

## オオムギ品種における完熟胚および未熟胚由来カルスの 再分化能の比較

力石和英・安田昭三\*

Comparison of Regenerating Ability of Calli Derived from  
Mature and Immature Embryos in Barley Varieties

Kazuhide RIKIISHI and Shozo YASUDA

The callus forming ability and regenerating ability of the calli derived from mature and immature embryos of 132 barley varieties were examined. These materials were taken from a world-wide collection preserved at the Barley Germplasm Center of Okayama University. The callus forming ability varied widely according to genotype in both mature and immature embryos, but the varieties collected from Ethiopia showed low callus forming ability. Calli derived from mature embryos generally did not regenerate shoots, except for three Japanese varieties. The frequency of shoot regeneration from the calli derived from immature embryos was somewhat higher than that from those derived from mature embryos. Many of the Korean and Japanese varieties had a high shoot regenerating ability. However, few of the varieties from Ethiopia and Southwest Asia had a high shoot regenerating ability. No correlation was observed between root regenerating ability and shoot regenerating ability of the varieties. No correlation was observed between callus proliferation and root regenerating ability between calli derived from mature and immature embryos. We could not find any difference in the shoot regenerating ability between the two-rowed and six-rowed genotypes.

---

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan

平成5年10月29日受理 (Received October 29, 1993)

本研究の一部は文部省科学研究費によって行われた。課題名「オオムギ組織培養における再分化及びソマクローナル変異に関する研究」 「課題番号 03454038」

\* 岡山大学名誉教授

**Key words:** Barley, Tissue culture, Mature embryo, Immature embryo, Regenerating ability

## 緒 言

近年、組織培養におけるカルス形成能ならびに再分化能に品種間変異が存在することが明らかとなり、これらの形質に対する遺伝分析も行われている (Lazar *et al.* 1984, Koornneef *et al.* 1987, Petolino and Thompson 1987). オオムギでもカルス形成能ならびに再分化能に品種間変異が存在することが明らかとなってきた (Hanzel *et al.* 1985, Lührs and Lörz 1987, Taniguchi *et al.* 1991). また, Komatsuda *et al.* (1991) はオオムギの植物体再分化能が条性を支配する *V-v* 遺伝子座と連鎖する遺伝子に支配されていると報告している. 一方, 他の作物と同様に, オオムギにおいても未熟胚 (Lühr and Lörz 1987), 葯 (Jähne *et al.* 1991), 完熟胚 (Lupotto 1984, Ukai and Nishimura 1987), 花粉 (Datta and Potrykus 1989), 生長点 (Cheng and Smith 1975), 未熟花序 (Tomas and Scott 1985) などを外植片とした植物体の再分化に関する研究から, 再分化能が組織によって異なることが指摘されている. しかし, その理由は解明されていない.

本研究では, オオムギの組織培養技術を改善するために, 世界各地から集めたオオムギ132品種の完熟胚ならびに未熟胚からのカルス形成能および再分化能について調査し, 両者の再分化能の品種による差異を解析した.

本研究の遂行に当たり東北大学農学部日向康吉教授ならびに当研究所遺伝制御分野武田和義教授には原稿の校閲を頂いて多大なる御指導を頂いた. ここに記して感謝の意を表します.

## 材料および方法

日本, 朝鮮半島, 中国, ネパール, 西南アジア, トルコ, ヨーロッパ, 北アフリカ, エチオピア, 北米その他から収集し, 岡山大学資源生物科学研究所大麦系統保存施設で保存して

Table 1. Varieties tested for the experiment

Region	No.	Two-rowed		Six-rowed	
		No.	%	No.	%
Japan	25	4	16.0	21	84.0
Korea	10	0	0.0	10	100.0
China	9	0	0.0	9	100.0
Nepal	9	0	0.0	9	100.0
S.W. Asia	7	1	14.3	6	85.7
Turkey	10	9	90.0	1	10.0
Europe	9	5	55.6	4	44.4
N. Africa	18	0	0.0	18	100.0
Ethiopia	25	7	28.0	18	72.0
Others	10	5	50.0	5	50.0
Total	132	31	23.5	101	76.5

いるオオムギ132品種を供試した (Table 1)。供試品種に占める二条品種と六条品種の割合は、それぞれ23.5%と76.5%であった (Table 1)。

完熟胚培養系におけるカルス誘導、継代および再分化は Luptto (1984) の方法に従った。すなわち、完熟種子を70%エタノールで1分間、次いで有効塩素濃度3%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬し、滅菌水で3回水洗した後、ガラスシャーレ内で滅菌水を含んだ濾紙上に5°Cで24時間静置して吸水させた。その後、種子から胚を切り取り、この胚を更に有効塩素濃度1.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、余分な水分を取り除いてカルス誘導培地上に胚盤が培地に接触するように1シャーレ (直径90mm、深さ16mm) 当たり10個ずつ、5シャーレに置床した。3週間おきに3~4回の継代を行った後、カルスを分割して再分化培地に置床した。培養条件はいずれも25°C、16時間日長とした。カルス誘導培地には2,4-D 5 mg/l、サッカロース3%、寒天0.8%を含む修正MS培地 (Cheng and Smith 1975) を用いた。再分化にはカルス誘導培地から2,4-Dを除いた培地 (ホルモンフリー培地) を使用した。

未熟胚培養系は Lührs and Lörz (1987) の方法に従った。すなわち、開花10~14日後の未熟穎果を採取し、70%エタノールで1分間、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間殺菌した後、滅菌水で3回洗浄し、穎果から未熟胚を取り出して1シャーレ当たり10個ずつ、3シャーレに置床した。この時期における胚の長さは0.8~2.0mm程度であった。完熟胚培養系と同様の継代を行った後、増殖したカルスを分割して再分化培地に置床した。カルス誘導は25°C、暗黒下で行い、継代および再分化は25°C、16時間日長で行った。カルス誘導培地には2,4-D 2 mg/l、サッカロース3%、寒天0.8%を含む修正MS培地 (Cheng and Smith 1975) を用いた。再分化培地にはカルス誘導培地のホルモンをIAA 2 mg/l、ゼアチン0.05mg/lに変更したものを使用した。

完熟胚および未熟胚培養系ともに、カルス誘導後3週間目にカルスの直径とカルス形成時の発芽の程度を5段階に分けて調査した。不定芽および不定根が再分化したかどうかは再分化培地移植後4週間目に調査し、置床カルス当たりで再分化率を計算した。完熟胚培養系については誘導後3週間目に一部のカルスを抽出して生体重を調査した。

## 結 果

### 1. カルス形成

完熟胚培養系では、供試した132品種のうちエチオピアの1品種 (OUF604) を除いたすべての品種がカルスを形成した。多くの品種はカルスを形成する際に発芽を伴うが、発芽が旺盛な品種と、あまり発芽せずカルスの増殖のみを示す品種などの差異が認められた。カルスの増殖は品種間の変異が大きく、わずかにカルスを形成する品種から、著しい増殖を示す品種まで幅広く変異した。置床後3週間目におけるカルス1個あたりの平均新鮮重は7.5~262.6mgと品種によって大幅に変異した。大部分の品種は柔らかく、水っぽいカルスを形成した。しかし、その後継代をしていくと、もろくて崩れやすいカルスを生じる品種もあった。品種を地域別に比較すると、エチオピアにはカルスを全く形成しない品種や、カルスは誘導されるがそれ以後の継代が困難で、褐変して枯死する品種がいくつかあった。

未熟胚培養系では、北アフリカの1品種 (OUB633) を除くすべての品種がカルスを形成し

た。カルスを形成する際の発芽の有無と程度については、発芽するだけでほとんどカルスを形成しない品種、ほとんど発芽せずにカルスを形成する品種などの差異が見られた。カルスの増殖についても、胚が褐変してそれ以上増殖しないものから、著しく増殖するものまで幅広い変異があった。また、最初に誘導されるカルスの形態的特徴には、Breiman (1985), Goldstein and Kronstadt (1986), Lühr and Lörz (1987) などが指摘するように、いくつかのタイプがあった。一つは完熟胚培養系と同様の水っぽいカルスで、そのほかに硬くしまったタイプやもろく崩れやすいタイプのものがあった。

## 2. 再分化

完熟胚培養系の場合、再分化培地上で再分化した器官はほとんどが不定根であり、不定芽を再分化した品種は日本の関東二条5号、ふじ二条および紫麦（六条品種）の3品種だけであった。不定根を再分化した品種の供試品種全体に対する割合は29.5%にすぎず、また、不定根を再分化したカルスの供試カルスに対する割合は平均5.2%と著しく低かった。

各地域ごとに検討してみると、不定芽を再分化したのは前述のように日本の品種だけであった。一方、不定根を再分化した品種の割合はネパールおよびヨーロッパでは50%を越えていた。また、不定根を再分化したカルスの割合は、ヨーロッパの品種だけが平均20.7%と高く、ほかの地域の品種では10%以下であった (Table 2)。

Table 2. Frequency of regeneration in calli derived from mature embryos

Region	Regenerated varieties (%)		Regenerated calli (%)	
	Root	Shoot	Root	Shoot
Japan	20.0	12.0	4.8	0.2
Korea	10.0	0.0	3.3	0.0
China	22.2	0.0	4.5	0.0
Nepal	55.6	0.0	3.7	0.0
S.W. Asia	0.0	0.0	0.0	0.0
Turkey	20.0	0.0	2.2	0.0
Europe	66.7	0.0	20.7	0.0
N. Africa	33.3	0.0	2.3	0.0
Ethiopia	40.0	0.0	7.6	0.0
Others	20.0	0.0	2.0	0.0
Total	29.5	2.3	5.2	0.04

Values were calculated as percentage to the number of varieties and calli.

次に、未熟胚培養系では、全供試品種中21.1%の品種が不定芽を再分化し、70.5%の品種が不定根を再分化した。不定芽を再分化した品種は全て不定根も再分化していた。供試品種全体の平均再分化率は不定芽では0.9%で、不定根では22.1%であった。不定芽を再分化した品種の割合は朝鮮半島の品種が最も高く、日本の品種がそれに続いた。不定芽の再分化率も朝鮮半島の品種が最も高く、次に高いのはヨーロッパの品種で、ほかの地域の品種は低かっ

た (Table 3). 不定根を再分化した品種の割合は日本, 朝鮮半島, 中国, ネパールでは80%を越えたが, 西南アジア地域では30%以下であった. 不定根の再分化率を地域ごとに比較すると, 日本, ネパール, エチオピア, 北米その他が30%を越えていた.

Table 3. Frequency of regeneration in calli derived from immature embryos

Region	Regenerated varieties (%)		Regenerated calli (%)	
	Root	Shoot	Root	Shoot
Japan	80.0	36.0	30.0	0.8
Korea	80.0	70.0	23.6	3.8
China	44.4	11.1	8.3	0.1
Nepal	100.0	11.1	38.0	0.7
S.W. Asia	28.6	0.0	3.3	0.0
Turkey	50.0	10.0	10.4	0.1
Europe	66.7	11.1	15.6	1.6
N. Africa	66.7	22.2	20.9	0.9
Ethiopia	80.0	8.0	34.5	0.2
Others	70.0	20.0	36.3	0.8
Total	70.5	21.2	22.1	0.9

Values were calculated as percentage to the number of varieties and calli.

### 3. 完熟胚培養系と未熟胚培養系の特性間の相関

完熟胚および未熟胚培養系におけるカルス形成時の発芽程度, カルスの増殖能, 不定根の再分化率ならびに不定芽の再分化率の相互の形質間相関係数を Table 4 に示す.

Table 4. Correlation coefficients among germination at callus formation (GM), callus proliferation (CP), frequency of root regeneration (RR) and frequency of shoot regeneration (SR) of calli derived from mature and immature embryos

Explant	Mature embryo			Immature embryo				
	CP	RR	SR	GM	CP	RR	SR	
Mature embryo	GM	0.06	0.26**	0.18*	0.23**	0.12	0.19*	0.02
	CP		0.13	0.33**	-0.09	0.03	-0.01	0.14
	RR			0.29**	0.06	0.19*	0.24**	-0.02
	SR				0.11	0.22*	0.12	0.02
Immature embryo	GM				0.16	0.40**	0.07	
	CP					0.44**	0.14	
	RR						0.05	

\*, \*\*: Significant at the 5% and 1% levels, respectively

完熟胚培養系では発芽の程度と不定根の再分化率の間に有意な正の相関があった. 不定芽の再分化率と他の3形質の間にも1%または5%水準で有意な相関がみられたが, 実際に不

不定芽を再分化したのは前述のように3品種だけなので、この相関係数は普遍的な値とは言えないであろう。

未熟胚培養系の場合にも発芽程度と不定根の再分化率の間に有意な正の相関があった。不定芽の再分化率と他の形質の間の相関係数は極めて低く、それぞれの形質は無関係であるとみられた。不定芽の再分化率と不定根の再分化率の間の相関係数も  $r=0.05$  と低かったが (Fig. 1), 不定芽を再分化した28品種についてみると不定根の形成率の低いものの方が不定芽の形成率が高い傾向にあった ( $r=-0.47$ )。

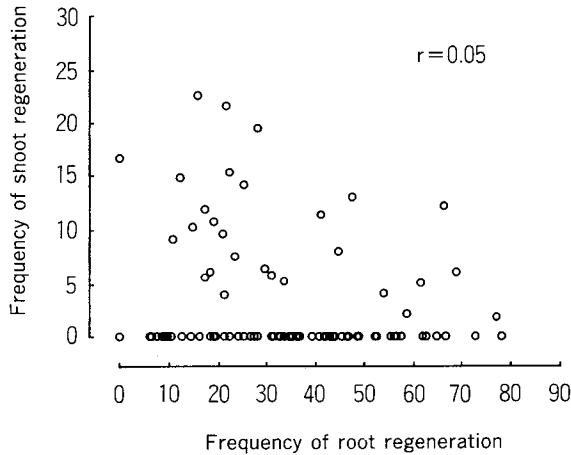


Fig. 1. Relationship between frequencies of shoot and root regeneration of calli derived from immature embryos. Frequency of regeneration was transformed into the degree of angle.

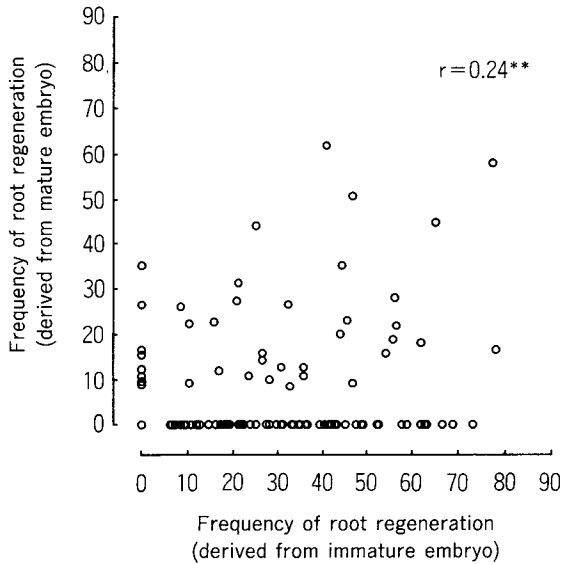


Fig. 2. Relationship between frequencies of root regeneration of calli derived from immature and these from mature embryos. Frequency of regeneration was transformed into the degree of angle.

完熟胚培養系と未熟胚培養系の間でそれぞれの形質の相関係数をみると、両培養系の発芽の程度には  $r=0.23$  と 1%水準で有意な相関関係が認められたが、カルスの増殖では有意な相関関係は認められなかった ( $r=0.03$ )。両培養系における不定根の再分化率の関係を Fig. 2 に示す。この場合は 1%水準で有意な正の相関があった ( $r=0.24$ )。その他の形質間における相関係数は低かった。

## 考 察

本研究では世界各地から取り寄せたオオムギ品種について、完熟胚と未熟胚のカルス形成能と再分化能について調査した。完熟胚と未熟胚の培養条件は異なるので、従来の報告で最良と思われる条件でそれぞれの培養を行った。その結果、これらの形質に関して、明らかな地理的変異が認められ、特にエチオピア起源の品種では完熟胚培養系ならびに未熟胚培養系で共にカルス形成能力が低かった。不定芽の再分化率にも地理的差異が認められた。完熟胚の培養系では、従来から指摘されているように (Ukai and Nishimura 1987, Taniguchi *et al.* 1991)、再分化率は極めて低かったが、日本の品種のみが低率ながら不定芽を再分化した。未熟胚の培養系では、朝鮮半島と日本に再分化する品種が多く、西南アジアやエチオピアには再分化する品種が少なかった。

このような品種変異が何に起因するのかは明らかでないが、再分化にはホルモンのバランスが大きく影響することから考えると、内性オーキシン含量などの品種変異が再分化能に反映したのかもしれない。

本研究の結果では、完熟胚および未熟胚培養系ともに不定根再分化率には大きな品種変異があったが、外植片の違いによる再分化率の差異は品種によって様々で、両培養系間の相関係数は低かった。同一品種の完熟胚培養系と未熟胚培養系の間で再分化率の相関が低いのは、再分化率の品種変異が再分化を直接支配する遺伝子のみによって支配されているのではないことを示唆している。再分化率に影響を与える要因は複数存在しており、それぞれの要因に品種変異が存在すると考えられる。

その要因の一つは、再分化能そのものにかかわる遺伝的な差異、つまり再分化能を支配する遺伝子の存否や種類（作用価）の差異である。不定根の再分化率と不定芽の再分化率の品種間相関は独立なので、両者を支配する遺伝的要因はそれぞれ別々に存在しているものと考えられる。

次に考えられる要因は、完熟胚と未熟胚の間の生理的な差異、つまり内生ホルモン含量の違いのような外植片が有する生理的条件の差異である。外植片の違いによる再分化率の差異が品種によって異なることから、外植片の生理的条件にも品種変異が存在していると考えられる。Santos and Torne (1986) はトウモロコシで、また、Lühr and Lörz (1987) はオオムギで、植物体の生育条件（温度や湿度）の違いが未熟胚由来カルスからの再分化能に対して影響を与えることを報告している。このような生育条件の違いは、外植片の生理的条件に影響を与えるものと考えられる。完熟胚と未熟胚のそれぞれで発現する不定芽再分化を支配する遺伝的要因は異なっているか、もしくは完熟胚培養系では未熟胚培養系で発現する遺伝的要因が発現していないと考えられるので、外植片の生理的条件は不定芽再分化を支配する遺伝的要因の発現に影響を与えるのかもしれない。我々は完熟胚と未熟胚の違いだけでなく、花粉

からの培養系において、不定根の出現が完熟胚および未熟胚培養系に比べてさらに少ないことを観察している。また、完熟胚からは柔らかく水っぽいカルスが誘導される一方、未熟胚からは硬くしまったカルスも誘導されることからみて、外植片の違いは脱分化の初期の段階で既にカルスの性状に影響しているものとみられる。

更に、培養時の光、温度、水分や培地成分などの培養条件に対する反応が品種によって異なり、その結果、再分化率に品種変異が生じることも考えられる。例えばオオムギでは、培養時の水分条件が不定根の再分化率に与える影響は品種によって異なることが間野ら(1991)によって報告されている。また Caligari *et al.* (1987) は2,4-Dが再分化能に対して与える影響が品種によって異なることを報告している。

これらの再分化能に影響を与える要因間の相互関係に関しては、今のところ不明であるが、個々の要因に対して高い反応性を有する遺伝子型を見つけ出し、それらを組み合わせることによってオオムギの再分化能を改良することが可能であると考えられる。

Komatsuda *et al.* (1991) は再分化能を高める遺伝的要因が条性を支配する *V-v* 遺伝子座と連鎖していることを報告している。本研究で得られた結果では、完熟胚培養系での不定根の再分化率は二条品種の方が六条品種よりも高い傾向にあったが、不定芽の再分化率は条性間に差がなく、未熟胚培養系でも不定芽および不定根共に再分化率に条性間で明瞭な差異は認められなかった (Table 5)。

Table 5. Frequency(%) of regeneration in calli derived from mature and immature embryos of two-rowed and six-rowed genotypes

Explant Genotype	Mature embryo		Immature embryo	
	Root	Shoot	Root	Shoot
Two-rowed	13.9	0.1	27.6	0.6
Six-rowed	2.5	0.0	24.0	0.9

完熟胚は未熟胚と異なり、いつでも実験材料を得ることができるので、オオムギの育種に組織培養を利用する上で、完熟胚からの再分化率を向上させ、効率のよい培養系を確立することができれば好都合である。我が国の3品種において完熟胚から不定芽が再分化したことは、この可能性があることを示している。しかし、現時点では不定芽の再分化率が低く、実用には大きな問題がある。これを打破するためには、再分化率の高い遺伝子型をスクリーニングし、培養条件(培地成分、光、温度条件など)の検討を行うと同時に、未熟胚と完熟胚のどのような生理的条件が再分化率に影響を与えるかを検討する必要がある。再分化率、特に不定芽の再分化率に影響を与える要因の遺伝性やメカニズムを明らかにすることによって、完熟胚自体の生理的特性を変えて不定芽の再分化率を向上させることが可能と考えられる。

## 摘 要

本研究では世界各地のオオムギ132品種を供試して完熟胚と未熟胚からのカルス誘導と再



分化能について調査し、材料植物が有する遺伝要因と、外植片の違いが再分化能にどのように関与しているかを考察した。

供試品種のほとんどがカルスを形成したが、全くカルスを形成しない品種もあった。エチオピアの品種にはカルス形成の悪いものが多くみられた。完熟胚培養系ならびに未熟胚培養系ともに供試品種によってカルスの増殖量に幅広い変異があり、カルスがほとんど形成されない品種から、著しく増殖する品種まであった。カルスの形態的特徴に関しては、完熟胚培養系ではほとんどの品種が水っぽいカルスを形成したのに対して、未熟胚培養系では品種によって、水っぽいタイプ、硬くしまったタイプ、もろく崩れやすいタイプの3タイプを形成し、両培養系間に大きな差異が認められた。

完熟胚培養系の場合、再分化するのはほとんどが不定根であり、不定芽を再分化したのは日本の関東二条5号、ふじ二条および紫麦の3品種だけであった。一方、未熟胚培養系では、21.2%の品種が不定芽を再分化した。不定芽を再分化した品種は朝鮮半島や日本に多く、反対にエチオピアや西南アジアの品種には再分化するものが少なかった。供試品種における不定根の再分化率と不定芽の再分化率の間には相関関係はなかった( $r=0.05$ )。両培養系の間ではカルス増殖量について相関関係はなく( $r=0.07$ )、不定根の再分化率については低い値ではあるが有意な正の相関があった( $r=0.24$ )。また、未熟胚培養系におけるカルス増殖量と不定芽の再分化率についても相関関係は認められなかった( $r=0.14$ )。二条品種と六条品種の間では、完熟胚培養系の不定根再分化率を除いて差は認められなかった。

**キーワード：**オオムギ、組織培養、完熟胚、未熟胚、再分化能

## 引用文献

- Caligari, P.D.S., Powell, W. and Goodall, V. 1987. The *in vitro* genetics of barley (*Hordeum vulgare* L.): Genetical analysis of immature embryo response to 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid. *Heredity* 59: 285-292.
- Cheng, T.Y. and Smith, H.H. 1975. Organogenesis from callus culture of *Hordeum vulgare*. *Planta* 123: 307-310.
- Datta, S. K. and Potrykus, I. 1989. Artificial seeds in barley: encapsulation of microspore-derived embryos. *Theor. Appl. Genet.* 77: 820-824.
- Goldstein, C.S. and Kronstad, W.E. 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 631-636.
- Hanzel, J. J., Miller, J. P., Brinkman, M. A. and Fendos E. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci.* 25: 27-31.
- Jähne, A., Lazzeri, P.A., Jager-Gussen, M. and Lorz, H. 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspension derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82: 74-80.
- Komatsuda, T., Lee, W., Sano, H., Annaka, T., Enomoto, S., Kang, M. and Oka, S. 1991. A genetical factor enhancing plant regeneration linked with the *V-v* locus in *Hordeum vulgare* L. *Japan. J. Breed.* 41: 661-664.

- Koornneef, M., Hanhart, C. J. and Martinelli, L. 1987. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 74: 633-641.
- Lazar, M. D., Baenzinger, P. S. and Schaeffer, G. W. 1984. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor. Appl. Genet.* 82: 131-134.
- Lührs, R. and Lörz, H. 1987. Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring- and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 75: 16-25.
- Lupotto, E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. *Ann. Bot.* 54: 523-529.
- 間野吉郎・カ石和英・安田昭三. 1991. オオムギ組織培養に関する研究III. 通気処理が完熟胚由来カルスの再分化に及ぼす効果. *育雑* 41(別2): 258-259.
- Petolino, J.F. and Thompson, S.A. 1987. Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.* 74: 284-286.
- Santos, M. A. and Torne, J. M. 1986. A comparative analysis between totipotency and growth environment condition of the donor plants in tissue culture of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 123: 299-305.
- Taniguchi, M., Enomoto, S., Komatsuda, T., Nakajima, K. and Ohyama, K. 1991. Varietal differences in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Japan. J. Breed.* 41: 571-579.
- Thomas, M. R. and Scott, K. J. 1985. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. *J. Plant Physiol.* 121: 159-169.
- Ukai, Y. and Nishimura, S. 1987. Regeneration of plants from calli derived from seeds and mature embryos in barley. *Japan. J. Breed.* 37: 405-411.