の本質的な差異を知る上できわめて重要と思われる。Vasil<sup>16)</sup>は、

再分化能の高いカルスでは、相対的に高濃度の内生インドール酢酸およびアブシジン酸が存在すると報告している。これら、内生ホルモンの胚の発育に伴う消長を明らかにすることが、カルス形成や再分化の遺伝的差異を説明する上で、今後の課題であろう。

## 引用文献

1. CHENG T. Y. and H. SMITH. 1975. Organogenesis from callus of *Hordeum vulgare*. *Planta*, 123: 307-310.
2. CHOWDHURY S. H., K. KATO, Y. YAMAMOTO and the late K. HAYASHI 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. *Japan. J. Breed.*, 41, 443-450.
3. DALE P. J. and E. DEAMBROGIO. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explant of *Hordeum vulgare*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 65-77.
4. GOLDSTEIN C. S. and W. E. KRONSTADT. 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 631-636.
5. HANZEL J. J., J. P. MILLER, M. A. BRINKMANN and E. FENDOS. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci.*, 25: 27-31.
6. HE D. G., G. TANNER and K. J. SCOTT. 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Sci.*, 45: 119-124.
7. KOMATSUDA T., L. WENBIN, H. SATO, T. ANNAKA, S. ENOMOTO, M. KANG and S. OKA. 1991. A genetical factor enhancing plant regeneration linked with the *V-v* locus in *Hordeum vulgare* L. *Japan. J. Breed.*, 41: 661-664.
8. LU C. Y., S. F. CHANDLER and I. K. VASIL. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature embryos of rye (*Secale cereale* L.). *J. Plant Physiol.*, 115: 237-244.
9. LUHRS R. and H. LORZ. 1987. Plant regeneration in vitro embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 16-25.
10. LUPOTTO E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. *Ann. Bot.*, 54: 523-529.
11. MANO Y., H. TAKAHASHI, K. SATO and K. TAKEDA. 1996. Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Breeding Science*, 46: 142.
12. 間野吉郎・力石和英・安田昭三. 1994. オオムギ未熟胚培養系におけるカルス生長量及び植物体再分化能の遺伝解析. *岡大資生研報*, 2: 43-53.
13. 力石和英・安田昭三. 1994. オオムギ品種における完熟胚及び未熟胚由来カルスの再分化能の比較. *岡大資生研報*, 2: 33-42.
14. 末次 勲 1951. 大麦・ライ麦及びオート麦における胚の発育に関する形態学的研究. *農技研報*, D1: 49-87.
15. THOMAS M. R. and K. J. SCOTT. 1985. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. *J. Plant Physiol.*, 121: 149-158.
16. VASIL I. K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol.*, 128: 193-218.
17. VASIL V. and I. K. VASIL. 1981 Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* x *P. purpureum* hybrid. *Amer. J. Bot.*, 68: 864-872.
18. WEIGEL R. C. and K. W. HUGES. 1985. Longterm regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue cultures derived from apical meristem explant. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5: 151-162.

## Callus Formation and Plant Regeneration in Immature Barley Embryos with Different Seed Age

Toshinori FUKUYAMA and Shingo SATO\*

(Received October 31, 1996)

### Summary

The ability of callus formation and plant regeneration in immature barley embryos with different seed ages was investigated. In 1990 and 1991, 11 and 23 cultivars with different origins were used for the callus induction, respectively (Tab. 1). The immature embryos were sampled 12, 14, 16 and 18 days after anthesis, and cultured on MS-medium supplemented with sucrose (20g/l), agar (8.5g/l) and 2, 4-D (2mg/l) and adjusted to pH 5.7. Twenty days after incubation under dark and  $25\pm 1^\circ\text{C}$  condition, the rate of callus formation was recorded. Almost all of the embryos with seed age of 16 or 18 days induced calli, while those of 12- or 14- seed age showed quite different rates of callus formation among the cultivars; ranging from 0% to 82.2% in 12-day old embryos, and from 53.6% to 100% in 14-day old embryos in 1990 (Tab. 2). The variation of calli induction was little in 12-day old embryos in 1991, but was marked in those with seed age of 14 days (3.3% to 92.6%) (Tab. 2). According to the analysis of variance, the differences in callus formation were significant among cultivars and seed ages (Tab. 3). It should be noted here that the interaction between cultivars and seed ages was significant both in 1990 and 1991. This implies that the rates of increase of callus induction differed among the genotypes in the period from 12 to 14 days after anthesis.

The calli obtained were placed onto the medium excluded 2, 4-D, and cultured under 14 hours day-length at  $25\pm 1^\circ\text{C}$  for the plant regeneration. After incubation for 56 days, the rate of regeneration was studied. Calli derived from the younger embryos resulted in the higher rate of regeneration; 4.0, 2.4 and 1.6% were observed in embryos with 14, 16 and 18 days of seed age, respectively. The difference among the cultivars was remarkable in regeneration, ranging from 11.9% to 0%.

It was concluded that the ability of callus formation and regeneration was affected by not only the genotype but also the seed age of the embryo, and finally discussed on the relation of phytohormones to callus formation and regeneration.

**key words:** barley, callus formation, regeneration, immature embryo, seed age

---

\*Present address: Aomori Pref. Agr. Exp. Stat., Sakaimatsu, Kuroishi, Aomori 036-03.