

석사학위논문

마늘(*Allium sativum* L.)의 원형질체  
융합과 콜로니 형성



제주대학교 대학원  
농화학과

송 승 업

2008년 12월

# 마늘(*Allium sativum* L.)의 원형질체 융합과 콜로니 형성

지도교수 : 김 인 중

송 승 엽

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2008년 12월

송승엽의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ 印)

위 원 \_\_\_\_\_ 印)

위 원 \_\_\_\_\_ 印)

제주대학교 대학원

2008년 12월

**Protoplast Fusion and Colony Formation  
from Two Garlic (*Allium sativum* L.)  
Cultivars, 'Namdo' and 'Jejujaerae'**

Seung-Yeob Song

(Supervised by Professor In-Jung Kim)

Department of Agricultural Chemistry

Graduate School

Jeju National University

December, 2008

# 목 차

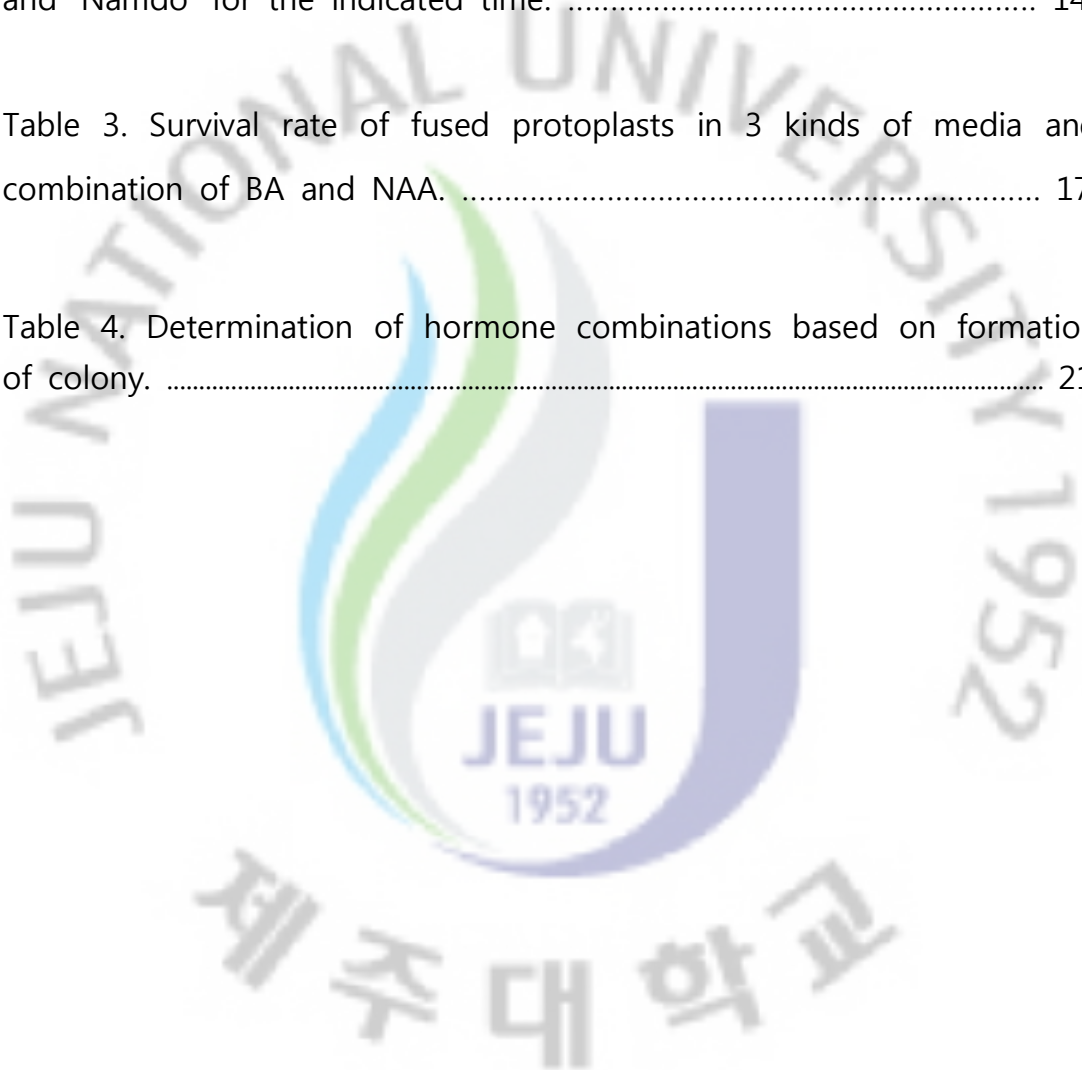
목 차 .....	i
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	ii
<b>LIST OF TABLES</b> .....	iii
<b>1. ABSTRACT</b> .....	1
<b>2. INTRODUCTION</b> .....	2
<b>3. MATERIALS &amp; METHODS</b> .....	4
3. 1. Materials	
3. 1. 1. Materials	
3. 1. 2. Chemicals	
3. 2. Methods	
3. 2. 1. Protoplast isolation	
3. 2. 2. Protoplast fusion	
3. 2. 3. Protoplast culture	
3. 2. 4. Colony formation	
<b>4. RESULTS</b> .....	8
4. 1. Determination of enzymes combination and incubation time according to protoplasts isolation	
4. 2. Protoplast fusion between protoplasts derived from two garlic cultivars	
4. 3. Division of protoplast	
<b>5. DISCUSSION</b> .....	20
<b>REFERENCES</b> .....	22
<b>SUMMARY</b> .....	26
<b>ACKNOWLEDGMENT</b> .....	27

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Effects of concentration of cellulose-R10 and incubation time on protoplasts from 'Namdo'. .....	10
Fig. 2. Effects concentration of cellulase-R10 and incubation time on protoplasts from 'Jejujaerae'. .....	11
Fig. 3. Isolated protoplasts from two garlic cultivars. ....	12
Fig. 4. Protoplast fusion between protoplasts derived from two garlic cultivars, 'Jejujaerae' and 'Namdo'. ....	15
Fig. 5. Division of fused protoplasts of two garlic cultivars, 'Jejujaerae' and 'Namdo'. ....	18
Fig. 6. Budding of colony from fused protoplasts in medium. ....	19

## LIST OF TABLES

Table 1. Composition of culture medium. ....	7
Table 2. Protoplast fusion between protoplasts derived from 'Jejujaerae' and 'Namdo' for the indicated time. ....	14
Table 3. Survival rate of fused protoplasts in 3 kinds of media and combination of BA and NAA. ....	17
Table 4. Determination of hormone combinations based on formation of colony. ....	21



## 1. ABSTRACT

Protoplasts were isolated from callus derived from the bulbils of garlic cultivars 'Namdo' and 'Jejujaerae', and were fused by polyethylene glycol (PEG) solution.

When treated with the enzyme solution of 1% Macerozyme R-10 and 2% Cellulase R-10, callus induced from 'jejujaerae' yielded the highest number of protoplasts ( $1.8 \times 10^4$  protoplasts/mL). The number of protoplasts from 'Namdo' was highest ( $1.1 \times 10^4$  protoplasts/mL) when the callus was treated with an enzyme solution of 1~2% Macerozyme R-10, 1~2% Hemicellulase and 1~2% Cellulase-RS adjusted to pH 5.3. The optimal duration required for enzyme treatment to produce took 4 hours.

The frequency of protoplast fusion was highest when treated with PEG solution having a molecular weight of 6,000 daltons at room temperature for 5 minutes and then cultivated for two hours in the dark.

The fused protoplasts were cultured at 25°C with 16 hours photoperiod in MS medium containing 0.1~1.0 mg/L 6-Benzylaminopurine(BA), 0.1~1.0 mg/L  $\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid (NAA) or their combinations. Colony was induced from fused protoplasts in 2 weeks and then cultivated in 1/2 MS containing 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA. Colony formation is an important step leading regeneration of the plants.

## 2. INTRODUCTION

마늘 (*Allium sativum* L.)은 우리생활에 있어서 빼놓을 수 없는 조미식품이고 양념채소로서 중요한 채소작물일 뿐만 아니라 강장, 강정 등의 보조식품으로 애용되어 왔다. 백합과에 속하는 다년생 채소인 마늘은 중앙아시아가 원산지로서 지중해연안으로 보급되어 오래전부터 사용되어졌다고 알려져 있다 (Hong 등, 1997). 또한 마늘은 향신료로서 향암, 항균, 항고혈압 및 항염증 등 인체에 미치는 여러 생리활성 기능이 보고되어 있다 (Ali 등, 2000; Kim 등, 2005). 난지형 마늘이 우리나라 재배면적의 80%, 생산량의 90% 이상을 차지하지만 종구의 퇴화와 감염 등에 의한 품질 하락이 문제가 되고 있다. 마늘은 감수분열 과정에서 정상적인 화분이 형성되지 않는 특성으로 교배가 불가능하여 종자생산은 물론 교배 육종이 불가능하다. 따라서 새로운 품종의 육성은 외국에서 도입하거나 다른 지역 품종을 지역 적응성 시험 등을 통해 선발하여 보급하고 있다 (Wu 등, 1998). 우리나라에는 1977년에 중국마늘을 최초로 도입하여 '남도(南島)마늘'로 명명하여 보급한 이래 원산지와 생태형이 다른 외국의 품종 및 계통들이 다수 도입되었고 또 실제로 급격한 수량 증가를 가져오게 되었다 (Song 등, 2001). 마늘에 대한 연구는 재배마늘의 형태적 (Ogawa 등, 1975), 생리적 특성 (Lee, 1973), 조직배양에 의한 무병묘 생산 (Suh와 Park, 1986), 돌연변이 유기 및 변이체 선발 (Park과 Lee, 1989)등에 관하여 수행되어 왔다. 하지만 선발육종 또는 교배육종 등의 기술로는 우리나라 고유 품종을 만들기는 어렵다. 이를 극복하기 위해 원형질체 융합 기술을 마늘에 적용하여 새로운 품종 개발의 필요성이 제시 되었다.

원형질체 융합 기술은 매우 유용한 식물세포 조작기술이다. 원형질체는 세포벽이 제거되어 원형질막으로 둘러싸여 있지만 세포벽의 재형성과 세포분열에 필요한 세포질과 핵 구성요소를 가지고 있어서 전체 형성능력을



유지한 세포이다. 이러한 특성은 물리, 화학적인 관점에서 세포막을 조사 또는 조작하거나 DNA나 RNA, 바이러스입자, 미생물, 소기관 등의 세포내 유입이 딸세포나 재분화된 식물체에서 나타내는 효과를 알아보기 위한 실험을 용이하게 한다. 또한, 화학적인 처리를 통해 삼투압을 유지하면서 원형질막의 융합을 유도하면서 유사한 또는 대조적인 세포유형들 간에 체세포 잡종화에 따른 융합과정을 거쳐 궁극적으로 체세포잡종체의 생성을 유도한다. 그뿐만 아니라 원형질체는 세포벽이 없기 때문에 방사선조사에 의한 돌연변이유기나 cell flow cytometry에 의한 세포분획도 용이하다. 따라서 이와 같은 원형질체의 특성과 다양한 적용방법들은 식물의 유전적 조작과 육종을 위한 무한한 가능성을 내포하는 것이다 (Mantell 등, 1985).

마늘은 백합과의 구근류 식물이기 때문에 백합에서의 원형질체 융합, 기내선발, 형질전환 등의 방법을 적용할 수 있다 (Han 등, 2005). 같은 Allium 속 식물인 양파의 경우 캘러스 유도는 순원기 배양을 통해서 지속적으로 유도할 수 있기 때문에 (Jeong 등, 1997) 이를 마늘에 접목시킬 경우 원형질체 융합을 위한 원형질체 나출에 필요한 캘러스를 얻을 수 있다. 남도마늘 인편에서 얻은 캘러스와 알마아타종 마늘의 보통엽에서 원형질체가 분리되었고 (Novak 등, 1986), 원형질체 배양과 융합 (Matsuhara 등, 1986; Suh와 Park, 1995)이 보고되었다. 또한 호와이토 로펜품종의 마늘 (*Allium sativum* L. cv. Howaito Roppen)의 원형질체를 배양하여 식물체로 유도한 사례도 보고되었다 (Suzuki 등, 2002). 그러나 주아로부터 원형질체를 얻은 사례는 아직까지는 보고되지 않았다.

본 연구는 현재 전국적으로 재배되고 있는 남도마늘과 제주도에서 중점적으로 재배되고 있는 제주재래종마늘의 주아로부터 순원기 배양을 통해 캘러스를 유도하고 원형질체 융합을 시도함으로써 새로운 품종을 육성하는데 목표를 두었다.

### 3. MATERIALS & METHOD

#### 3. 1. Materials

##### 3. 1. 1. Materials

시험 재료로 사용된 마늘은 현재 제주도 지역에서 가장 많이 재배되고 있는 남도마늘 (*Allium sativum* L. cv. Namdo)과 제주재래종마늘 (*Allium sativum* L. cv. Jejujaerae)의 주아를 먼저 멸균수로 세척하고, 5% NaOCl 용액에 10분간 침지하였다. 그 후에 70% 알코올로 2분간 소독을 한 뒤, 멸균수로 3~4회 세척했다. 이 소독된 주아를 1/2 MS 배지에 치상하여 25°C, 16시간 광, 8시간 암 조건에서 배양했다. 2주간 배양한 뒤, 생장점을 취하고 LS 배지에 치상하여 24시간 광 조건으로 순원기 배양하였다. 순원기 배양을 통해서 얻은 callus와 1/2 MS 배지에서 배양한 주아를 원형질체 나출 재료로 이용하였다.

##### 3. 1. 2. Chemicals

원형질체 나출에 사용된 Macerozyme R-10, Cellulase RS, Cellulase-R10 효소는 MaximBio 제품을 사용하였고, Hemicellulase는 Sigma 제품을 사용하였다. 융합에 들어가 PEG는 Fluka 제품을 사용하였고, mannitol, sorbitol, MgCl<sub>2</sub>, DMSO, DTT, MES, casein hydrolysate, glucose는 Sigma 제품을 실험에 이용하였다.

### 3. 2. Methods

#### 3. 2. 1. Protoplast isolation

원형질체 나출에 사용된 효소의 조합은 1% Macerozyme R-10에 Cellulase RS 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0%의 조합과 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-R10을 조합한 10종류의 효소혼합액과 2% Macerozyme R-10에 Cellulase Rs 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0%의 조합과 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-R10을 조합한 10종류의 효소혼합액, 1% Hemicellulase에 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-RS 조합과 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-R10을 조합한 10종류의 효소혼합액, 2% Hemicellulase에 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-RS의 조합과 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0% Cellulase-R10을 조합한 10종류 효소혼합액으로 전체 40 조합의 효소혼합액을 원형질 나출에 이용했다. 효소혼합액내 mannitol과 sorbitol의 농도는 각각 0.3 M로 고정하였고, 1% DMSO와 2 mM DTT를 첨가했고, 또한 20 mM MES와 0.6 M mannitol의 농도를 고정한 방법에 5 mM MgCl<sub>2</sub>와 1% DMSO를 첨가했다. 생장점에서 분화된 캘러스를 1~2mm 폭으로 자르고 캘러스는 가능한 작게 해서 효소용액 10mL에 1g의 비율로 첨가했다. 효소용액을 처리한 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24시간 단위로 원형질체의 나출 수율을 hemacytometer를 이용해서 조사했다. 수세용액은 W5 solution과 0.55 M mannitol를 사용했다. 원형질체 수거는 tube에 효소처리가 끝난 원형질체 상층액을 넣고 150×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 수거하였다. 수거한 원형질체를 수세용액으로 150×g에서 5분간 원심분리로 2~3회 정도 반복해서 깨끗이 세척했다.

#### 3. 2. 2. Protoplast fusion

남도마늘의 캘러스와 제주재래종마늘의 주아에서 나출한 원형질체를 이용하여 융합을 시도하였다. 수세 후 원형질체의 농도를 각각  $5 \times 10^5$  protoplasts/mL로 조정하고 지름 60mm의 페트리디쉬에 1~2mm 간격으로 PEG 6000을 사용해 만든 융합유도액 (PEG 7mL + 완충액 1.0mL + DMSO 1.0mL)을 4방울 떨어뜨렸다. 그 사이에 융합할 원형질체를 2방울 떨어뜨리고 바닥에 갈아 앉히기 위해 5분간 방치하였다. 5분 후에 접시를 돌려 이들 액을 섞고 융합이 유도 되도록 다시 5분간 방치했다. 이후, 5 mM의 MES가 첨가된 W5액을 6mL 첨가하고 25℃에서 암상태에서 2시간 동안 배양했다. 2시간 후, 50×g에서 2분간 원심분리하고 상층액을 피펫으로 조심스럽게 제거했다. 상층액이 제거한 뒤 수거된 원형질체를 다시 W5액에 2일간 배양을 했다.

### 3. 2. 3. Protoplast culture

융합된 원형질체를 재분화 시키기 위해서 W5, CPW13M, MS, LS액으로 각각의 배지로 희석시켰다 (Table. 1). 희석 시킨 원형질체를 각각의 배지에 식물생장조절제 (NAA, BA, 2,4-D)가 첨가한 후 각각의 배지에서 재분화를 유도했다.

Table 1. Composition of culture medium.

Linsmaier & Skoog (LS)	CPW13M	W5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,650 mg/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 27.2 mg/l	154mM NaCl
KNO <sub>3</sub> 1,900 mg/l	KNO <sub>3</sub> 101.0 mg/l	125mM CaCl <sub>2</sub>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 440 mg/l	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 1480.0 mg/l	5mM KCl
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 370 mg/l	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 246.0 mg/l	5mM Glucose
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 170 mg/l	KI 0.16 mg/l	pH 5.6
Na <sub>2</sub> EDTA 37.3 mg/l	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O 0.025 mg/l	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 27.8 mg/l	Mannitol 13% 130 g/l	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O 22.3 mg/l		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 8.6 mg/l		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6.2 mg/l		
KI 0.83 mg/l		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.25 mg/l		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.025 mg/l		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.025 mg/l		
Thiamin·HCl 0.4 mg/l		
Myo-inositol 100 mg/l		
Sucrose 10,000 mg/l		
pH 5.8		

### 3. 2. 4. Colony formation

W5액으로 희석한 후 콜로니를 유도하기 위해 1/2 MS 배지에 1 mg/L BA, 1 mg/L NAA, 0.1% casein hydrolysate, 1% glucose, 0.55 M L-mannitol, 0.6% agarose를 첨가하고  $5 \times 10^5$  protoplasts/mL의 농도로 융합된 원형질체를 배양했다. 콜로니에서 캘러스를 유도하기 위해 다시 기본 MS 배지에 2 mg/L BA, 0.02 mg/L NAA, 3% sucrose를 첨가한 배지에 옮겨 재분화를 시도했다. 재분화를 조사하기 위해서 Zeiss사의 Axio Scope 를 사용하여 재분화를 조사했다.

## 4. RESULTS

### 4. 1. Determination of enzymes combination and incubation time according to protoplasts isolation

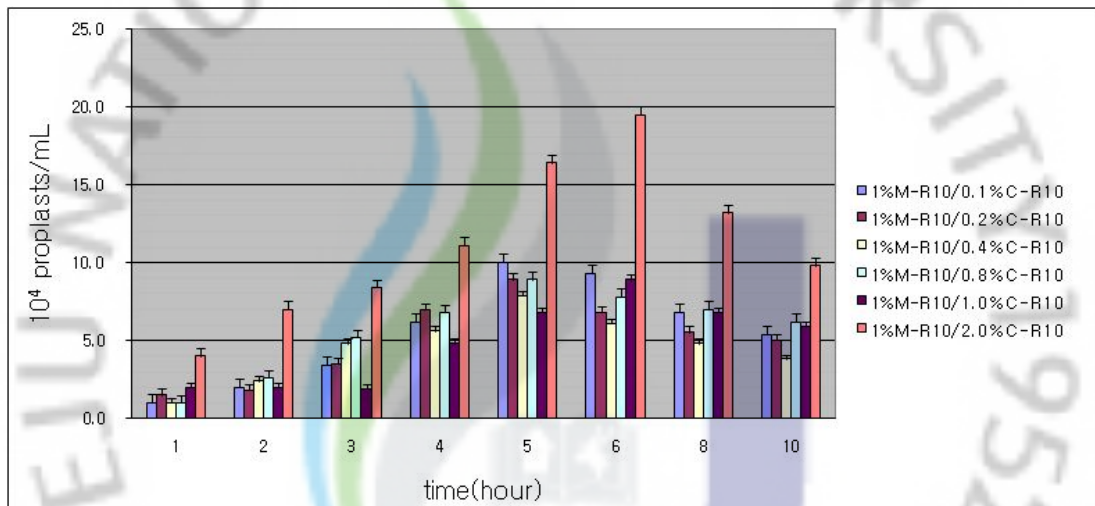
원형질체 나출에 적합한 조건을 찾기 위해 남도마늘의 주아로부터 순원기 배양된 캘러스에 Cellulase RS, Cellulase-R10를 처리한 결과, 농도 간에 뚜렷한 차이를 나타냈다. 가장 적합한 수준의 조합은 1% Macerozyme R-10과 2.0% Cellulase-R10의 효소혼합액이 가장 효과적이었다 (Fig. 1). 나출된 원형질체는 융합에 이용하기 적합한 형태를 나타냈다 (Fig. 3). 수율은 남도마늘의 주아에서 발생된 캘러스는  $11.1 \times 10^4$  protoplasts/mL로 나타났다. 주아에서 발생된 캘러스도 원형질체 나출에는 아무런 문제점이 없었다. 이러한 나출률은 Kim 등 (1986년)과 Tashiro 등 (1984년), Suh와 Park (1995년)이 보고한 것보다 조금 낮지만 형태와 상태는 비슷하게 나타났다 (Fig. 3). 제주재래종마늘의 주아로부터 순원기 배양된 캘러스에도 Cellulase RS와 Cellulase-R10을 처리한 결과 Cellulase RS에서는 나출이 되지 않았지만 남도마늘과 같이 Cellulase-R10에서  $18.5 \times 10^4$  protoplasts/mL의 나출률을 나타냈으며 2.0% Cellulase-R10을 4시간 처리하였을 때 마늘 주아 캘러스에서 원형질체 나출이 효과적인 것으로 판명되었다 (Fig. 2).

남도마늘의 주아 캘러스에 Cellulase-R10를 2.0%로 고정시키고 Macerozyme R-10, Hemicellulase의 농도를 달리 해서 처리했을 때 Hemicellulase에서는 나출이 되지 않았고 Macerozyme R-10의 농도를 달리 해서 처리 했을 때 처리 6시간 후 1%의 Macerozyme R-10에서  $19.5 \times 10^4$  protoplasts/mL로 가장 높게 나타났다. 주아로부터 유도된 캘러스에서 Macerozyme R-10의 농도 차이는 나출 수율이 나타나지 않았고 1%의

농도에서만 나출 수율이 나타났다 (Fig. 1). 남도마늘과 제주재래종 마늘의 원형질체 나출 수율은 5~6시간 처리에서 높지만, 재분화와 융합은 이루어지지 않았다. 이것은 처리 시간이 길어지면서 세포막이 약해지고 세포가 사멸하면서 나타나는 현상이라 생각된다.



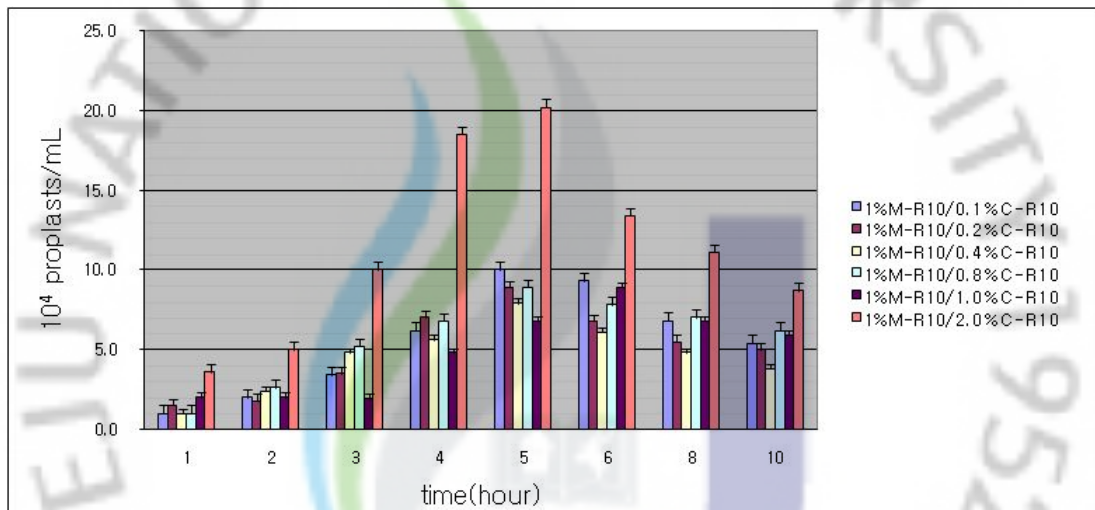
Fig. 1. Effects of concentration of cellulose-R10 and incubation time on protoplasts from 'Namdo'.



\*Data represent the means  $\pm$  SD of ten independent experiments.

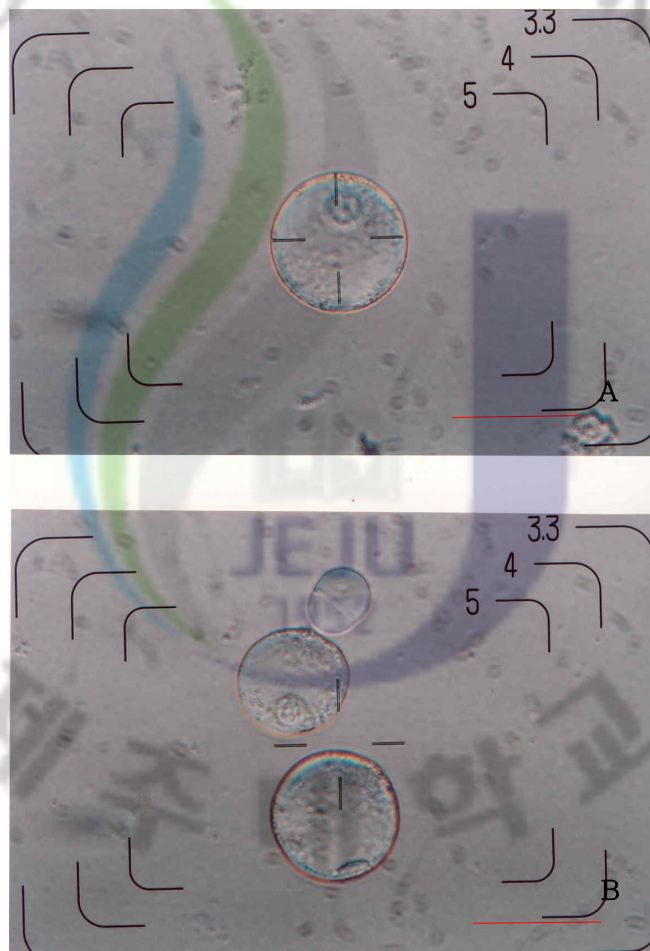


Fig. 2. Effects concentration of cellulase-R10 and incubation time on protoplasts from 'Jejujaerae'.



\*Data represent the means  $\pm$  SD of ten independent experiments.

Fig. 3. Isolated protoplasts from two garlic cultivars. A) Jejujaerae B) Namdo. Olympus IX70 x20. Scale bar = 100 $\mu$ m



#### 4. 2. Cell fusion between protoplasts derived from two garlic cultivars

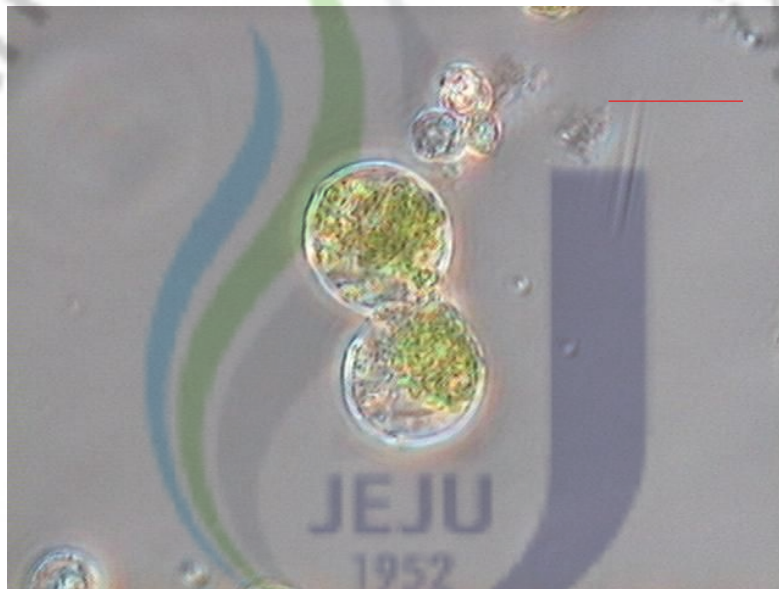
남도마늘과 제주재래종 마늘 주아에서 나출된 원형질체 융합 최적조건을 찾기 위해 시간 별로 융합률을 관찰했다. 융합직 후 2시간의 암배양 동안 30분 간격으로 관찰한 결과, 처음 융합을 시도했을 때 60%의 높은 융합률을 보였다 (Fig. 4). 하지만 시간이 지나면서 융합률이 점차 감소하는 모습을 볼 수가 있었다. 최종적으로 전체의 융합률은 20% 정도를 나타내었다 (Table 2). 이러한 결과는 마늘 인편과 달래로부터 추출한 원형질체를 사용한 경우 보고된 최고융합률 20.4% (Kim 등, 1986), 남도마늘 인편과 알마아타종 마늘 보통엽의 원형질체 융합률 (15.8%, 18.9%)을 보고한 2건 (Matsuhara 등, 1986; Suh와 Park, 1995)의 연구결과와 비슷한 수치이다. 그러나 아직까지 융합 식물체의 재분화에 대한 연구결과는 보고되지 않고 있다.

Table 2. Cell fusion between protoplasts derived from 'Jejujaerae' and 'Namdo' for the indicated times.

<b>Fusion between</b>	No. Protoplasts treated	1st fusion	after 30min	after 1h	after 1h 30min	final fusion
	10 <sup>4</sup> proplasts/mL	%	%	%	%	%
<b>JeJujaerae</b>	<b>1.8</b>					
<b>Namdo</b>	<b>1.1</b>	67 ± 0.53*	54 ± 0.27	48 ± 0.16	39 ± 0.18	20 ± 0.13

\*Data represent the means ± SD of ten independent experiments.

Fig. 4. Cell fusion between protoplasts derived from two garlic cultivars, 'Jejujaerae' and 'Namdo'. ZIESS Axio Scope x 20. Scale bar = 100 $\mu$ m



#### 4. 3. Division of protoplast

남도마늘과 제주재래종마늘의 주아에서 나출된 원형질체로부터 제조된 융합체를 재분화시키기 위해 우선 25℃ 암조건에서 2시간 배양한 후 (Fig. 5A, 5B), 재분화 배지로 옮겼다. 나출한 원형질융합체를 재분화 배지에 옮기고 재분화를 유도한 결과 BA와 NAA의 호르몬을 첨가한 배지에서는 무처리 배지와 차이점을 보였다 (Table 3). 기본 W5, MS, CPW 13M 배지에서는 3일까지는 생존하였으나 (Fig. 5D), 4일째가 되면서 모두 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 3). 이러한 문제점을 해결하기 위해 콜로니를 통한 재분화 방법을 도입하였다. Suzuki 등 (2002)에 의해 캘러스의 유도효율과 콜로니형성 간에 높은 상관관계가 보고되었으므로, 이를 적용하여 원형질융합체로부터 콜로니형성을 유도하였다. 이를 위해 재분화 배지에 casein 가수분해산물과 glucose를 첨가하여 배양한 결과 성공적으로 콜로니를 형성시킬 수 있었다 (Fig. 6). 현재 획득한 콜로니를 이용하여 캘러스를 유도 중에 있으며, 향후 원형질융합 식물체를 재분화하고자 한다.

Table 3. Survival rate of fused protoplasts in 3 kinds of media and combination of BA and NAA.

Media	Hormone	1 day (%)	2 day (%)	3 day (%)	4 day (%)
	treatment BA/NAA				
CPW13M	0	32 ± 0.3	12 ± 0.3	4 ± 0.4	0
	0/1.0	15 ± 0.2	6 ± 0.3	0	0
	1.0/1.0	7 ± 0.3	0	0	0
	1.0/2.0	0	0	0	0
	2.0/2.0	0	0	0	0
	1.0/0	2 ± 0.1	0	0	0
MS	0	24 ± 0.2	8 ± 0.3	3 ± 0.2	0
	0/1.0	9 ± 0.3	3 ± 0.1	0	0
	1.0/1.0	0	0	0	0
	1.0/2.0	0	0	0	0
	2.0/2.0	0	0	0	0
	1.0/0	0	0	0	0
W5	0	48 ± 0.1	33 ± 0.1	15 ± 0.2	0
	0/1.0	13 ± 0.2	8 ± 0.2	0	0
	1.0/1.0	0	0	0	0
	1.0/2.0	0	0	0	0
	2.0/2.0	0	0	0	0
	1.0/0	0	0	0	0

\*Data represent the means ± SD of ten independent experiments.

Fig. 5. Division of fused protoplasts of two garlic cultivars, 'Jejujaerae' and 'Namdo'.

A) Fused cell. B) Budding of protoplast. C) Division of cell from protoplast. Zeiss Axio Scope x40.

D) Division of fused protoplasts in W5 medium.

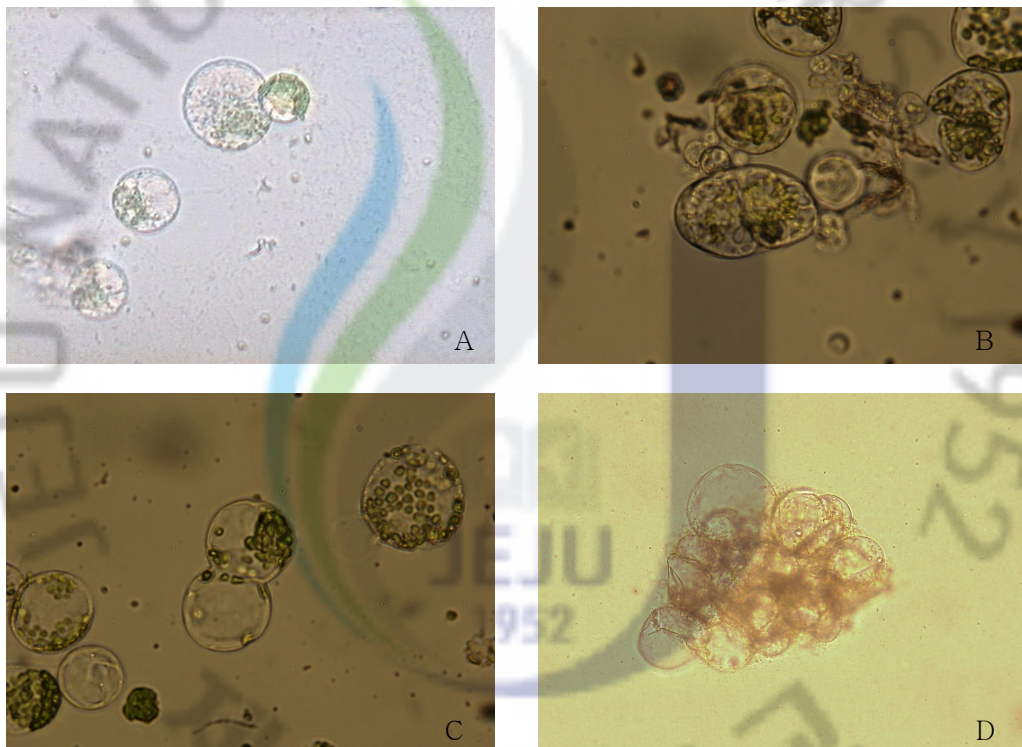
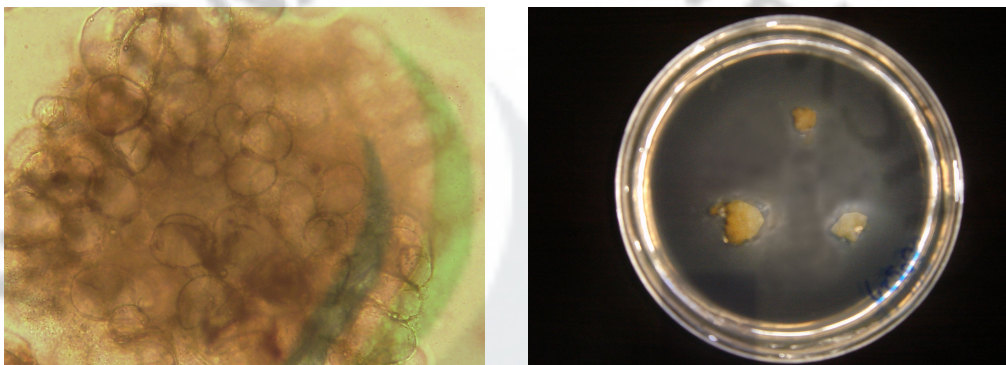




Fig. 6. Budding of colony from fused protoplasts in medium.



## 5. DISCUSSION

남도마늘과 제주재래종마늘 주아에서 원형질체를 나출한 결과 동일한 조건인 1% Macerozyme R-10과 2.0% Cellulase-R10을 처리하였을 때 각각  $11.1 \times 10^4$  protoplasts/mL와  $18.5 \times 10^4$  protoplasts/mL로 얻어 높은 수율을 나타냈다. 처리 시간은 남도마늘은 5시간, 제주재래종마늘은 4시간으로 하였을 때 나출 효율성이 높았다. 나출이 가장 높게 나온 처리 시간은 각각 6시간과 5시간이지만 원형질체가 불안정하게 나타났다. 효소처리가 세포벽을 제거하는 과정에서 처리 시간이 길어짐에 따라 세포막에도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 원형질체의 재분화를 위해서는 5시간과 4시간을 처리한 원형질체가 적당한 것으로 판단된다. 재분화에는 BA가 중요하게 작용한다고 알려져 있다. Riu와 Park (1992)의 보고에 따르면 식물세포의 벽이 재생될 때 callose가 다량으로 축적되는데 이것은 세포벽을 재생하는데 관련이 있다. Callose의 축적은 BA의 영향을 받으므로, BA의 첨가는 세포벽 재생에도 영향을 주어 재분화를 촉진할 수 있을 것이다. 이에 따라 재분화용 배지에 1.0 mg/L BA를 첨가 했을 때 콜로니를 유도할 수 있었다 (Table 4). 획득한 콜로니는 순원기 배양을 통해 캘러스 유도에 사용하고 있으며, 향후 재분화를 통해 융합식물체를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Determination of hormone combinations based on formation of colony.

Media	Hormone treatment BA/NAA	3 days	5 days	1 weeks	2 weeks
MS	0	0	0	0	0
	0/1.0	0	0	0	0
	1.0/1.0	10.7 ± 0.8	10.7 ± 0.4	7.7 ± 0.5	0
	1.0/2.0	9.6 ± 0.2	4.3 ± 0.9	2.1 ± 0.1	0
	2.0/2.0	11.3 ± 0.5	6.7 ± 0.2	3.2 ± 0.5	0
	1.0/0	32.5 ± 0.6	21.3 ± 0.9	18.7 ± 0.3	9.6 ± 0.5

\*Data represent the means ± SD of ten independent experiments.

## REFERENCES

- Ali M, Thomson M, Afzal M. 2000. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 62: 55-73
- Han, B.-H., S.-Y. Lee, E.-J. Shu, and J.-G. W. 2005. Bulblet differentiation through the formation of friable embryogenic callus from bulb scales of *Lilium longiflorum* 'Nellie White'. Kor. J. Plant Biotechnol. 32: 123-128.
- Hong, C.J., T. Etoh, B. Landry, and N. Matsuzoe. 1997. RAPD markers related to pollen fertility in garlic (*A. sativum* L.). Breed. Sci. 47:359-362.
- Jeong H.B. and H.G. Park. 1997. Plant redifferentiation and in vitro multiplication of Onion by Shoot Primordium Culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(2):123-128.
- Kim, K.-J., D.-R. Jeong, and H.-K. Kim. 2005. Antimicrobial, Antihypertensive and Anticancer Activities of Garlic Extracts. Kor. J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 37. No. 2. pp. 228-232.
- Kim, H.-I., Y.-H. Kim, T.-Y. Chung, and I.-S. Ryu. 1986. Studies on protoplast fusion of *Allium sativum* with *Allium monanthum*. Kor. J. Plant Tiss.

Cult. 13:37-44.

Lee, W.S. 1973. Physiological and ecological studies on Korea local strains of garlic. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 14:14-23

Mantell, S.H., J.A. Matthews and R.A. McKee, 1985. Principles of Plant Biotechnology. An Introduction of Genetic Engineering in Plants. S.H. Mantell, J.A. Matthews and R.A. McKee (eds). Blackwell Scientific Publications pp 89-129.

Matsuhara, S., S. Ito, and Y. Kato. 1986. にんにくの原形質體 単離, 培養および融合(Abst.). 日園學雜 發表要旨 212-213.

Novak, F.J., L. Havel, and J. Dolezel. 1986. Allium. P. 419-456. In D.A.Evans. W.R.Sharp. and P.V. Ammirato(eds.). Handbook of plant cell culture V. 4. Macmillan Publishing Company. New York.

Ogawa, T., N. Mori, and N. Matsubara. 1975. The studies on the ecological distribution and bulbing habit of garlic plants. Res. Rept., Nagasaki, Japan. 3:3-21

Park, K.Y., and C.H. Lee. 1989. Mutation induction by EMS, colchicine and gamma irradiation of in vitro cultured shoot tips of *A. sativum* L. Res.

Rept. RDA. 32:43-52

Riu, K.-Z., and C.-K. Park. 1992. Effects of benzyladenine on the cell wall regeneration of soybean(*Glycine max*) protoplast. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 35:507-512.

Song, Y.S., I.H. Choi, Y.S. Jang, Y.S. Ahn, S.K. Cho, and W.Y. Choi. 2001. Relationship with major physiological characters and RAPD patterns of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm. *Kor. J. Plant. Res.* 14(2) 139-147

Suh, S.-K., and H.G. Park. 1986. Studies on the anther culture of garlic (*Allium sativum* L.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 27:89-95.

Suh, S.-K., and H.G. Park. 1995. Protoplast isolation, fusion, and culture in garlic (*Allium sativum* L.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 36:614-619.

Hasegawa, H., M. Sato, and M. Suzuki, 2002. Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from long-term, shoot primordial-derived calluses of garlic (*Allium sativum*). *J. Plant Physiol.* 159. 449-452.

Tashiro, Y., H. Hashimoto, S. Miyazaki, and K. Kanazawa. 1984. *Allium* protoplasts isolated from different organs and tissues. *Bull. Fac. Agri. Saga Univ.* 57:115-119.

Wu. J.k. 1998. Physio-ecological studies for stabilizing garlic production. Res.  
Rep. NHRI. RDA. p5-10



## SUMMARY

남도마늘과 제주재래종 마늘 주아에서 유래된 캘러스를 이용하여 원형질체를 나출했고 PEG용액으로 융합했다. 원형질체 융합에 사용될 원형질체를 나출하기 위해서 효소의 조합을 1~2% Macerozyme R-10, 1~2% Hemicellulase 와 1~2% Cellulase-RS, 1~2% Cellulase R-10을 효소조합을 사용하였다. 효소혼합액내 mannitol과 sorbitol의 농도는 각각 0.3 M로 고정하였고, 1% DMSO와 2 mM DTT를 첨가했고, 또한 20 mM MES와 0.6 M mannitol의 농도를 고정한 방법에 5 mM MgCl<sub>2</sub>와 1% DMSO를 첨가했다. 20 mM MES와 0.6 M mannitol의 농도를 고정하고 5 mM MgCl<sub>2</sub>와 1% DMSO를 첨가했을 때, 제주재래종마늘 주아에서 유래된 캘러스는 1% Macerozyme R-10와 2% Cellulase R-10의 효소 조합에서 높은 수율을 나타냈고 ( $1.8 \times 10^4$  protoplasts/mL), 남도 마늘 또한 20 mM MES와 0.6 M mannitol의 농도를 고정하고 5 mM MgCl<sub>2</sub>와 1% DMSO를 첨가했을 때, 1% Macerozyme R-10와 2% Cellulase R-10의 효소 조합에서 제주재래종마늘과 같이  $1.1 \times 10^4$  protoplasts/ml로 높게 나타났다. 나출 시간은 남도마늘 5시간, 제주재래종마늘 4시간이 적당했다. 원형질체 융합은 PEG법을 사용했고, PEG 6000을 실온에서 5분간 방치하고 그 사이에 원형질체를 떨어뜨리고, 다시 5분 후에 섞어서 2시간 동안 암 조건에서 배양을 했다. 2시간이 지난 후에 기본 MS배지에 0.1~1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, 0.1~1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 첨가하고 25°C에서 16시간 광, 8시간 암 조건으로 배양했다. 2주간 배양한 후, 콜로니를 얻었고 캘러스 형성을 통한 재분화를 유도하기 위해 순원기 배양중에 있다.



## ACKNOWLEDGMENT

석사 과정을 들어와 공부를 시작한지도 벌써 3년이란 시간이 흘렀습니다. 3년이라는 시간이 어떻게 보면 짧은 시간이기도 하고 어떻게 보면 기나긴 시간이기도 합니다. 인생에 있어서 3년이라는 시간을 석사라는 목표로 살았습니다. 이제 모든 난관이 끝나고 졸업이란 시간이 되었습니다. 많은 분들의 따뜻한 관심과 응원, 그리고 질책 속에서 더욱더 성숙해진 모습으로 성장하였습니다. 과학도로서의 소양과 자세를 일깨워주신 모든 분에게 이렇게 지면으로나마 감사의 인사를 드리고자 합니다.

연구와 강의로 바쁘신 가운데도 논문이 완성되기까지 바른 길로 인도해 주시고 연구방향에 대하여 넓은 안목으로 키워주시며 지도해주신 김인중 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 석사 학위논문을 심사해주신 이효연 교수님, 김천환 연구사님, 그리고 석사 과정 동안 저의 학문적 지식을 넓혀주신 학과 교수님들께 진심으로 감사드립니다.

난지농업연구소를 들어가 실험을 하면서 끝까지 저를 믿고 아낌없는 성원을 보내주신 엄영철 원예시험장장님, 실험을 시작하면서 많은 벽이 가로 막고 있을 때 마다 조언을 아끼지 않았던 안현주 연구사님, 혼자 괴로워하면서 고민하고 있을 때 다독여주신 이진수 연구사님, 항상 부족한 저를 격려해주신 장기창 연구사님께 감사드립니다.

실험실 생활을 하는 동안 많은 기쁨 때나 슬플 때나 괴로울 때, 항상 함께 해주 여진, 승규, 아름, 민정, 선영, 성훈이, 실험실 막내로 들어와서 스트레스를 받아주던 원범이, 내가 하는 일을 아무런 잔소리 없이 도와주던 현우. 모두에게 감사드립니다. 실험으로 고민 있을 때, 커피와 이야기를 나눠 주던 영주누나, 친구로써 지금껏 지켜봐준 재희, 동생으로 따끔한 충고를 해준 능재에게도 감사드립니다.

3년이란 시간동안 못난 아들을 아무런 말없이 지켜봐주신 부모님께 감사드립니다. 석사 과정 동안 힘들고 지칠 때 많은 분들의 성원과 응원이 없었다면 지금의 저의 모습은 상상할 수도 없었을 것입니다. 돌아보면 후회한 것도 많지만 앞으로 더욱 멋진 사람으로 많은 분들의 성원과 응원에 보답하겠습니다.