

# アポポリー性ギニアグラスから単離された アポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* による組換えイネの作出

豊元大希<sup>1</sup>, 関黎明<sup>3</sup>, 杉田 亘<sup>4</sup>, 濱口卓郎<sup>5</sup>, 岡部玲二<sup>5</sup>, 陳 蘭庄<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南九州大学大学院 園芸学・食品科学研究科; <sup>2</sup>南九州大学 環境園芸学科 生物工学研究室;  
<sup>3</sup>宮崎大学 教育文化学部; <sup>4</sup>宮崎県総合農業試験場; <sup>5</sup>宮崎県庁

2016年10月1日受付; 2017年2月1日受理

## Transgenic rice plant regeneration of *ASG-1*, an apomixis-specific gene isolated from apomictic guinea grass (*Panicum maximum*)

Daiki Toyomoto<sup>1</sup>, Liming Guan<sup>3</sup>, Toru Sugita<sup>4</sup>, Takuro Hamaguchi<sup>5</sup>, Reiji Okabe<sup>5</sup>, Lanzhuang Chen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduated School of Horticultural and Food Science, Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki, 885-0035, Japan; <sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology, Faculty of Environmental and Horticultural Sciences, Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo city, Miyazaki, 885-0035, Japan; <sup>3</sup>Faculty of Education and Culture, University of Miyazaki, 1-1, Gakuen Kibanadai, Miyazaki, 889-2192, Japan; <sup>4</sup>Miyazaki Prefectural Agricultural Station, 5805, Shimonaka, Sadowara, Miyazaki, 880-0212, Japan; <sup>5</sup>Miyazaki Prefecture Office, 2-10-1, Tachibanatori-Higashi, Miyazaki, 880-8501, Japan

Received October 1, 2016; Accepted February 1, 2017

In our previous report, *ASG-1*, an apomixis-specific gene has been isolated from apomictic guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). In this study, to sequentially analyze the function of the *ASG-1*, we used the combination of *Agrobacterium*-mediated transformation system and pSMA35H2-NG binary vector for transformation of *ASG-1* to 'Nipponbare' of rice (*Oryza sativa* L.), and its embryo sac analysis of transgenic rice.

In this study, 1) As a preliminary experiment to test the efficiency of the combination of *Agrobacterium*-mediated transformation system and pSMA35H2-NG binary vector,  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene was expressed successfully in calli of rice and guinea grass used as a control. 2) And then, the transgenic rice plants of *ASG-1* were obtained from the culture of matured seed-derived calli using the transformation system same to GUS. 3) The putative transgenic natures of T<sub>0</sub> callus and T<sub>1</sub> rice plants were confirmed by PCR analysis using the primers designed according to the sequences of *ASG-1* and hygromycin B with restricted band patterns.

**Key words:** Apomixis, *ASG-1* (apomixis-specific gene 1), guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.), transgenic rice (*Oryza sativa* L.).

## 緒言

アポミクシスは、母親の遺伝子型だけが子供の世代に伝わる様式である。この形質を実用化すれば、一代

雑種の固定による種子生産のコストダウンや、育種途中の有望な系統の固定による品種育成の年限の大幅な短縮、さらに栄養繁殖性植物の種子繁殖性植物への転換が可能となるなど、「緑の革命」以上の経済効果が期待されている<sup>1-5)</sup>。これまでに著者らの研究室では、イネ科暖地型牧草のギニアグラスを用いて、有性生殖性とアポミクシス性系統の生殖様式をそれぞれ

\*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

観察した。その結果、有性生殖と同様に、大孢子形成までは同じ生殖過程を辿ったが、その後、アポミクシス系統では、大孢子が退化崩壊すると同時に、周りの珠心組織の体細胞が肥大してアポスポリー性胚嚢始原細胞 (AIC) となり、体細胞胚嚢を形成して、また開花当日までに子房が成長し続けている間にその体細胞の数が増え続けていたことを突き止めた<sup>6,7)</sup>。これは有性生殖とアポミクシスとの最も異なる現象を発見したと言える。それはアポミクシス遺伝子の発現と関連があると考えた。その結果をもとに子房長を指標として AIC 出現前後の発育ステージの子房をサンプリングして、Differential screening (DS) 法を用いて AIC ステージ特異的遺伝子 (*ASG-1*) を単離することに成功した<sup>8,9)</sup>。*ASG-1* のアミノ酸配列を用いて相同性検索したところ、種子特異的な RD22 (シロイヌナズナの干ばつ誘導遺伝子)、ソラマメの種子タンパク質先駆物質と関連していることが分かった<sup>10,11)</sup>。*ASG-1* の機能解析を行うため、遺伝子組み換え実験を行う必要がある。今まで、ギニアグラスでは、葉鞘培養<sup>12)</sup>、子房培養<sup>13)</sup>、種子培養<sup>14)</sup> から植物体再生に成功しているが、ギニアグラスの遺伝子組換え方法で実用的で効率の良い方法は確立されていない。一方、ギニアグラスと同じイネ科のイネ (*Oryza sativa*) では、日本イネ<sup>15)</sup> とインドイネ<sup>16)</sup> で、アグロバクテリウム法で形質転換体を得た報告があり、さらに、バイナリベクター pSMA35H2-NG を用いた効率のいいアグロバクテリウム形質転換システムが、Toki et al.<sup>17)</sup> によって確立されている。

本研究は、イネのアグロバクテリウム法 (Dr.Toki, NIAS, Japan) と、pSMA35H2-NG バイナリベクター (kindly provided by Dr.Ichikawa, NIAS, Japan) を用いて *ASG-1* を用いた組換えイネの植物体を得たので報告する。

## 材料及び方法

### 1) 予備実験

予備実験の材料として、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種 '日本晴' と 'アケノホシ' の種子を用いた。

種子を 70% エタノールで表面殺菌し、Tween20 を含む 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 15 分間滅菌、滅菌水で 3 回すすいで洗浄、種子を濾紙に置いて水分を

十分に除去した後、カルス誘導培地 (N6D 培地)<sup>18)</sup> に播種してカルスを誘導した。培養方法は、Toki, et al.<sup>17)</sup> の方法に準じた。そして、培養 4 週間後に GUS 遺伝子導入実験に用いた。

一方、ギニアグラス (*Panicum maximum*) は、南九州大学環境園芸学部附属フィールドセンターの圃場で栽培している有性系統の N68/96-8-o-5, N68/96-8-o-7 と条件的アポミクシス系統の N68/96-8-o-11 の葉鞘をカルス形成に用いた。カルス誘導法は、Chen et al.<sup>19)</sup> の報告に従った。6~8 週間後に GUS 遺伝子導入実験に用いた。

バイナリベクターの pIG121Hm (Fig. 1) と pSMA35H2-NG (Fig. 2) はそれぞれ、名古屋大学 (中村博士) と農業生物資源研究所 (市川裕章博士) に提供していただいた。ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (*hpt*) と、GUS を含む 2 つのベクターを、それぞれアグロバクテリウムの EH101 と GV3101/pMp90 (市川裕章博士提供) の中に導入して、GUS 遺伝子導入に用いた。アグロバクテリウムの感染と除去、GUS 染色は農業生物資源研究所土岐精一博士ならびに市川裕章博士とのパーソナルコミュニケーションにより提供された方法に従って行った。

### 2) pSMA35H2-NG へ *ASG-1* の構築

予備実験で pIG121Hm より pSMA35H2-NG が供試した 2 種類の植物で高い感染率を得た結果から、pSMA35H2-NG を *ASG-1* 遺伝子組換え実験に用いた。*ASG-1* の塩基配列は GenBank/EMBL/DBJ (AB000809) を参照した。pSMA35H2-NG へ *ASG-1* の構築は GUS のカセットを *ASG-1* cDNA と置換した後 (Fig. 3)、その *ASG-1* のカセットをアグロバクテリウム GV3101/pMp90 に導入して組換え実験に供した。

### 3) 遺伝子組換え植物の選抜と植物体再生

'日本晴' の種子を、予備実験と同様の方法でカルス形成に用いた。その後、GV3101/pMp90 と 3 日間共存培養し、カルベニシリン二ナトリウム塩 (CDS) を 500 mg/l 含む滅菌水で洗浄し、除菌した。そして、300 mg/l の CDS と 50 mg/l のハイグロマイシン B を含む N6D 選抜培地へ移植して、30℃、16 時間日長 (3,000 lux) で 4 週間培養 (培養 2 週間で継代培養) を行った。

選抜した遺伝子組換えカルスは、300 mg/l の CDS と

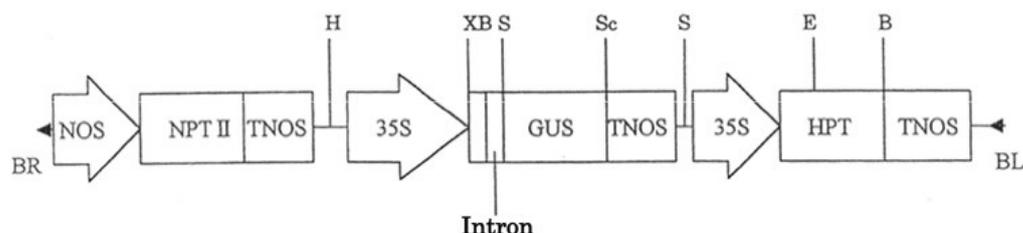


Fig. 1. Diagram of pIG121Hm. LB and BR, T-DNA left- and right-border repeats; NPTII, neomycin phosphotransferase II gene; GUS,  $\beta$ -glucuronidase; HPT, hygromycin phosphotransferase; NOS, neopalanthynthase; 35S, 35S promoter; TNOS, signal of 3'-neopalanthynthase; T35S, signal of 35S 3'-RNA; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; Sc, *Sac*I; X, *Xba*.

50mg/lのハイグロマイシン Bを含む Regeneration III 培地 (Murashige & Skoog 1962) へ移植して、上述と同じ環境下で6週間培養 (培養3週間で継代培養) を行った。

その後、シュートが1cm以上生長したら、ホルモンフリー培地へ移植・培養して、植物が十分に成長したら、ポットに移植して、28℃、16時間日長 (10000lux) で開花・結実させた。T<sub>0</sub>植物から得られた種子は、再播種を行って T<sub>1</sub>植物を形成させた。

#### 4) 遺伝子組換え植物の DNA 分析

上述で得られた形質転換イネの T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>植物の葉とカルスト、アポミクシス系統のギニアグラスのカルスを用いて、DNAミニプレート法でDNA抽出を行った<sup>20)</sup>。

プライマーは *ASG-1* 配列 (Fig. 4; Table 1) とハイグロマイシン B 配列 (Fig. 5; Table 1) に従って設計した。PCRは95℃、1分の後、94℃、30秒、52℃、30秒、72℃、1分を35サイクル行い、最後に72℃、5分、4℃∞で保持した。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電

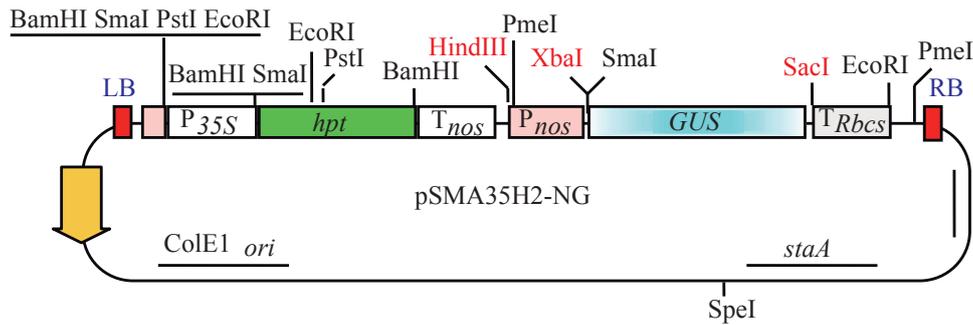


Fig. 2. Diagram of pSMA35H2-NG. *spR*: Spectinomycin/streptomycin resistance gene from Tn7; *staA*: Region involved in plasmid stability from *Pseudomonas* plasmid pVS1; *repA-HC*: replication protein A gene from pVS1 (high-copy type) for plasmid maintenance in *Agrobacterium*; ColE1 ori: ColE1 replication origin from pBR322; TRbcs: Polyadenylation signal from *Arabidopsis RbcS-2B* gene.

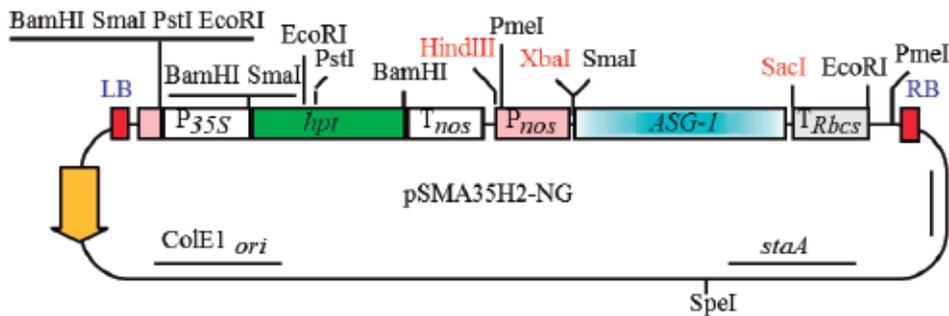


Fig. 3. Construct for *ASG-1* using binary vector of pSMA35H2-NG. *spR*: Spectinomycin/streptomycin resistance gene from Tn7; *staA*: Region involved in plasmid stability from *Pseudomonas* plasmid pVS1; *repA-HC*: replication protein A gene from pVS1 (high-copy type) for plasmid maintenance in *Agrobacterium*; ColE1 ori: ColE1 replication origin from pBR322; TRbcs: Polyadenylation signal from *Arabidopsis RbcS-2B* gene.

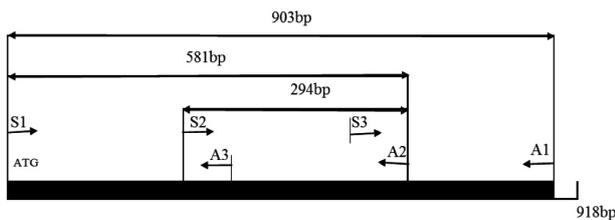


Fig. 4. Locations of the primers designed according to *ASG-1* gene. The primer sequences of A1, A2, A3, S1, S2, and S3 referred from Table 1.

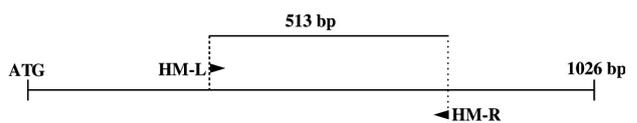


Fig. 5. Locations of the primers designed according to hygromycin B gene. The primer sequences of HML and HMR referred from Table 1.

**Table 1. Primers' sequences designed according to *ASG-1* gene**

Primer name <sup>a</sup>	Sequence (5' → 3')	Length	Tm
<i>ASG-1</i> -S1	atggcattcgtgatggga	18	60.88
<i>ASG-1</i> -S2	gggtaaaccttccccatgt	20	59.92
<i>ASG-1</i> -S3	gttctagcccccgtcattc	19	59.64
<i>ASG-1</i> -A1	cctcttgccaaagatcacg	19	59.38
<i>ASG-1</i> -A2	atcgacggggctagaacct	19	60.99
<i>ASG-1</i> -A3	aggttttaccctcgagcaca	20	59.73
HM-L	cgcaaggaatcggtcaatac	20	60.47
HM-R	tttgtgtacgccgacagt	19	60.17

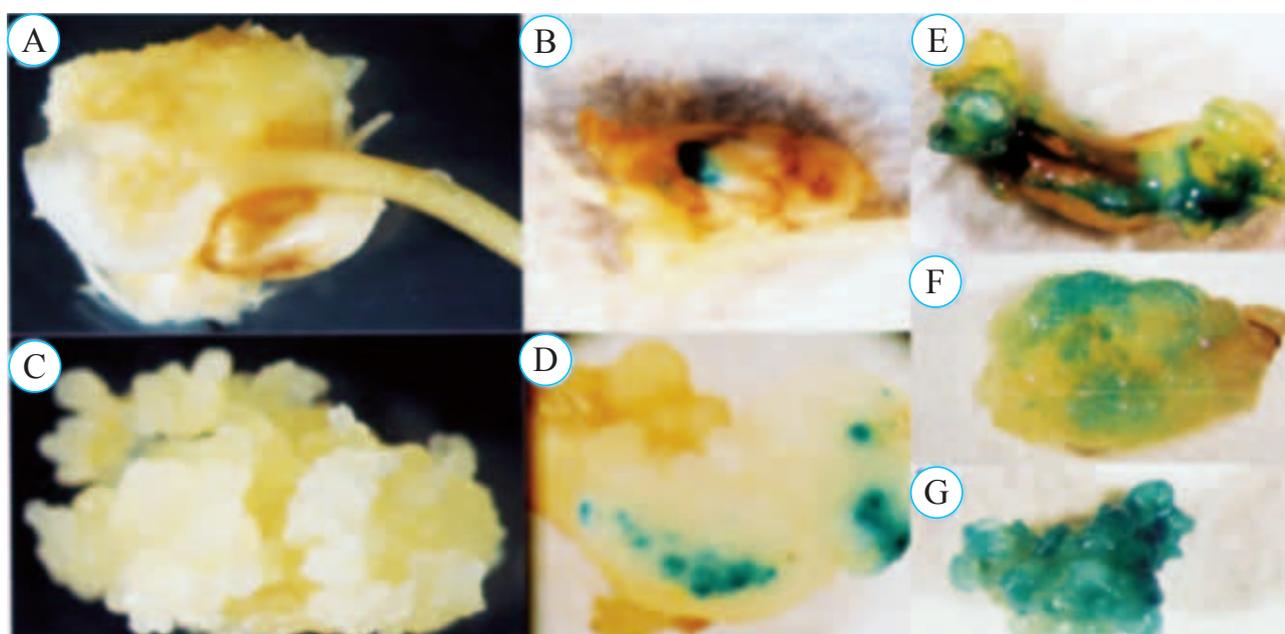
<sup>a</sup>*ASG-1*: apomixis specific gene-1 (Chen *et al.*1999). The primers associated with Fig. 4 and 5

気泳動して、*ASG-1* とハイグロマイシン B の特異的なバンドを観察した。

## 結果および考察

### 1) 予備実験

遺伝子形質転換の効率を確認するために、GUS をレポーター遺伝子として用いた実験では、ベクター2種類とも (Fig. 1 and Fig. 2), イネ種子培養から得られたカルス (Fig. 6 A-B) と胚形成カルス (Fig. 6 C-D) に GUS 発現が見られた。しかし、ギニアグラスのカルスと胚では、pSMA35H2-NG/GV3101/PMP90 を用



**Fig. 6. GUS expression in calli from matured seed culture of rice and leaflets of Guinea grass. A and C: callus and embryogenic callus from seeds of rice; B and D: GUS expression in calli from A and C, respectively; E, F and G: GUS expression in calli in different developmental stages from leaflets of guinea grass, respectively.**

**Table 2. Comparison of expression efficiencies of two kinds of binary vectors on guinea grass and rice using *Agrobacterium* mediated method**

Materials <sup>1)</sup>	pIG120Hm/EHA101		pSMA35H2-NG/GV3101/PMP90	
	No. cali	No. expressed (%)	No. cali	No. expressed (%)
Guinea grass				
N68/96-8-o-7(S)	67	0 (0)	48	36 (75.0)
N68/96-8(S)	55	0 (0)	32	12 (37.5)
N68/96-8-o-11(A)	30	0 (0)	24	17 (70.8)
Rice				
'Nipponbare'	75	37 (49.3)	82	58 (70.7)
'Akenohoshi'	95	62 (65.3)	92	68 (73.9)

<sup>1)</sup> For guinea grass, all are the accessions, and S means sexual and A apomictic accessions. And for rice, they are the varieties

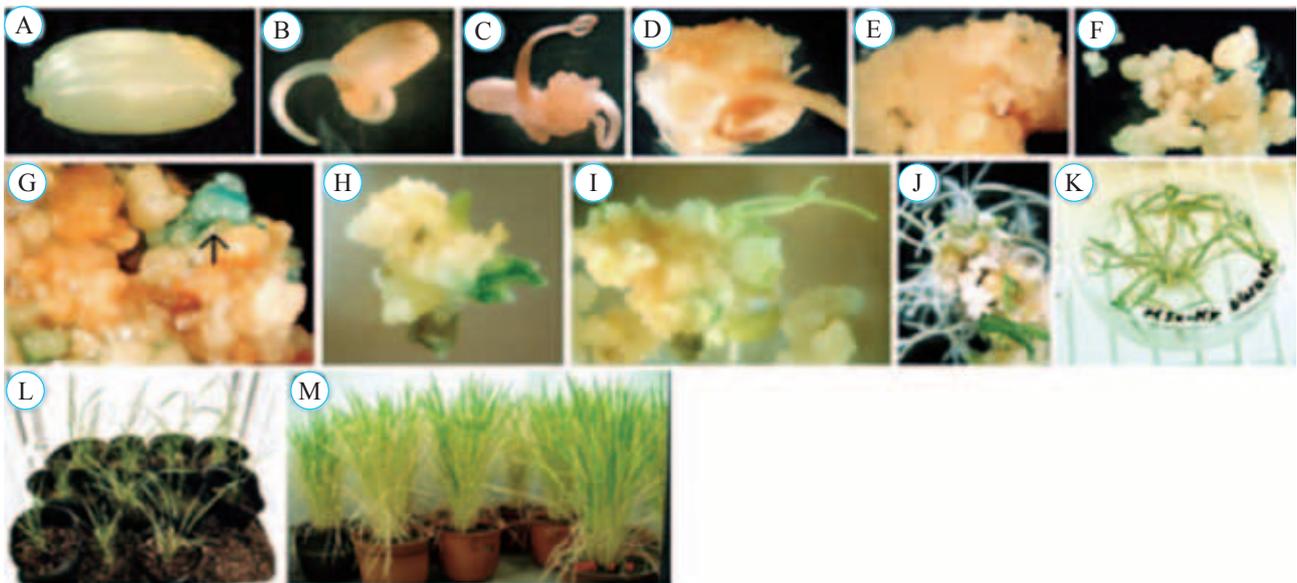


Fig.7. Plant regeneration and morphologies of transgenic rice of *ASG-1* from matured seeds. A-E: Callus formation from matured rice seeds cultured on N6D medium; F: Calli used for transformation of GUS and *ASG-1*; G: GUS expression in calli; H-J: *ASG-1* transgenic rice regenerated on regeneration medium; L-M: Transgenic plants growing and ripening.

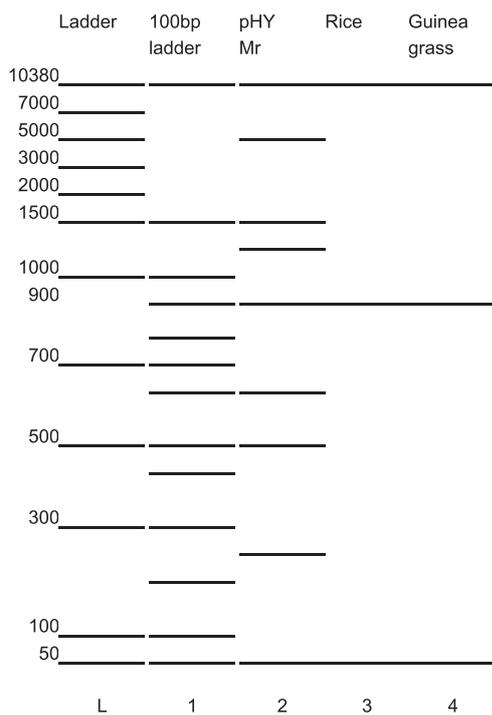


Fig. 8. Detection of *ASG-1* in recombinant calli of guinea grass and rice by PCR analysis. Lanes L, 1, 2 were size markers; Lanes 3, 4 were recombinant rice and guinea grass, respectively.

いた系で GUS の発現が見られたが (Fig. 6 E, F, G), pIG120Hm/EHA101 系では見られなかった。さらに、感染率を調査すると、pIG120Hm/EHA101 を用いた場合、ギニアグラスのいずれもの系統でも 0% で、イネ

の 2 品種では、49.3% ~ 65.3% であった。pSMA35H2-NG/GV3101/PMP90 を用いた場合、ギニアグラスでは、37.5% ~ 75.0% で、イネでは、70.7 ~ 73.9% であった。pIG120Hm/EHA101 よりも pSMA35H2-NG/GV3101/PMP90 の発現率が高いことがわかった (Table 2)。

これらの結果から pSMA35H2-NG/GV3101/PMP90 形質転換系は、イネとギニアグラスの両方に適用できることが示されたため、それを *ASG-1* 遺伝子組換えに用いた。いままでに、トールフェスク<sup>2)</sup> など他の牧草では成功しているが、ギニアグラスで十分に働くアグロバクテリウム法は確立していないため、これらの結果は、これからのギニアグラスの形質転換実験に重要な情報となるであろう。

## 2) *ASG-1* 遺伝子組換えイネの植物体再生

イネの完熟種子を N6D 培地で培養 3 ~ 4 週間 でカルスを誘導した (Fig. 7 A-D)。その後、さらに 3 週間培養を行った後、20% のカルスの表面が白く、コンパクトで多数の胚様態を含む胚形成カルスが誘導された (Fig. 7 E-F)。この際、感染効率を確認するために、これらのカルスの一部を GUS 実験に用いた結果、表面上に青い斑点が現れた (Fig. 7 G)。ここで予備実験と同じ効果が得られることを確認できた。その後、残ったカルスを *ASG-1* 組換え実験に用いて、Regeneration III 培地に移植した。そして、シュートが現れ、植物体に生長した (Fig. 7 H-K)。鉢あげしたのち、グロースチャンバーの中で順化して栽培した (Fig. 7 L-M)。

## 3) PCR による組換えイネでの *ASG-1* とハイグロマイシン遺伝子の確認

まず、A1 と S1 のプライマー (Table 2) を用いて、遺伝子組換えイネ T<sub>0</sub> と N68/96-8-o-11 のカルスから

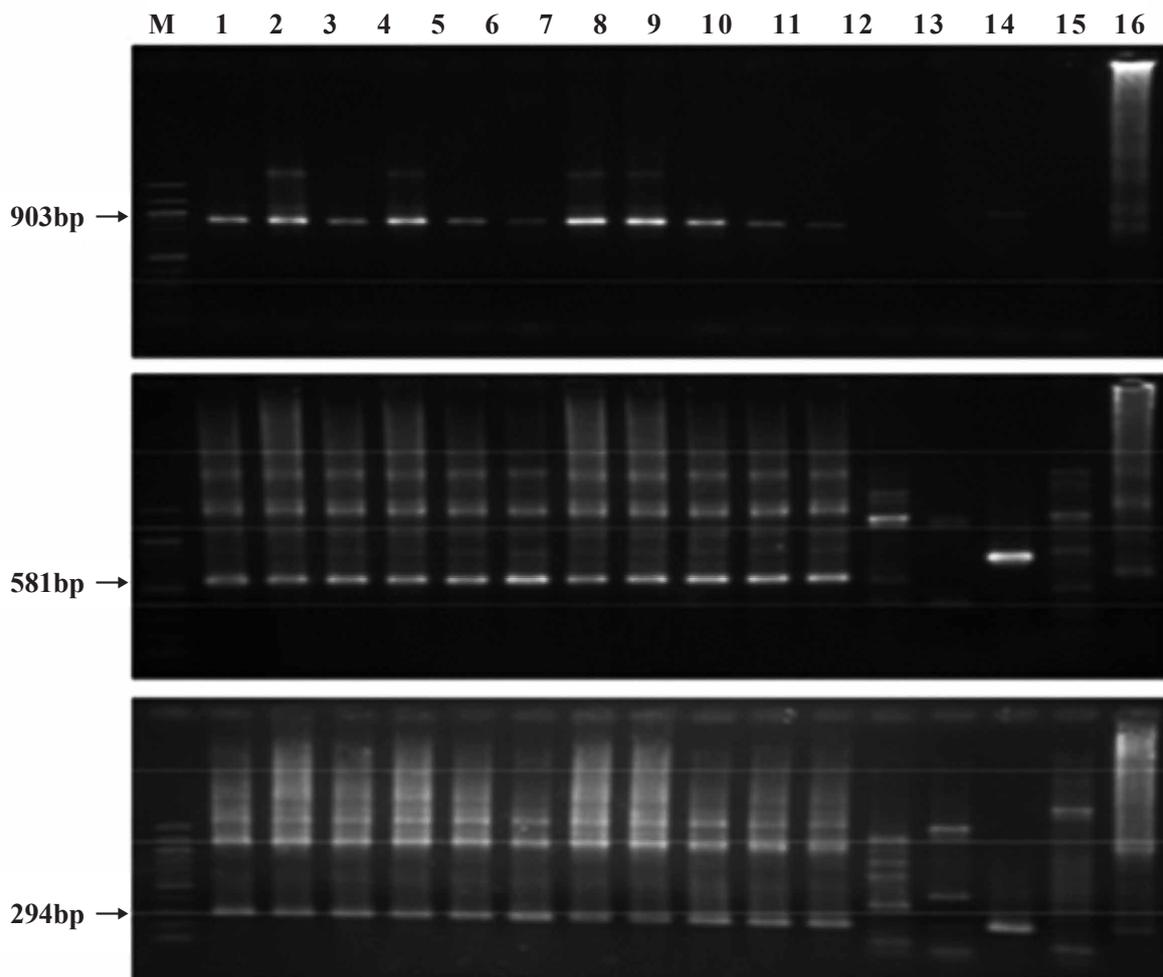


Fig. 9. *ASG-1* specific band patterns in PCR products of transgenic rice plants based on the primers of S1 and A1, S1 and A2, and S2 and A2, respectively (Fig. 4). Lane M: 100 bp ladder; lane 1 to 11: transformant No.; lane 12: guinea grass N68/96-8-4-16; lane13: guinea grass N68/96-8-0-7; lane14: guinea grass N68/96-8-0-11; lane15: guinea grass N68/96-8-0-5; lane16: plasmid (pSMA134S2).

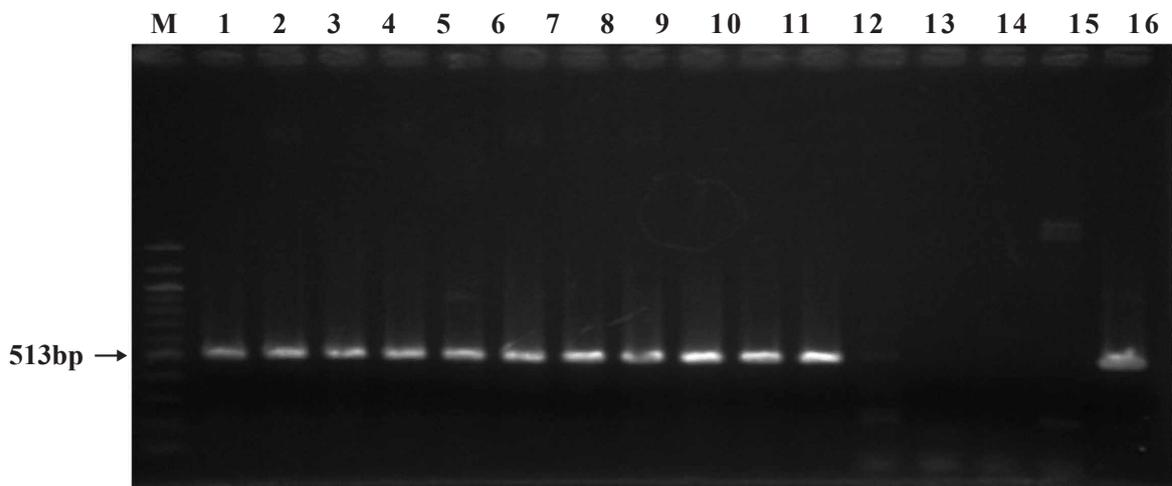


Fig. 10. Hygromycin B specific band patterns, and randomly band patterns in region between Hygromycin B and *ASG-1* in PCR products of transgenic rice plants based-on the primers in Fig. 5. Lane M: 100 bp ladder; lane 1 to 11: transformant No.; lane 12: guinea grass N68/96-8-4-16; lane13: guinea grass N68/96-8-0-7; lane14: guinea grass N68/96-8-0-11; lane15: guinea grass N68/96-8-0-5; lane16: plasmid (pSMA134S2)

抽出した DNA を PCR に用いたところ、*ASG-1* 特異的なバンドがそれぞれのサンプルから検出され、遺伝子導入されたことが示唆された (Fig. 8)。

続いて、イネの T<sub>1</sub> 遺伝子組換え植物を用いて PCR を行った。その結果、S1 と A1 の間で 903 bp、S1 と A2 の間で 581 bp、S2 と A2 の間で 294 bp の *ASG-1* 特異的なバンドがそれぞれ得られた (Fig. 9)。HML と HMR の間でハイグロマイシン B の特異的なバンドが 513 bp あたりで現れた (Fig. 10)。

今回得られた遺伝子組換えイネとその後代の形態学的変化について、引き続き観察を行うと同時に、今回確立できた *ASG-1* 遺伝子導入システムを用いて *ASG-1* の機能解析を行うため、有性生殖のギニアグラスに *ASG-1* の導入実験を実行中である<sup>21)</sup>。

## 要 約

これまでに本研究室でイネ科暖地牧草であるギニアグラスから単離したアポミクシス性特異的遺伝子 *ASG-1* の機能解析を行うため、本実験では、アグロバクテリウム法と、pSMA35H2-NG バイナリベクターを用いて *ASG-1* 組換えイネの植物体再生を試みた。その結果、1) 予備実験では、アグロバクテリウム法と pSMA35H2-NG バイナリベクターを組み合わせた試験で、 $\beta$ -glucuronidase (GUS) リポーター遺伝子は、イネとギニアグラスで発現することが確認できた。2) そして、GUS と同じ形質転換システムを用いて、完熟種子由来カルスの培養で *ASG-1* 遺伝子組換えイネを得た。3) T<sub>0</sub>カルスと T<sub>1</sub>イネに *ASG-1* の有無の確認は、*ASG-1* とハイグロマイシン B の塩基配列に従って設計したプライマーを用いた PCR によってそれぞれの特異的なバンドを確認した。本研究で得られたこれらの技術は今後の *ASG-1* を用いた機能解析に重要な手段となると考える。

## 謝 辞

本研究の組換え実験で使ったバイナリベクターの pIG121 Hm と pSMA35H2-NG はそれぞれ名古屋大学 (中村博士) と 農業生物資源研究所 (市川博士) に提供していただいた。また、イネのアグロバクテリウムの感染、除去および GUS 染色は農業生物資源研究所土岐博士ならびに市川博士から提供されたプロトコールを使用した。ここに深く感謝の意を申し上げる。

## 参考文献

- 1) Ravi, M., Marimuthu, M.P.A., Siddiqi, I. (2008) Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature* **451**: 1121-1124.
- 2) Asker, S.E. (1979) Progress in apomixis research. *Hereditas* **91**: 231-240.
- 3) Nakajima, K., Mochizuki, N. (1983) Degrees of sexuality in sexual plants of guineagrass by the simplified embryo sac analysis. *Jpn J Breed.* **33**: 45-54.
- 4) Nogler, G.A. (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed) : Embryology of angiosperm. Springer-Verlag, Berlin, pp.475-518.
- 5) Bicknell, R.A., Koltunow, A.M. (2004) Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* **16**: S228-S245.
- 6) Chen, L.Z., Kozono, T. (1994a) Cytology and quantitative analysis of aposporous embryo sac development in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 253-260.
- 7) Chen, L.Z., Kozono, T. (1994b) Cytological evidence of seed-forming embryo development in polyembryonic ovules of facultatively apomictic guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Cytologia* **59**: 351-359.
- 8) Chen, L.Z., Miyazaki, C., Kojima, A., Saito, A., Adachi, T. (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during the period of aposporous embryo sac initial cell appearance in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *J Plant Physio.* **154**: 55-62.
- 9) Chen, L.Z., Guan, L.M., Seo, K., Hoffmann, F., Adachi, T. (2005) Developmental expression of *ASG-1* during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). *J Plant Physio.* **162**: 1141-1148.
- 10) Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* **238**: 17-25.
- 11) Baumlein, H., Boerjan, W., Bassuner, R., van Montagu, M., Inze, D., Wobus, U. (1991) A novel seed protein gene form *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet.* **25**: 459-467.
- 12) Chen, L.Z., Okabe, R., Guan, L.M., Adachi, T. (2002) A simple and efficient culture of leaflets for plant regeneration in guineagrass (*Panicum maximum*). *Plant Biotech.* **19** (1): 63-68.
- 13) Chen, L.Z., Okabe, R., Hamaguchi, T., Guan, L.M., Adachi, T. (2002) Effect of harvest seasons on the efficiency of ovary culture in *Panicum maximum*. *Plant Biotech.* **19**: 173-179.
- 14) Chen, L.Z., Nishimura, Y., Umeki, K., Zhang, J., Xu, C.T. (2015) Establishment of a Simple Plant Regeneration System Using Callus from Apomictic and Sexual Seeds of Guinea Grass (*Panicum maximum*). *British Biotech J.* **7**: 183-190.
- 15) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.)

- mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**: 271-282.
- 16) Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K., Hinata, K. (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. *Plant Cell Reports* **15**: 727-730.
- 17) Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tajiri, A., Oka, S., Tanaka, H. (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* **47**: 969-976.
- 18) Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.C., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* **18**: 659-668.
- 19) Chen, L.Z., Anami, E., Guan, L.M., Adachi, T. (2001) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of "Nanou" bahiagrass. *Plant Biotech.* **18**: 119-123.
- 20) Gotou, Y. (2005) Extraction method of DNA and RNA for Arabidopsis. Pp. 90-92. In: Okada T, Shimamoto K, Tabata T (eds.): Protocols for model plants (Rice, *Arabidopsis* and Legume). Shujunsha, (in Japanese)
- 21) Nishimura, Y., Umeki, K., Zhang, J., Xu, C.T., Chen, L.Z. (2015) The functional analysis of apomixis specific genes: Establishment of plant regeneration system using callus induced from seeds of guineagrass (*Panicum maximum*). *Bull Minami Kyushu U.* **45**: 9-16.
- 22) Wang, ZY. (2009) Toll fescue for the twenty-first century (Fribourg HA et al., eds.), *Agronomy Monograph.* **53**: 398-406.