

## 野生보리(*Hordeum bulbosum*)의 主要 特性 및 이를 利用한 보리 半數體育成

鄭東熙\* · 閔庚洙\*\* · 千鍾殷\*\*\*

### Major Characteristics of *Hordeum bulbosum* and Haploid Production of Cultivated Barley by Pollinating with *H. bulbosum* L.

Dong Hee Chung\* · Kyung Soo Min\*\* and Jong Un Chun\*\*\*

**ABSTRACT** : Bulbosum method, which haploids are developed by pollinating with *H. bulbosum* have been productive to be recommended as an effective method for the production of genetically stable normal barley hybrids.

The purpose of this study is to investigate several characters of *H. bulbosum*, seed set and embryo development rate pollinated with *H. bulbosum* in order to establish a method for improvement of embryo development and to find conditions favoring plant development from the embryos cultured *in vitro*.

Three lines of *H. bulbosum* used as pollinators; GBC(2X), Spanish diploid(2X) and var. Jaaska (4X) were morphologically similar, having characteristically narrow leaves, narrow and long culms, long spikes and anthesis duration in comparison with *H. vulgare*.

*H. bulbosum*, var. Jaaska(4X) on being pollinated to barley cultivars, increased embryo formation by 8% and plant development *in vitro* by three times compared to the other diploid lines.

the plants developed were not normal barley hybrids but had some *H. bulbosum* chromosomes uneliminated, indicating that the line was unstable as a pollinator to induce barley haploids.

**Key word** : *H. bulbosum*, Embryo development, Pollinator, Barley haploid

半數體를 利用한 育種法은 短期間에 目的形質을 固定시킬수 있는 利點이 있으며, 대부분의 作物에서는 주로 藥을 培養하여 半數體를 얻고 있으나 밀, 보리에서는 野生보리인 *Hordeum bulbosum*을

利用한 “Bulbosum method”가 Kasha<sup>9)</sup>에 의해 提案된 이래 많은 研究가 되고 있다<sup>7,8,16)</sup>. 그 後에 染色體 消失機作, 半數性 幼胚의 形成率 增進에 關한 研究<sup>6,14)</sup>가 遂行되었다. “Bulbosum method”

\* 作物試驗場 木浦支場(Crop Experiment Station, Mokpo Branch, RDA, Muan, 534-830, Korea)

\*\* 全南大學校 農科大學(Coll. of Agric., Chunnam Natl. Univ., Kwangju 500-757, Korea)

\*\*\* 順天大學校 農科大學(Coll. of Agric., Suncheon Natl. Univ., Suncheon 540-742, Korea)

〈'94. 1. 12 接受〉

## 材料 및 方法

의 長點은 거의 모든 品種에서 半數體의 獲得率이 높고, 交配組合內의 出現 가능한 遺傳子型이 任意로 발생되므로 取扱 集團規模가 적어도 되며, 半數體 識別이 容易하고 幼胚를 培養하기 때문에 異數體가 없는 正常的인 半數體가 生成되는 長點이 있어 다른 半數體를 利用한 育種法의 缺陷을 더 改善할 수가 있다는 점이다. 反面에 *H. bulbosum*의 維持, 管理 및 交配時期의 調節과 個體數 確保의 制限等 短點도 있다<sup>7,10</sup>.

*H. bulbosum*의 特性은 永年生으로 自家不和合성이 강한 他家受精作物이며 出穗期에 基部節間에 1~2個의 단단한 bulb가 생기므로 分株에 의해서 固有特性의 維持가 可能하다<sup>7</sup>.

兩親中 *H. bulbosum* 染色體의 消失頻도가 높으나 *H. vulgare* 染色體도 적게나마 消失될 可能性이 있다는 報告<sup>5,12</sup>와 4,000여 個體를 調査한 結果 99%가 *H. vulgare* 染色體만의 半數體이고 나머지가 *H. bulbosum* 染色體의 一部가 添加된 狀態란 報告<sup>16</sup>, *H. bulbosum* 쪽에서만 選擇적으로 일어난다는 報告等<sup>1,13</sup>이 있으나 後者の 見解가 支配的인 것으로 생각된다. *H. bulbosum* 染色體의 消失機作은 有絲分裂 cycle time의 相異<sup>11,12</sup>, endonuclease에 의한 染色體의 分解<sup>3</sup>, 蛋白質代謝機能의 異常<sup>1</sup>, 遺傳子 등의 作用으로 報告되어 있다. 또한 染色體의 消失에 兩親의 genome balance가 중요한 役割을 하여 *H. vulgare*와 *H. bulbosum*의 genome이 1:2의 境遇는 染色體가 安定되나 1:1의 境遇는 *H. bulbosum* 染色體의 生存力이 낮아 消失된다고 하였다<sup>8,12,16</sup>. 染色體의 消失은 交雜種 胚의 發生初期에서 *H. bulbosum*의 染色體가 점진적으로 消失되어 대체로 受粉後 3일에 50%程度가 進行되고 11日頃에는 完了된다고 하였다<sup>1,16</sup>.

Jensen<sup>7</sup>과 Kasha & Reinbergs<sup>10</sup>에 의하면 半數性 種實 形成率은 5~50%로서 金후 더욱 增進될 餘地가 있다고 展望하였다.

本 研究는 *Hordeum bulbosum*을 利用한 보리 半數體의 生産效率을 增進시키는데 必要한 基礎資料를 얻고자 優先 *Hordeum bulbosum*의 稈, 이삭, 花器의 特性, 結實 및 幼胚 形成率等을 調査한 結果를 報告하는 바이다.

本 研究는 1986年 1月부터 1989年 6月까지 前 麥類研究所 溫冷調節溫室 및 組織培養室에서 遂行되었다. 供試材料中 野生보리(*Hordeum bulbosum*)의 2倍體인 GBC는 Canada의 Guelph大學으로부터 種子 4粒이 分讓, 增殖되었으며, Spanish diploid (Sp. D.)은 Canada의 The Plant Gene Resources에서, 4倍體인 var. Jaaska는 麥類研究所 小麥育種 研究室로부터 分讓, 增殖하여 使用하였다. 栽培種 보리는 겉보리, 쌀보리, 맥주보리 各 1品種씩 使用하였으며 野生보리 GBC와 var. Jaaska를 各各 交配하여 結實率 및 植物體 再分化率等을 調査하였다.

*H. bulbosum*은 4月 中旬에 野外에서 分株, 增殖되어 春化處理 된후 12月 上旬부터 母本과의 開花時期를 調節하기 위해서 10日 間隔으로 溫室에 數回 옮겼다. 栽培種 보리는 9月 上旬 野外에 播種하여 12月 上旬에 溫室로 옮겼다.

交配期間中 溫室溫度는 晝·夜間 20~25℃/15±2℃로 維持하고 除雄은 切穎法으로, 受粉은 除雄後 3~4일에 午前에 實施하였다. GA<sub>3</sub> 75ppm을 小型噴霧器로 受粉翌日부터 2日間 2回 噴霧하였다<sup>15</sup>. 染色體를 倍加 하기위한 colchicine處理는 Jensen의 方法<sup>7</sup>으로 植物體의 根冠部位를 침적하였다.

胚培養은 受粉後 15~21일에 이삭을 採取하여 穎을 除去하고 2% hypochlorite에 2~3分, 70% alcohol에 1分間 침적후 殺菌水로 3回 洗滌하였다. 採取된 幼胚를 B5培地<sup>8</sup>를 基本培地로 培養하였다. 培養條件은 螢光 lamp로 照度 2,500lux에 24時間 照明하고 溫度는 20℃로 하였다.

同位酵素 banding方法은 6% polyacrylamide gel에 等電點 電氣泳動法<sup>4</sup>을 利用하였다.

## 結果 및 考察

### 1. *Hordeum bulbosum*의 主要 形質 特性

*Hordeum bulbosum*은 寫眞 1에 나타난 바와 같이 全體의인 草型이 “冬보리 1號”와 顯著히 다르고

GBC(2X)와 var. Jaaska(4X)間에도 多少의 差異가 있었다. var. Jaaska는 草勢의 強健性이나 葉幅 및 葉長, 稈의 굵기 등이 GBC에 비하여 컸다. 이



Pho. 1. Plants of *H. vulgare*, cv. Dongbori 1, and *H. bulbosum*, GBC(2X) and var. Jaaska(4X).

Table 1. Culm and spike characteristics of *H. bulbosum* and *H. vulgare*

Line or cultivar	Culm length (cm)	Culm diam (mm)	Spike length (cm)	Rachis internode length (mm)	Kernels per spike (no.)
<i>H. bulbosum</i>					
GBC(2X)	110	2.6	9.1	3.1	107
Sp.D.(2X)	118	2.5	11.2	2.9	113
var. Jaaska(4X)	97	2.8	10.6	2.4	107
<i>H. vulgare</i>					
Dongbori 1	82	3.8	3.8	2.1	46

Table 2. Floral characteristics of *H. bulbosum*

Line or cultivar	Lemma length /width(mm)	Anther length (mm)	Filament length (mm)	No. of pollen grains*	Anthesis in a spike (day)
<i>H. bulbosum</i>					
GBC(2X)	9.4/2.3	4.3	10.0	23	7~8
Sp. D. (2X)	10.9/2.3	5.1	8.8	30	7~8
var. Jaaska(4X)	10.3/3.0	5.0	8.4	27	6~7
<i>H. vulgare</i>					
Dongbori 1	9.8/2.7	2.1	10.0	10	2~3

\* Numbers within a vision under microscope(150X) prepared by suspending the pollen grains of 15 anthers in 5ml water.

러한 特性은 Chen 等의 報告<sup>2)</sup>와 類似하였다. 이삭의 形態는 “冬보리 1號”에 비하여 種實의 크기가 顯著히 작았고 까락이 가늘고 짧아 이삭만을 볼 때에는 보리 보다는 호밀에 가까운 形態였다.

*H. bulbosum*은 “冬보리 1號”에 비하여 稈의 굵기는 가는 反面, 稈長이 길며 穗長은 3倍 以上 길고 穗軸節間은 큰 差異가 없어 이삭當 穎花數가 2倍 以上 많은 結果를 보였으나(表 1), *H. bulbosum*의 GBC와 var. Jaaska間에는 큰 差異가 없었다.

外穎의 長幅은 큰 差異가 없었으나 葯의 길이는 “冬보리 1號”가 2.1mm인데 반하여 *H. bulbosum*들은 4.3mm 以上으로 2倍 以上 길었다(表 2, 寫眞 2).

葯內의 花粉數는 15個의 葯을 5ml의 물에 懸濁하여 顯微鏡(150X)의 1 視野當 숫자를 調査한 바 “冬보리 1號”가 10個인 것에 비하여 *H. bulbosum*은 23個 以上으로 역시 2倍 以上 많았고, 1穗當 開花 期間은 “冬보리 1號”가 2~3日인데 반하여 *H. bulbosum*은 6日 以上으로 길었는데 이는 表 1에 나타난 바와 같이 穗長이 길고 穎花數가 顯著하게 많은데 基因된 것으로 생각되었다. 한편 암술의 珠頭가 顯著히 發達된 것이 *H. bulbosum*의 또 하나의 特徵이었다.

寫眞 3은 *H. bulbosum*과 *H. vulgare*의 同位酵素의 差異를 比較하기 위하여 未熟種子를 材料로 等電點 電氣泳動<sup>4)</sup>을 한 結果이다.

Peroxidase는 높은 pH에서 major band가 뚜렷하고, minor band가 細分化 되었는데 esterase는 반대로 낮은 pH에서 그와 비슷한 樣相을 보였으나, peroxidase가 *H. bulbosum*과 *H. vulgare*의 差異를 區別하는데 더 效果的인 것으로 觀察되었다.

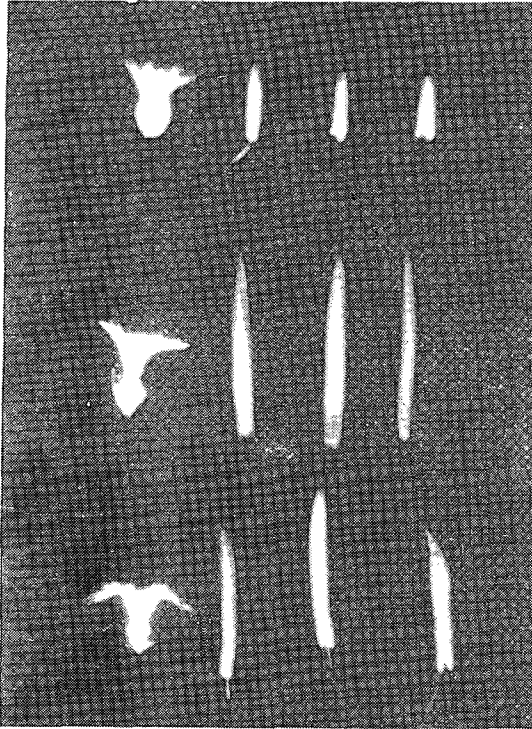


Photo 2. Pistil and anther of *H. bulbosum* and *H. vulgare*. Top: Dongbori 1, Middle: var. Jaaska(4X), Bottom: GBC(2X).

Peroxidase에 의한 band를 觀察해 보면 major band의 境遇 *H. bulbosum*은 8個(2,5,9,11,14,15, 16,17番)인데 반하여 *H. vulgare* 3個(5,11,15番) 뿐이었고, minor band의 境遇도 *H. bulbosum*은 比較的 뚜렷한 band가 9個인 것에 반하여 *H. vulgare*의 特徵이었다.

寫眞 3은 *H. bulbosum*과 *H. vulgare*의 同位酵素의 差異를 比較하기 위하여 未熟種子를 材料로 等電點 電氣泳動<sup>4)</sup>을 한 結果이다.

Peroxidase는 높은 pH에서 major band가 뚜렷하고, minor band가 細分化 되었는데 esterase는 반대로 낮은 pH에서 그와 비슷한 樣相을 보였으나, peroxidase가 *H. bulbosum*과 *H. vulgare*의 差異를 區別하는데 더 效果的인 것으로 觀察되었다.

Peroxidase에 의한 band를 觀察해 보면 major band의 境遇 *H. bulbosum*은 8個(2,5,9,11,14,15,

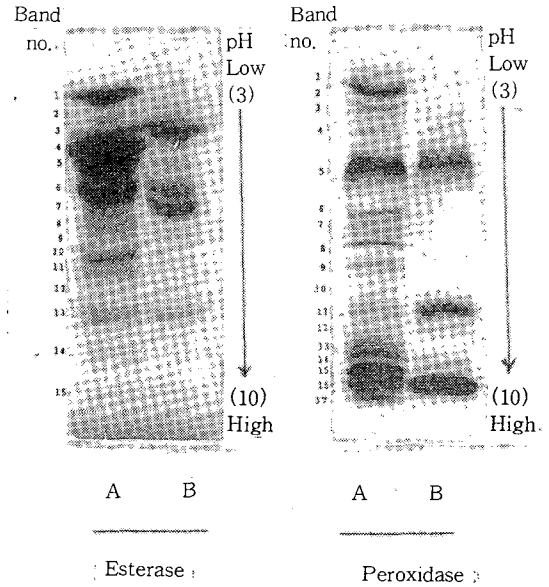


Photo 3. Esterase and peroxidase zymograms of immature grains of *H. bulbosum* and *H. vulgare* by isoelectric focusing. A: *H. bulbosum*, GBC(2X), B: *H. vulgare*, cv. Dongbori 1.

16,17番)인데 반하여 *H. vulgare* 3個(5,11,15番) 뿐이었고, minor band의 境遇도 *H. bulbosum*은 比較的 뚜렷한 band가 9個인 것에 반하여 *H. vulgare*는 4個 程度였으며 특히 6番에서 10番 사이에는 거의 band의 痕跡을 찾아볼 수 없는 것이 特徵이었다.

이와 같이 *H. vulgare*와 *H. bulbosum*의 뚜렷한 band의 差異는 相互形質의 轉移與否를 追跡하고 判定하는 手段으로도 活用될 수 있을 것으로 期待 된다.

## 2. *H. bulbosum*과 栽培보리와와 交雜種의 幼胚形成率

*H. vulgare*의 3品種을 母本으로 2種의 *H. bulbosum*을 父本으로 한 人工受粉에서 얻은 種實 및 幼胚形成率은 表 3과 같다. 여기서 種實이라 함은 幼胚形成과는 關係없이 子房壁이 肥大하여 자란 것을 말하며, 種實 形成率은 GBC의 89%에 비하여 var. Jaaska는 72%였으나 幼胚 形成率은 GBC가 23%인 반면에 var. Jaaska는 31%로서 相反된

Table 3. Seed set and embryo development in *H. vulgare* pollinated with *H. bulbosum*

Pollination		No. of florets	Seed set		Developed embryos		Shrivelled seeds	
<i>H. vulgare</i>	<i>bulbosum</i>	pollinated(A)	No.(B)	%(B/A)	No.(C)	%(C/B)	No.(D)	%(D/B)
Olbori	GBC(2X)	1,354	1,131	84	192	17	939	83
	Yeongsanbori	2,207	2,027	92	523	26	1,504	74
	Sacheon 6	237	207	87	57	28	150	72
	Total	3,798	3,365	89	772	23	2,593	77
.....								
Olbori	var. Jaaska(4X)	360	242	67	60	25	182	75
	Yeongsanbori	885	447	51	162	36	285	64
	Sacheon 6	986	910	92	279	31	631	69
	Total	2,231	1,599	72	501	31	1,098	69
Grand total		6,029	4,964	82	1,273	26	3,691	74

Table 4. Plant generation from *in vitro* of haploid or hybrid embryos in *H. vulgare* pollinated with *H. bulbosum*

Pollination		No. of embryos cultured	Generated plants		Remarks*
<i>H. vulgare</i>	<i>bulbosum</i>		Number	Rate(%)	
Olbori	GBC(2X)	192	63	33	haploid
	Yeongsanbori	523	210	40	haploid
	Sacheon 6	57	18	32	haploid
	Total	772	291	38	
.....					
Olbori	var. Jaaska(4X)	60	51	85	hybrid
	Yeongsanbori	162	137	85	hybrid
	Sacheon 6	279	232	83	hybrid
	Total	501	420	84	
Grand total		1,273	711	56	

\* Haploid or hybrid was authenticated by Jensen's method.

결과를 보였고 種實의 shrivelling率도 var. Jaaska가 낮았다. 반면 *H. vulgare*는 品種間에 差異가 뚜렷하지 않았다. 이와 같이 4倍體인 var. Jaaska가 花粉親으로 사용된 境遇 幼胚形成率이 높은 것은 *H. vulgare*와 *H. bulbosum*의 genome比가 1:2로 될 때는 *H. bulbosum*의 染色體가 消失되지 않는다<sup>8,16)</sup>고 하였는데 이로 因하여 胚活力이 相對的으로 增大된 때문일 것으로 생각되었다.

表 3에서 얻어진 胚를 培養하여 植物體 發生率과 그 植物體가 半數體 혹은 *H. bulbosum* 染色體의 一部가 添加된 것인지의 與否를 調査한 結果는 表 4와 같다. GBC를 花粉親으로 受粉한 植物體의 發

生率은 38%, var. Jaaska를 花粉親으로 受粉한 境遇는 84%로 2.9배가 높았으며, *H. vulgare*는 品種間에 僅少한 差異를 보였다.

한편 幼胚로부터 發生된 植物體를 Jensen의 方法<sup>7)</sup>에 의하여 同定하였던 바 GBC로 受粉한 것은 모두 *H. vulgare*의 正常 半數體인데 반하여 var. Jaaska로 受粉한 境遇는 모두가 *H. bulbosum*의 染色體 一部를 保有하고 있었다. 이러한 現象은 다른 研究者들<sup>8,10,11,12,13,16)</sup>이 밝힌 *H. vulgare*와 *H. bulbosum*의 genome balance가 1:1일 때는 *H. bulbosum* 染色體가 消失되나 그 比가 1:2가 되면 *H. bulbosum* 染色體의 消失이 어렵다는 事實이 우리나라의 品種에서도 同一하게 나타남을 立證하고 있다.

## 摘 要

*Hordeum bulbosum*에 의한 보리 半數體 利用育種은 短期間에 目的 形質을 固定하는 一般의인 利點 外에 細胞學的으로 安定된 많은 半數體를 容易하게 얻을 수 있는 可能性이 있기 때문에 이 方法의 實用化을 提高하기 위한 方法을 體系化하기 위해 一連의 實驗을 實施하였으며 優先, *H. bulbosum*의 여러 形質의 特性 및 栽培種과의 交配時 幼胚形成率等を 調査하였다.

*H. bulbosum*은 *H. vulgare*에 비하여 稈이 가늘고 稈長이 길며 細葉이나, 穗長이 길고 穗當穎花數가 2倍以上 많으며 穗當開花日數가 3倍以上 길었으

며, *H. bulbosum*間에는 差異가 적었다.

*H. bulbosum*中 4倍體는 2倍體에 비하여 幼胚形成率은 8%, 植物體 發生率은 2倍以上 높으나 染色體의 一部가 완전히 消失되지 않으므로 보리의 半數體를 利用한 育種에는 活用할 수 없는 것으로 認定되었다.

## 引用文獻

1. Bennett, M. D., R. A. Finch, and I. R. Barclay. 1976. The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma*(Berl.) 54:175-200.
2. Chen, S. L., S. M. Chen, and P. S. Tang. 1945. Studies on colchicine induced autotetraploid barley. I and II. Cytological and morphological observations. *Amer. J. Bot.* 32:103-106.
3. Davies, D. R. 1974. Chromosome elimination in interspecific hybrids. *Heredity* 32:267-270.
4. Eun, M. Y., Y. G. Cho, and T. Y. Chung. 1988. Variation of esterase isozymes in rice(*Oryza sativa* L.) by isoelectric focusing. *Res. Rept. RDA(B)* 30(1): 21-25.
5. Fukuyama, T. and R. Takahashi. 1976. A study of the interspecific hybrid, *Hordeum bulbosum*(4X)×*H. vulgare*(4X), with special reference to dihaploid frequency. *Barley Genetics* III: 351-316.
6. Inagaki, M. 1985. Chromosome doubling of the wheat haploids obtained from crosses with *Hordeum bulbosum* L. *Japan. J. Breed.* 35:193-195.
7. Jensen, C. J. 1976. Barley monploids and doubled monploids: Techniques and experiences. *Barley Genetics* III: 316-345.
8. Kao, K. N. and K. J. Kasha. 1970. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. *Barley Genetics* II: 82-88.
9. Kasha, K. J. and E. Reinbergs. 1972. The haploid technique in barley breeding. *Tech. Quart.* 9:128-130.
10. Kasha, K. J. and E. Reinbergs. 1976. Haploidy and polyploidy and its application in breeding techniques. *Barley Genetics* III: 307-315.
11. Lange, W. 1971. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. I. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploids. *Euphytica* 20:14-29.
12. Lange, W. 1971. Crosses between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica*(Wageningen) 20:181-194.
13. Lange, W. and G. Jochemsen. 1976. The offspring of diploid, triploid and tetraploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*. *Barley Genetics* III: 252-259.
14. Reinbergs, E., S. J. Park, and K. J. Kasha. 1976. The haploid technique in comparison with conventional methods in barley breeding. *Barley Genetics* III: 346-350.
15. Subrahmanyam, N. C. 1973. Studies on the development of haploids in barley (*Hordeum vulgare* L.) following hybridization with *H. bulbosum* L. Ph. D. Thesis, Univ. of Guelph.
16. Subrahmanyam, N. C. and K. J. Kasha. 1973. Selective chromosomal elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. *Chromosoma*(Berl.) 42:111-125.