

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

間野吉郎・力石和英・安田昭三*

Genetical Studies on Callus Growth and Plant Regeneration from Immature Embryos in Barley

Yoshiro MANO, Kazuhide RIKIISHI and Shozo YASUDA

Immature embryos of 99 varieties of barley were cultured to investigate the ability of callus growth and plant regeneration. These two *in vitro* traits showed wide and continuous variations among the barley varieties tested. Ability of callus growth, which were evaluated by callus diameter ranged from 3.9mm to 11.2mm, and ability of plant regeneration from the calli ranged from 0% to 100%.

A set of complete diallel crosses was made using six cultivars as the parents which differed in ability of callus growth and plant regeneration. The V_r/W_r graphical analysis showed that there were epistasis, or interaction among nonallelic genes for callus growth. As to ability of plant regeneration, no epistasis existed in the subdiallel without P_1 (J232) which showed high specific combining ability, and it was controlled by a simple additive dominance genetic system. The mean degree of dominance(0.42) was relatively low and the broad(0.86) and narrow(0.78) sense heritabilities were high.

Key words : Barley, Tissue culture, Plant regeneration,
Diallel analysis

緒 言

近年、作物の育種を行うにあたり、形質転換や細胞選抜などの生物工学的手法が利用されるようになってきた。その一方で、形質転換や細胞選抜では培養細胞からの植物体再分化が困難であるなどの問題点がある。

オオムギについてはイネ等と比較すると研究がやや立ち遅れているが、最近プロトプラストあるいは振盪培養系からの植物体再分化が報告されている (Yan *et al.* 1990, Jähne *et al.* 1991a,b, 佐藤ら1991)。また、同時にプロトプラストへの遺伝子導入法についての報告もあり (Lazzeri *et al.* 1991)、形質転換オオムギの作出も近い将来可能となると考えられる。しかし、それらの報告は限られた品種からの再分化であり、その再分化率も低いのが現状である。したがって、オオムギの再分化の系を確立することは現在でも興味深い課題である。

最近、再分化の系を確立するために葉基部 (leaf base) や幼苗基部 (seedling axis) (Becher *et al.* 1992)、葉鞘 (inflorescence sheath leaves) (Barcelo *et al.* 1991) など、さまざまな外植片からカルスを誘導し、再分化が試みられているが、現在のところ従来から利用されている未熟胚や葯ほどの良い結果は得られていない。また、外植片の違いによって、それぞれに適した培養条件を検討し、植物体再分化を試みているのが現状である。このような状況の下にあって、植物体再分化を支配する遺伝子を解明した上でそれぞれの外植片に適した培養条件を検討することができれば、再分化について遺伝的要因と培養条件等の環境要因に分けて考えることが可能となり、このことは効率の良い植物体再分化の系を確立するにあたり適切な方法であると考えられる。

本研究ではオオムギ培養細胞からの再分化を制御し、生物工学的手法の実用化に寄与するために、植物体再分化能の遺伝様式を解析した。

本研究の実施にあたり、岡山大学資源生物科学研究所教授武田和義博士には御校閲、御指導の労を賜った。また、同研究所助手佐藤和広氏には数々の御指導を賜った。記して深く謝意を表する。

材料および方法

1. カルス生長量及び植物体再分化能の品種変異

当研究所の大麦系統保存施設で保存している世界各地の品種の中から各地域の品種数に比例して無作為に抽出した99品種を材料として、未熟胚培養系でのカルス生長量及び植物体再分化能を調査した。

各品種は温室で栽培し、受精後13~14日目の未熟種子を採取して内外穎を取り除き、70%エタノールで1分間、さらに有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウムで30分間殺菌し、その後滅菌水で3回水洗した。このようにして滅菌した種子から胚長約1 mmの未熟胚を取り出し、胚盤が上になるように1シャーレ当たり10個ずつ、3シャーレに置床し、25℃、12時間日長(約2,000ルクス)の条件でカルスを形成させた。

カルス誘導後4週間目にカルスの直径を調査した後、カルス塊を分割せずそのまま再分化培地に移植した。再分化培地移植後4週間目に20~30個のカルスについて植物体の再分化率(再分化カルス数/全カルス数)を調査した。

カルス誘導培地はMS培地 (Murashige and Skoog 1962) に2,4-Dを2 mg/l, マルトースを20g/l添加したものを, また, 再分化培地はカルス誘導培地のホルモンを2,4-DからIAA 1mg/l+ゼアチン0.05mg/l (Lührs and Lörz 1987) に置き換えたものを使用した。培地はNaOHでpH5.8に調整した後, ゲルライト2 g/lを加えオートクレーブ(121°C, 15分間)をかけて滅菌した。

2. カルス生長量及び植物体再分化能の遺伝解析

交雑に用いた親品種として, カルス生長量及び植物体再分化能が異なるニューゴールデン(J232:P₁), Golden Promise(U132:P₂), ハルビン二条(C649:P₃), ふじ二条(J220:P₄), 畿内68号(J800:P₅)及び上海1(C346:P₆)の計6品種を選んだ。

1992年春に, これらの品種の正逆総当たり交雑を行ない, 得られた30組み合わせの交雑種子と親6品種の種子を, それぞれ未熟状態の時に採取して前項と同様な方法で培養し, カルスの直径及び植物体の再分化率を調査した。

親及びF₁の再分化率(逆正弦変換値)についてHayman(1954 a, b)及びGriffing(1956)の方法に基づき, ダイアレル分析を行った。計算には鶴飼(1989)が作成したパソコン用プログラムDIALLを利用した。

結 果

1. カルス生長量及び植物体再分化能の品種変異

(1) カルス生長量

オオムギ99品種について, カルス誘導後4週間目にカルスの直径によってカルスの生長量を調査した(Fig. 1)。供試した99品種の中で3品種はカルスを形成しなかった。カルスの直径はカルスを形成した96品種で3.9~11.2mm(平均6.8mm)の連続的な変異を示した。条性別にみると, 二条品種では4.3~11.2mm(平均7.0mm), 六条品種では3.9~10.9mm(平均6.7mm)と, 両者の間には有意差は認められなかった。

(2) 植物体再分化能

カルスからの植物体再分化は淡黄色のコンパクトなカルスで認められた。また, アルビノ個体の再分化はほとんど見られなかった。

Fig. 2に植物体再分化能の品種変異を示した。再分化培地移植後4週間目の植物体再分化率は供試した99品種中, カルスを形成した96品種を対象とすると, 0~100%(平均20.0%)と大きな連続的な変異を示した。条性別にみると, 二条品種で0~100%(平均31.6%), 六条品種で0~82.8%(平均12.8%)となり, 二条品種は六条品種と比べて再分化率が高い傾向にあった。また, 六条品種を皮裸性別にみると, 皮品種の再分化率は平均15.4%であったのに対して, 裸品種は平均4.9%と, 皮品種の再分化率の方が高い傾向にあった。さらに, 小穂脱落性が判明している東亜型と西域型品種について比較すると, 東亜型(24品種)は13.2%であったのに対して西域型(29品種)は32.6%となり, 西域型の再分化率が高い結果となった。

供試した96品種のなかで, 二条品種のハルビン二条(C649)とRussia 21(U667)の2品種

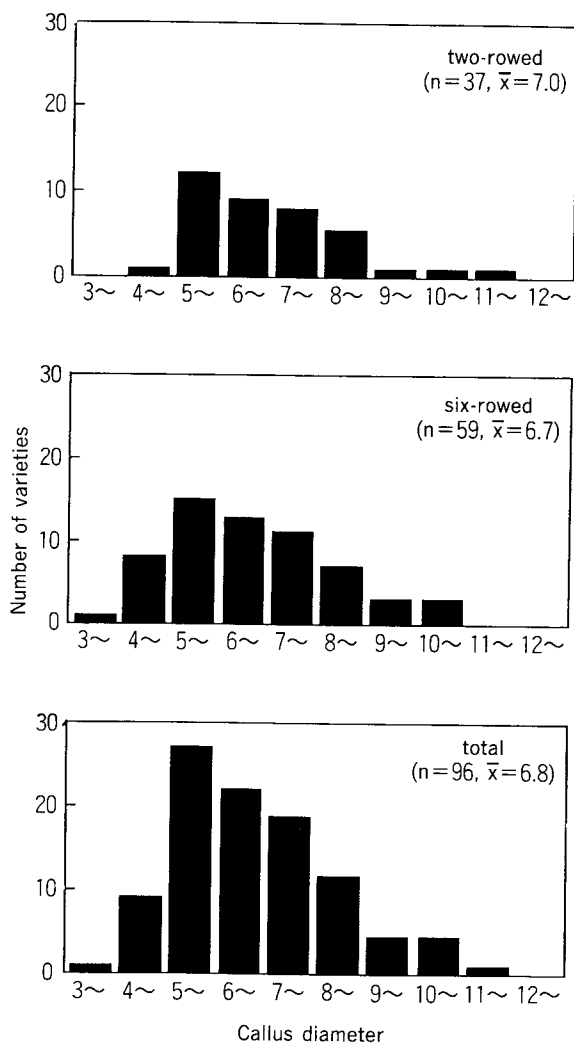


Fig. 1. Varietal difference in callus diameter.

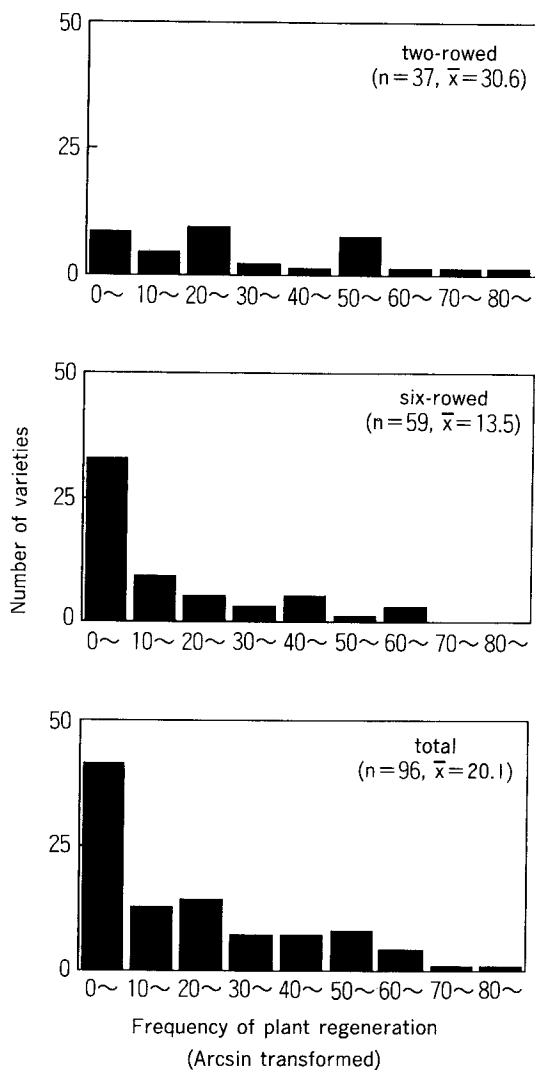


Fig. 2. Varietal difference in ability of plant regeneration.

は特に高い再分化率を示し、それぞれ100%と95.0%であった。また、この2品種の再分化カルスあたりの植物体数も平均5個体以上であった。

2. カルス生長量及び植物体再分化能の遺伝解析

前項の結果から、未熟胚培養系でのカルス生長量及び植物体再分化能はいずれも連続的な変異を示し、複数の遺伝子あるいは微動遺伝子が関与することが推察された。そこで両形質の遺伝様式をダイアレル分析によって解析した。

(1) カルス生長量

誘導後4週間目に調査したカルスの直径は親6品種で5.4~8.2mm(平均6.7mm), 30交雑のF₁で4.4~9.8mm(平均6.3mm)の変異を示した(Table 1). 分散分析の結果, 相加的効果を示すa項と優性効果を示すb項を構成する3つの要因(b₁:平均優性効果, b₂:親別の優性効果, b₃:特定組み合わせの優性効果)は全て有意であった. さらに平均的正逆交雑間差を示すc項, 特定組み合わせの正逆交雑間差を示すd項も有意であった(Table 2).

Table 1. Callus diameter(mm) of F₁s and their parental varieties in immature barley embryo culture

♀\♂	J232	U132	C649	J220	J800	C346	Mean
J232	5.9	6.9	5.9	5.4	5.9	5.1	5.6
U132	6.1	8.2	5.5	7.2	7.1	9.8	7.3
C649	4.4	5.2	6.7	5.4	6.3	6.0	5.7
J220	5.2	7.7	6.2	5.4	6.1	6.3	6.2
J800	7.1	7.4	6.0	6.3	6.9	5.5	6.6
C346	5.1	5.7	7.9	7.0	5.7	6.9	6.4
Mean	5.7	6.8	6.4	6.1	6.3	6.6	6.3

Boldface: parents

Table 2. Analysis of variance of callus diameter in diallel table

Item	df	MS	F
a	5	2.572	15.58**
b	15	0.877	5.31
b ₁	1	0.972	5.89*
b ₂	5	0.401	2.43*
b ₃	9	1.130	6.85**
c	5	0.518	3.14*
d	10	1.077	6.52**
Error	70	0.165	

Error MS was estimated from replication × genotype interaction.

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

また, カルス生長量を支配する遺伝子の組み合わせ能力を検討した結果, 一般組み合わせ能力(GCA)は有意ではなかったが, 特定組み合わせ能力(SCA)及び正逆交雑間差は有意となった. 系列分散(V_r)及び親と系列の共分散(W_r)を求め, それぞれに含まれる環境分散の寄与分を引いた上でV_rとW_rの関係を示したところ, V_r/W_rグラフの回帰係数がb=0.37となり, 1から外れた. このことから, 非対立遺伝子間の相互作用(エピスタシス)があると推察された. なお, それぞれの親を逐次ダイアレル表から除いた場合においてもV_r/W_rグラフの回帰係数は1から外れるので, カルス生長量の遺伝子作用に関するエピスタシスは特定の親によるものではないと考えられた.

(2) 植物体再分化能

カルス誘導後8週間目に調査した植物体再分化率は親6品種で0~45.8% (平均18.6%), 30交雑のF₁で0~43.3% (平均15.6%) の変異を示した (Table 3). 分散分析の結果, 相加的効果を示すa項, 特定組み合わせの優性効果を示すb₃項, 特定組み合わせの正逆交雑間差を示すd項が有意であった (Table 4). V_rとW_rの関係を示したところ, V_r/W_rグラフの回帰係数がb=0.69となり, 1から外れた. このことからエピスタシスが存在すると推察された.

Table 3. Plant regeneration frequency(%) of F₁s and their parental varieties in immature barley embryo culture

♀\♂	J232	U132	C649	J220	J800	C346	Mean
J232	14.1	32.3	43.3	40.7	0.0	0.0	21.7
U132	40.1	45.8	39.2	14.6	9.2	14.5	27.2
C649	27.9	21.4	45.1	15.8	20.8	18.5	24.9
J220	20.7	0.0	35.4	6.7	0.0	6.7	11.6
J800	3.0	14.8	3.0	8.3	0.0	0.0	4.9
C346	0.0	3.3	29.2	6.1	0.0	0.0	6.4
Mean	17.6	19.6	32.5	15.4	5.0	6.6	16.1

Boldface : parents

Table 4. Analysis of variance of plant regeneration frequency in diallel table (Arcsin transformed)

Item	df	MS	F
a	5	1018.200	34.55**
b	15	109.334	3.71
b ₁	1	15.764	0.53
b ₂	5	34.247	1.16
b ₃	9	161.446	5.48**
c	5	65.806	2.23
d	10	76.320	2.59**
Error	70	29.467	

Error MS was estimated from replication×genotype interaction.

** : Significant at 1% level

そこで, それぞれのF₁についてSCAを算出したところ, P₁ (J232)を親とした場合のF₁に高いSCAが認められた. すなわち植物体再分化率は一般に両親の平均値に近かったが, P₁ (J232)を片親とした場合, 他方の親をP₂ (U132)あるいはP₄ (J220)としたF₁では再分化率の高い方が優性を示す反面, 他方の親をP₅ (J800)あるいはP₆ (C346)としたF₁では再分化率の低いほうが優性を示しており, 再分化率の優性程度が組み合わせによって異なった.

そこで P_1 (J232) を除いた 5×5 の副ダイアレル表についてダイアレル分析を行った。その結果、a 項、d 項は有意であったが、 b_3 項は有意にはならなかった (Table 5)。d 項が有意であったことから、特定の組み合わせで細胞質または母体効果が再分化に影響していると考えられた。 P_1 (J232) を除いた V_r/W_r グラフを Fig. 3 に示した。 V_r に対する W_r の回帰係数が $b = 0.98$ と 1 に近く、相加・優性モデルに適合した。このことから、 P_1 (J232) を除くと植物体再分化率の遺伝子作用に関してエピスタシスを考慮しなくてよいと考えられた。

Table 5. Analysis of variance of plant regeneration frequency in subdiallel table (without P_1) (Arcsin transformed)

Item	df	MS	F
a	4	810.728	27.99**
b	10	57.964	2.00
b_1	1	40.272	1.39
b_2	4	61.761	2.13
b_3	5	58.464	2.02
c	4	54.915	1.90
d	6	117.970	4.07**
Error	48	28.969	

Error MS was estimated from replication \times genotype interaction.

** : Significant at 1% level

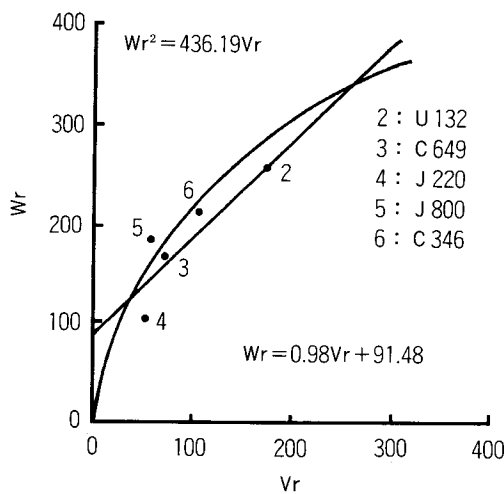


Fig. 3. (V_r/W_r) graph for plant regeneration frequency of a subdiallel without P_1 (J232).

さらに、回帰直線が限界放物線 $W_r^2 = 436.19V_r$ に対する勾配 1 の接線に近いことから、植物体再分化率の遺伝的変異は主として相加的遺伝子効果によって支配され、優性効果は小さいことがわかった。回帰直線上の各親の (V_r , W_r) 点の位置から、 P_4 (J220) は優性遺伝子

の、また、 P_2 (U132) は劣性遺伝子の割合が最も高いと考えられた (Fig. 3)。また、親の再分化率 (P_r) と優性遺伝子対劣性遺伝子の相対的割合を表す V_r+W_r の相関は $r=0.38$ となり、有意ではなかったが正の関係が認められた。

以上のように、 P_1 (J232) を除いてダイアレル分析を行った場合、Fig. 3 に示したように、植物体再分化率の遺伝子作用に関してエピスタシスの存在が認められず、ダイアレル分析の遺伝解析を行う際の仮説を満たしていると考えられた。そこで単純な相加・優性モデルを仮定して以下の分析を行った。

V_r , W_r 等の統計量から推定した遺伝成分を Table 6 に示した。相加的効果を示す D は優性効果を示す H_1 , H_2 より大きく、平均優性度 $\sqrt{H_1/D}$ は 0.42 と比較的小さい値であった。そして P_r と V_r+W_r の相関は前述のように $r=0.38$ と有意ではなかったが、優性の方向が $h=-5.08$ であり、このことから再分化率の低い方が優性であると推察された。遺伝率の推定値は狭義で 0.78、広義で 0.86 といずれも高かった。

Table 6. Estimates of genetic components of plant regeneration frequency in subdiallel table (without P_1)

Component	Estimated value
D	436.19
F	143.16
H_1	77.67
H_2	60.31
h^{*2}	9.09
E	28.97
$\sqrt{H_1/D}$	0.42
h^{*2}/H_2	0.15
h	-5.08
\bar{uv}	0.19
$D/(D+E)$	0.94
h_B^2	0.86
h_N^2	0.78

考 察

本実験で世界各地のオオムギ99品種の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を調査した結果、両培養形質共に連続的な変異を示した。

Goldstein and Kronstad (1986), Ohkoshi *et al.* (1991) はオオムギ未熟胚培養系におけるカルス生長量に品種間差異が認められたと報告している。また、オオムギの未熟胚培養系で植物体再分化能の品種変異を調べた報告に Hanzel *et al.* (1985), Goldstein and Kronstad (1986), Lührs and Lörz (1987), Ohkoshi *et al.* (1991) などがあり、植物体再分化能に品種間差異が存在することを報告している。本実験の結果とこれらの報告を併せて考えると、カルス生長量及び植物体再分化能は遺伝形質であると言える。

本実験の植物体再分化能の品種変異の調査の結果、二条品種は六条品種と比較して植物体

再分化率が高い結果となった (Fig. 2)。このことに関して、オオムギの二条品種は六条品種と比較して植物体再分化率が高いと報告されており (Ohkoshi *et al.* 1991), また小松田ら (1992) は関東中生ゴール (二条) とアズマムギ (六条) の組み合わせで、条性を決める *Vv* 遺伝子座の近傍に植物体再分化能を高める遺伝子が存在すると報告している。以上のことは *V* 遺伝子と植物体再分化に関与する遺伝子の関連性を示唆している。なお、本実験では六条皮品種の植物体再分化率は六条裸品種より、また、小穂脱落性の西域型は東亜型よりも高い結果となった。今後、条性と共に皮裸性および小穂脱落性と植物体再分化との関係も調べていく必要があると考えられた。

未熟胚培養系でのカルス生長量及び植物体再分化能の品種変異を調査した結果、両形質共に連続的な変異を示し、複数の遺伝子あるいは微動遺伝子が関与することが推察された。そこで両形質の遺伝様式をダイアレル分析によって解析した。

イネ科作物の培養特性に関する遺伝についての報告はいくつかあるが (Lazar *et al.* 1984, Petolino and Thompson 1987, Larsen *et al.* 1991, 蘭牟田ら 1991), その多くは葯培養についてである。それらによると、葯培養の培養特性は主に核遺伝子によって支配されていると報告されている。しかしそれらの報告は半数体についての解析であり、本実験との対比はできない。

一方、2倍体の外植片である未熟胚を用いた培養特性に関する遺伝性の報告には、コムギを用いた森ら (1992) やオオムギを用いた Komatsuda *et al.* (1989) の報告がある。Komatsuda らはオオムギ7品種についてカルス生長量及び植物体再分化能の正逆総当たり交雑を行った。本実験では前述のようにカルス生長量の遺伝性は相加・優性モデルに適合せず、遺伝成分が推定できなかったが、植物体再分化能の遺伝解析の結果については Komatsuda らの結果と比較し得る。

比較の結果、①遺伝率が高かった (Table 6), ②優性遺伝子の作用の方向は明確には判断できなかった、の2点については共通した結果であった。一方、本実験と Komatsuda らの結果との相違点は、本実験では①平均優性度が小さかった (Table 6), ②特定組み合わせで正逆交雑間差が認められた (Table 5), のに対して、Komatsuda らの結果はそれぞれ①平均優性度が大きかった, ②正逆交雑間差が認められなかった、という結果であった。このことは恐らく供試品種と培養条件の違いによるものと考えられる。いずれにしてもオオムギの未熟胚培養系における植物体再分化能は遺伝率の高い遺伝形質であり、高い選抜効果が期待された。劣性遺伝子の割合が高く、再分化率の高い Golden Promise (U132: P₂) のような品種は分離の大きい初期世代で再分化率の高い方向への選抜を行う際に有効な片親となると考えられた。

摘 要

オオムギ培養細胞の再分化の制御や細胞選抜の実用化に寄与するために、植物体再分化能の遺伝様式を解析した。

未熟胚培養系において世界各地の99品種についてカルス生長量及び植物体再分化能の調査を行ったところ、両形質共に連続的な変異を示し、複数の遺伝子あるいは微動遺伝子が関与していることが推察された。

カルス生長量及び植物体再分化能の遺伝様式を調べるために、6品種で正逆総当たり交雑

を行い、ダイアレル分析を行った。カルス生長量については、非対立遺伝子間の相互作用(エピスタシス)があると推察された。

一方、植物体再分化能については、特定組み合わせ能力が高かった P_1 (J232) を除いた副ダイアレルの分析によって、植物体再分化能の遺伝変異は主として遺伝子の相加効果によるものと推察され、その平均優性度は0.42であった。遺伝率の推定値は狭義で0.78、広義で0.86といずれも高かった。

キーワード：オオムギ，組織培養，植物体再分化，ダイアレル分析

引用文献

- Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Martin, A. and Lörz, H. 1991. Competence of cereal leaf cell. I. Patterns of proliferation and regeneration capability *in vitro* of inflorescence sheath leaves of barley, wheat and tritordeum. *Plant Sci.* 77: 243-251.
- Becher, T., Haberland, G. and Koop, H. U. 1992. Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedling of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.* 11: 39-43.
- Goldstein, C. S. and Kronstad, W. E. 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explant of barley, *Hordeum vulgare*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 631-636.
- Griffing, B. 1956. A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50.
- 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.
- Hayman, B. I. 1954a. The analysis of variance of diallel tables. *Biometrics* 10: 235-244.
- Hayman, B. I. 1954b. The theory and analysis of diallel cross. *Genetics* 29: 789-809.
- 蘭牟田 泉・菊池文雄・生井兵治・鶴飼保雄. 1991. イネ葯培養によるカルス形成率のダイアレル分析. *育雑* 41: 153-162.
- Jähne, A., Lazzeri, P. A., Jäger-Gussen, M. and Lörz, H. 1991a. Plant regeneration from embryogenic cell suspension derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82: 74-80.
- Jähne, A., Lazzeri, P. A. and Lörz, H. 1991b. Regeneration of fertile plants from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.* 10: 1-6.
- Komatsuda, T., Enomoto, S. and Nakajima, K. 1989. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. *J. Heredity* 80: 345-950.
- 小松田隆夫・安中敏男・李文濱・佐藤 洋・榎本末男・姜 岐延・岡 成美. 1992. オオムギ植物体再分化能を高める遺伝子のマッピング. *育雑*42 (別1): 16-17.
- Larsen, E. T., Tuveesson, I. K. D. and Andersen, S. B. 1991. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 82: 417-420.
- Lazar, M. D., Baenziger, 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.

- Lazzeri, P. A., Brettschneider, R., Lührs, R. and Lörz, H. 1991. Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 81: 437-444.
- 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.
- 森 重之・松本静治・中西宏夫. 1992. コムギカルスの植物体再分化能に関するダイアレル分析. 育雑42(別1): 12-13.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ohkoshi, S., Komatsuda, T., Enomoto, S., Taniguchi, M. and Ohyama, K. 1991. Variations between varieties in callus formation and plant regeneration from immature embryos of barley. *Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Resour.* 6: 189-207.
- Petolino, J. F. and Thompson, S. A. 1987. Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.* 74: 284-286.
- 佐藤直子・高橋 進・黒田久夫・木原 誠・岸波 功. 1991. オオムギプロトプラストからの植物体再分化. 育雑41(別2): 246-247.
- 鶴飼保雄. 1989. 量的形質のダイアレル分析のためのパソコン用プログラム DIALL の作成. 育雑39: 107-109.
- Yan, Q., Zhang, X., Shi, J. and Li, J. 1990. Green plant regeneration from protoplasts of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Kexue Tongbao.* 35: 1581-1583.