

*Hordeum bulbosum*을 이용한 보리 半數體의 胚培養에서 植物體의 發生率 向上

鄭東熙* · 閔庚洙** · 千鍾殷***

Improvement of Plant Generation Rate in *in vitro* Cultured Haploidy Embryos from *H. vulgare* Pollinated with *H. bulbosum*

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

ABSTRACT : This study was conducted to investigate optimal time for dissecting out embryos, effect of embryo size on plant generation, and kinds of media and environment in order to establish an effective *bulbosum* method.

The optimum time for dissecting out the embryos for culture was found to be 17 days after pollination, when the size of embryos ranged from 0.8 to 1.0mm in length.

Culture of embryos on B5 medium under continuous radiation was considered to be an efficient practice for production of barley hybrids.

Haploid embryos, when compared to their counterpart diploid ones, were slower and fewer in plant development in culture.

Key word : Seed set, Embryo development, *H. vulgare*, *H. bulbosum*. Embryo size

半數體를 이용한 育種法은 短期間에 目的 形質을 固定시킬 수 있는 利點이 있으며, 대부분의 作物에서는 주로 藥培養하여 半數體를 얻고 있으나 밀, 보리에서는 여러 長點이 있는 野生보리 *Hordeum bulbosum*을 이용한 方法에 대한 研究가 많다^{9,10,21}). 最近에 우리나라에서도 鄭等³⁾에 의해서 染色體의 消失機作, 半數性 幼胚의 形成率 增進에 대한 研究文獻의 整理 및 *H. bulbosum*의 主要 特性 및 이를 이용한 半數體育成에 관한 研究結果를 報告하였다.

幼胚의 摘取時期에 대하여 Jensen⁹⁾은 穎의 色

이 黃變하는 時를 適期로 보았고, Inagaki⁷⁾는 밀에서 幼胚의 크기가 1.4mm일 때 植物體 發生率 이 가장 높다고 하였으나, 穎의 色이나 幼胚의 크기는 種實의 營養狀態, 籾內의 位置, 遺傳子型 등에 따라 變異가 커서 實際로 幼胚摘取 時期를 判定하는 基準으로 定하기는 곤란하므로 大體로 23℃의 生育條件에서는 受粉後 13~15日, 18℃에서는 18~21日에 摘取하는 것이 實用的이라고 하였다⁹⁾.

胚培養 培地로는 B5^{6,10)}, B11¹⁷⁾, MS¹⁵⁾, R-M-1S⁸⁾ 培地들이 主로 使用되고 있으나, Cutter¹⁾에 의하

* 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. 4. 11 接受 >

면 胚의 크기, 置床狀態, 培地條件 등에 따라 植物體 發生率이 달라지므로 培地の 優劣을 가리기는 어렵다고 하였다. 培養條件은 처음 1~2週間은 10℃에 暗期狀態로 하였다가 다음은 20~22℃에 12時間 照明하는 것이 良好하다고 하였으나⁹⁾, 20℃區는 25℃區에 비하여 植物體 發生率이 늦었고 30℃區에서는 抑制되었으며, 光質은 靑色光에서 良好하나 赤色光이나 赤外線光에서는 不良하다고 하였다¹⁶⁾.

胚의 크기 및 溫度와 休眠性과의 關係에서 胚가 어리고 培養溫度가 낮을수록 休眠性의 影響을 받아 植物體 發生이 抑制되나 높은 溫度에서는 적게 받는다고 하였다^{16,19)}. 한편 Ryczkowski²⁰⁾는 幼胚의 殺菌 및 水洗過程에서 休眠에 關與하는 物質이 除去되므로 休眠性이 植物體의 發生에 큰 影響을 주지 않는다고 報告한 반면, 다른 研究 結果들^{15,11)}은 休眠性이 높은 胚는 植物體 發生이 되지 않으나 GA₃ 處理에 의하여 改善된다고 하였다.

本 研究는 *H. bulbosum*에 의한 半數體의 生産效率을 增進시키는데 根本的인 目的이 있으며, 優先 胚培養으로부터 植物體의 發生效率을 增進시키기 위하여 植物體로부터 幼胚 摘取時期, 幼胚 크기에 따른 胚培養 反應, 培地 및 環境條件 등을 調査하였다.

材料 및 方法

本 研究는 1986年 1월부터 1989年 6월까지 前麥

類研究所 溫冷調節溫室 및 組織培養室에서 實施되었으며, 供試材料中 野生보리인 GBC(2X)와 Spanish diploid(4X)의 分讓, 增殖, 春化處理, 出穗期 調節, 交配期間中 溫室 및 其他 條件은 鄭等³⁾의 報告와 同一하였다.

胚培養 方法은 受粉 後 15~21日에 이삭을 採取하여 穎을 除去하고 2% hypochlorite에 2~3分, 70% 알코올에 1分程度 沈滴하여 表面 殺菌한 後에 滅菌水로 3回 水洗하였다. 幼胚는 無菌箱에 解剖顯微鏡下(10倍)에서 摘取하여 培地上에 불룩 部位가 위를 향하도록 置床하고 試驗管 上端은 殺菌된 cooking foil로 封한 다음 sealing film으로 蓋아 外部의 空氣가 최대한 遮斷되도록하였다. 培地는 B5^{6,10)}를 基本培地로 하고 比較培地는 B11¹⁷⁾과 MS¹⁵⁾培地로 하였다. 基本培養 條件中 光質은 螢光 lamp, 照度는 2,500Lux로 24時間 照明하였고, 溫度는 20℃로 維持하였다.

結果 및 考察

1. 幼胚의 摘取時期

受粉 後 15日에서 22日 사이의 幼胚 形成率은 表 1과 같이 19日까지는 증가(23→69%)하는데 반하여 이들 幼胚의 培養의 植物體 發生率은 減少(67→33%)하는 傾向이었다. 幼胚 形成率의 平均値는 40%이었고 植物體 發生率의 平均値는 50%程度였으나, 受粉個體에 대한 發生效率은 15%程度였다. 이러한 現象은 盤狀體(scutellum)을 위시한 胚의

Table 1. Seed set, embryo development and plant generation from *in vitro* culture of haploidy embryos in *H. vulgare* versus days after pollinating with *H. bulbosum*

Days after pollination	No. of florets pollinated (A)	Seed set		Developed embryos		Generated plants		
		No. (B)	%(B/A)	No. (C)	%(C/B)	No. (D)	%(D/C)	%(D/A)
15	16	13	81	3	23	2	67	13
17	1,238	936	76	407	44	213	52	17
18	1,983	1,542	78	625	41	303	49	15
19	45	35	78	24	69	8	33	18
20	40	32	80	10	31	5	50	13
22	147	116	79	9	8	3	33	2
.....								
Total	3,469	2,674	77	1,078	40	534	50	15

附隨組織의 過多한 發育으로 養分轉移가 沮害되기 때문이라는 Inagaki⁷⁾의 報告와 一致하였다. 따라서 幼胚의 摘取時期는 受粉 後 17日 頃이 適期일 것으로 생각되며 이 時期는 보리에서 試驗한 Jensen⁹⁾과 밑에서 試驗한 Inagaki⁷⁾의 結果와 類似하였다.

2. 幼胚의 크기에 따른 胚培養의 反應

半數性 植物體를 獲得하기 위하여 幼胚의 크기가 어느 程度 되었을 때 培養하는 것이 가장 效果的인가? 이 問題는 *H. bulbosum*을 利用한 半數體 生産에서 重要한 問題中의 하나이다. 表 2는 受粉 後 16~19日에 摘取한 1,776個의 幼胚를 크기별로 分類하여 그들의 培養에서 얻어진 植物體를 新梢+根이 正常的으로 發生된것, 新梢또는 根만 發生된 것을 調査한 結果이다. 置床한 幼胚의 크기별 分布는 胚가 클수록 그 頻度는 현저히 낮아지는 傾向이었고, 植物體 發生率은 幼胚의 크기가 0.8~0.9mm와 1.0~1.1mm에서 總發生率(24~25%)뿐만 아니라 上記한 3가지 分화형태 모두가 높았다. 따라서 胚培養에서 크기가 0.9mm內外인 것들이 適合 할 것으로 思料되었다.

Inagaki⁷⁾는 밑에서 胚의 크기가 1.4mm가 適當하다고 하였는데 本 試驗의 結果와 比較하면 보리는 밑보다 작은 胚의 培養에서 良好한 結果가 얻어

Table 2. Plant generation from *in vitro* culture of the haploidy embryos dissected out at 16~19 days after pollinating in *H. vulgare*, cv. Neulssalbori with *H. bulbosum*, GBC as affected by their size

Embryo size(mm)	No. of embryos cultured (frequency)	Number of plants generated(%)			
		Shoot + root	Shoot	Root	Total
<0.5	493(28)	30(8)	4(14)	63(15)	97(11)
0.6-0.7	394(22)	58(15)	4(14)	83(20)	145(17)
0.8-0.9	358(20)	96(25)	10(34)	103(24)	209(25)
1.0-1.1	276(16)	103(26)	4(14)	96(23)	203(24)
1.2-1.3	184(10)	71(18)	2(7)	62(14)	135(16)
1.4-1.5	59(3)	29(7)	4(14)	14(3)	47(6)
1.6<	12(1)	4(1)	1(3)	4(1)	9(1)
Total	1,776(100)	391(100)	29(100)	425(100)	845(100)

진다는 것을 알 수 있었다. 그러나 胚의 크기가 너무 작을 境遇는 休眠性 때문에 植物體 發生이 抑制된다고 하였는데^{16,18)}, 이러한 事實이 本 實驗의 結果에서 0.7mm이하의 幼胚로 부터 植物體 發生率을 낮게하는 原因이 된 것으로 推定되었다.

3. 培地 및 栽培環境

表 3은 B5⁶⁾, MS¹⁵⁾ 및 B11¹⁷⁾의 3種類의 培地와 培養初期로부터 약 2,500Lux로 24時間의 日長下에서 溫度를 20℃로 維持한 境遇와 最初에는 暗狀態下에서 溫度를 10℃로 維持하다가 植物體 發生以後로부터 上記와 同一하게 하는 境遇의 두가지 培養條件에서 植物體의 發生程度를 調査한 것이다. B11 培地에서는 어느 培地條件에서나 植物體가 發生되지 않았다. B5培地에서는 明培養에서 植物體 發生이 32%로서 暗培養 後 明培養의 28%에 비하여 높았으나, MS培地에서는 반대로 明培養에서 26%로 낮았고 暗培養 後 明培養에서는 36%였다. 한편 新梢+根의 正常 植物體의 發生率은 B5培地에서는 두 培養條件에서 類似하게 14.5%였으나 MS培地에서는 暗培養 後 明培養에서 18%로 明培養보다 7%가 높았다. 그러나 MS培地에서만

Table 3. Response in culture by different media and cultural conditions of the embryos in *H. vulgare*, cv. Neulssalbori pollinated with *H. bulbosum*, GBC

Medium	Cultural condition*	No. of embryos cultured	Number of plants generated(%)			
			Shoot + root	Shoot	Root	Total
B5	Light	145	21(15)	-	26(18)	47(32)
	Dark /Light	147	20(14)	-	21(14)	41(28)
	Total	292	41(14)	-	47(16)	88(30)
MS	Light	129	14(11)	2(2)	18(14)	34(26)
	Dark /Light	118	21(18)	2(2)	19(16)	42(36)
	Total	247	35(14)	4(2)	37(15)	76(31)
B11	Light	111	-	-	-	-
	Dark /Light	111	-	-	-	-
	Total	222	-	-	-	-

* Light: Continuous radiation at ca. 2,500 Lux and 20℃ throughout the culture. Dark /Light: Dark with 10℃ until the beginning of plant generation, thereafter same as in the light condition.

shoot의 發生率이 2%정도 었다. 全體적으로 보아 B5에 비하여 MS培地에서 暗培養 後 明培養이 正常 植物體의 發生率에 있어 多少 높았으나(3%) 이는 個體마다 發生時를 調査하여 培養場所를 바꾸어야 하는 번거로움과 植物體가 肉眼 觀察에서 相對적으로 軟弱했던 點을 勸案할 때 B5培地에서 明培養이 實用的일 것으로 생각되었다.

受粉 後 18日에 摘取한 半數性과 正常 2倍性 幼胚의 크기 및 植物體의 發生程度는 寫眞 1에서 보는 바와 같이 半數性 胚는 正常 2倍性 胚에 비하여 形態가 不均衡이고 크기는 약 1/3 程度이었다. 置床 後 10日의 半數性 幼胚에 비하여 4日의 正常 2倍性 幼胚의 發育이 顯著히 높았는데 이는 半數體는 胚의 發育은 물론 植物體의 發生도 不振하다는 報告^{9,12-14)}와 一致하였다.



Photo 1. Plant generation from haploidy and normal diploidy embryos dissected at 18 days after pollination(mag. =50x).
Left : Top- haploidy embryo at 10 day after Bottem- haploidy embryo at the time of dissection.
Right : Top- diploid embryo at 4 day culture Bottom- diploidy embryo at the time of dissection.

摘 要

*Hordeum bulbosum*을 이용한 보리 半數體育種法의 實用化를 體系化하기 위해 一連의 實驗을 實施 하였으며, 幼胚의 摘取時期, 幼胚의 크기에 따른 胚培養 反應, 培地 및 環境條件 등을 調査하였다.

1. 幼胚의 摘取時期는 胚發育과 植物體 發生率을 考慮할 때 受粉 後 17日이 適期였다.
2. 植物體 發生에 有利한 幼胚의 크기는 0.9mm內 外였다.
3. 植物體 發生에 效果的인 培地 및 培養條件은 MS培地의 暗狀態에서 發生시킨 後 明狀態로 하는 것이 正常 植物體 發生率(3%)이 높았으나, 作業上의 편리성을 考慮한다면 B5培地에서 24時間의 日長處理條件이 좋았다.
4. 半數體는 正常 2倍體에 비하여 胚 및 植物體의 發生이 顯著히 不振하였다.

引用 文 獻

1. Andrews, C. J. and G. M. Simpson. 1969. Dormancy studies in seed of *Avena fatua*. 6. Germinability of the immature caryopsis. *Can. J. Bot.* 47:1841-1849.
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. 鄭東熙, 閔庚洙, 千鍾殷. 1994. 野生보리(*Hordeum bulbosum*)의 主要 特性 및 이를 利用한 보리 半數體育成. *韓作誌* 38(6):531-536.
4. Cutter, E. G. 1967. Surgical techniques in plants. *In* *Methods in developmental biology*. Crowell Co., N. Y. 623-634.
5. Dunwell, J. M. 1981. Genotypic variation in the response of barley embryos to growth *in vitro*. *Barley Genetics IV*:721-725.
6. Gamburg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of sus-

- pension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
7. Inagaki, M. 1985. Chromosome doubling of the wheat haploids obtained from crosses with *Hordeum bulbosum* L. *Japn. J. Breed.* 35:193-195.
 8. Islam, R. and D. H. B. Sparrow. 1974. Production of haploids in barley. *Barley Newsl.* 17:40-42.
 9. Jensen, C. J. 1976. Barley monoploids and doubled monoploids: Techniques and experiences. *Barley Genetics III*:316-345.
 10. Kao, K. N. and K. J. Kasha. 1970. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. *Barley Genetics II*:82-88.
 11. Khan, A. A. and K. L. Tao. 1978. Phytohormones, seed dormancy and germination. *Phytohormones and related compounds* 11:371-422.
 12. 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.
 13. Lange, W. 1971. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. II. Elimination of chromosomes in hybrid tissues. *Euphytica (Wageningen)* 20:181-194.
 14. Lange, W. and G. Jochemsen. 1976. Karyotypes, nucleoli and amphiplasty in hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Genetica* 46:217-233.
 15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
 16. Norstog, K. and R. M. Klein. 1972. Development of cultured barley embryos. II. Precocious germination and dormancy. *Can. J. of Bot.* 50:1887-1894.
 17. Norstog, K. 1973. New synthetic medium for the culture premature barley embryos. *In Vitro* 8:307-308.
 18. Norstog, K. 1974. Seed(botany). *In Yearbook of science and technology, 1973*: 371-374.
 19. Ofir, M., D. Koller, and M. Negbi. 1967. Studies on the physiology of regeneration buds of *Hordeum bulbosum*. *Bot. Gaz.* 128:25-34.
 20. Ryczkowski, M. 1971. Free amino acids in the environment of the proembryo during inhibition phase of its growth(Monocotyledonous plants). *Acta. Soc. Bot. Polon.* 40:475-482.
 21. 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.