

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2021.7.4.721>

JCCT 2021-11-88

조직배양으로 *Kalanchoe pinnata*의 직접기관분화를 유도하기 위한 호르몬 연구

Hormonal Study to Induce Direct Organ Differentiation of *Kalanchoe pinnata* by Tissue Culture

김동균*

Donggiun Kim*

요약 식물 세포는 각 세포가 발생을 통해 새로운 완전한 개체를 생산하는 전형성능이 있다. 이것을 응용하여 식물의 증식 방법으로 기내에서 호르몬을 처리하여 체세포 배 발생의 광범위한 적용으로 여러 기술이 발전하고 있다. 이 기술을 이용하기 위해서 보다 규칙적인 세포 분열을 하는 무성생식이 가능한 식물인 *Kalanchoe pinnata*에 cytokinin에 속하는 kinetin과 auxin에 속하는 호르몬들 중 picloram을 서로 조합하여 첨가한 뒤 8주 동안 처리한 후 전형성능을 실험하였다. 우리의 실험 결과로 잎 절편에서 발근 효과로는 picloram 농도가 0.1 mg/L에서 70%의 발생율을 보였다. kinetin과 picloram의 비율이 1:5-1:10의 농도차이가 효과적이라는 것이 입증 되었다. auxin의 효과가 *Kalanchoe* 뿌리 발생에 필수적이라는 실험 결과이다. 경엽부 발생 효과로는 picloram 농도가 0.5 mg/L에서 60%의 발생율을 보였다. kinetin 농도는 0.5 - 1.0 mg/L이며 발생에 중요한 영향을 준다. kinetin과 picloram의 비율이 1:1-1:2의 농도 차이가 효과적이라는 것이 입증 되었다. cytokinin과 auxin의 조합이 결정적으로 경엽부 발생에 중요하다는 것을 보여 주는 결과이다. 호르몬의 조합으로 직접기관형성을 유도하여 기내에서 대량 증식을 유도하는 기술의 기초가 될 수 있다고 사료된다.

주요어 : 조직배양, *Kalanchoe pinnata*, 기관 분화, 옥신, 카이네틴

Abstract Plant cells have a totipotential capacity, the ability of each cell to produce a new complete individual through development. By applying this, several technologies are being developed for widespread application of somatic embryogenesis by processing hormones *in vitro* as a method of propagation of plants. In order to use this technology, in *Kalanchoe pinnata*, a plant capable of asexual reproduction with more regular cell division, kinetin belonging to cytokinin and picloram among hormones belonging to auxin were added in combination and treated for 8 weeks, and then the typical performance was evaluated. As a result of our experiment, the rooting effect in leaf slices showed a 70% incidence rate at a picloram concentration of 0.1 mg/L. It has been proven that a concentration difference of 1:5-1:10 in the ratio of kinetin and picloram is effective. It is the experimental result that the effect of auxin is essential for the development of *Kalanchoe* roots. As for the effect of shooting, the incidence rate was 60% at the picloram concentration of 0.5 mg/L. The kinetin concentration from 0.5 and 1.0 mg/L and has a significant effect on development. It has been proven that the ratio of kinetin to picloram is effective with a concentration difference of 1:1-1:2. These results show that the combination of cytokinin and auxin is crucially important for shooting. It is thought that it can be the basis of a technology for inducing mass proliferation *in vitro* by inducing direct organogenesis with a combination of hormones.

Key words : Tissue Culture, *Kalanchoe pinnata*, Organ, Differentiation, Hormone

*정회원, 신라대학교 생명과학과 교수 (제1저자)
접수일: 2021년 9월 29일, 수정완료일: 2021년 10월 19일
게재확정일: 2021년 10월 25일

Received: September 29, 2021 / Revised: October 19, 2021
Accepted: October 25, 2021
*Corresponding Author: botanist@silla.ac.kr
Dept. of Life Science, Silla Univ, Korea

1. 서 론

식물들은 발달 과정이 단계적으로 연결되어 있어서 성장이 계속 진행되는 유기체이다. 그것들은 생명 활동이 계속 되는 동안 분열 세포에서 새로운 기관을 지속적으로 분화 할 뿐만 아니라 상처 후 또는 시험관 배양(조직배양, 기내배양) 중에 새로운 세포와 기관을 재생한다 [1]. 식물 세포는 또한 배 발생을 통해 새롭고 완전한 개체를 생산하는 능력인 전형성능이라는 성장을 할 수 있다.

식물의 전형성능 연구는 1838년 슈라이든(Schleiden) 및 1839년 슈만(Schwann)의 세포 이론에 그 역사가 시작된다. 이 이론에서는 유기체가 독립적으로 성장하고 분열 할 수 있는 능력을 가진 개별 세포로 구성되어 있다고 말한다. 이 이론을 바탕으로 1902년에 하버란트(Haberlandt)는 배양된 세포에서 인공 배아가 생성될 수 있다고 예측함으로써 기내에서 식물 전형성능 연구의 토대를 마련했다 [2-3]. 기내에서 체세포 배는 거의 60년 후 와리스(Wariss)가 실험적으로 처음 기술했다 [3]. 그리고 얼마 지나지 않아 스테워드(Steward) 와 레인널트(Reinert)는 둘 다 당근에서 동일 결과를 기술하고 있다. 그리고 구하(Guha)와 마헤슈와리(Maheshwari)가 당근의 화분에서 반수체 배아를 생산했을 때 배양된 배우자 식물에서 전형성능에 대한 증거가 입증 되었다 [4]. 이러한 결과들은 체세포 배 발생은 수정 없이 체세포 또는 영양 세포로부터 배아가 발달하는 유도된 식물 세포 전형성능의 한 형태로 나타나는 일반적 식물의 발달 과정임을 보여 준다 [5].

그러나 식물의 증식 방법으로 기내에서 체세포 배 발생의 광범위한 적용에 주요 저해 요인 중 하나는 많은 종 과 유전자형들에서 나타나는 낮은 비율의 유전적 가능성이다. 이러한 문제점은 배아 유도뿐만 아니라 염색체 배가(반수체 배아의 경우), 조직 형성(분화) 및 배에서 소식물체로의 전환(발아)을 포함하는 재생 과정의 후속 단계에도 영향을 끼친다. 이런 문제점을 극복하기 위한 기술적 방법으로 체세포 배를 유도하기 위한 필수적인 요소로 식물 성장 조절제, 일반적으로 호르몬의 조합으로 극복하기 위한 시도를 해왔다. auxin 종류인 2,4-D 와/또는 비 생물적 스트레스를 처리함으로써 여러 식물 절편 부위에서 유도 될 수 있다. 옥신 및 스트레스 유발로 체세포 배의 발생 근본적 메커니즘은 잘

알려져 있지 않지만 두 방법 모두가 체내성 옥신의 생합성을 유도하고, 이것이 전형성능으로 발생하도록 하고 전환하게 하는 성장으로 중요한 초기 단계로 생각된다 [6].

기내에서 호르몬 요법으로 체세포 배 발생유도는 이제 산업 및 학술 연구실 모두에 적용되는 표준 생명 공학 기술이다. 체세포 배는 기증체 절편의 유전형과 배수성을 유지하고 시험을 위한 육종 물질의 규모 확대, 고도의 이형 접합성 식물 및 긴 수명 주기를 가진 식물의 육종 주기 단축을 포함하여 다양한 응용을 위해 식물을 클론 증식하는 데 사용된다.

전형성능에 기초한 기내배양을 통하면 직접적으로나 간접적으로 기관이 형성이 된다. 직접기관형성은 세포, 조직, 기관에서 기관이 발생하는 것이며 캘러스 시기를 거치지 않기 때문에 짧은 시간에 효과를 얻기 때문에 효율적이다 [7-8]. 이 시스템을 이용하기 위해서는 보다 규칙적인 조밀한 세포 분열을 하는 절편이 유용하다. 단일 또는 다중 세포층 있는 단일 또는 다중 분열 세포는 형태학적으로 인식 가능한 배아로 발달하기 위해 분화가 잘 일어난다 [8-9].

*Kalanchoe pinnata*는 무성생식이 가능한 식물로써 넓은 잎을 가진 열대성 다육식물이다. *Kalanchoe*속의 식물들은 대부분이 잎의 가장자리에서 체세포 배가 형성되어 지면에 떨어져 모세포와 동일한 유전자의 개체가 생성되는 특징이 있고 식물의 전형성능을 실험할 수 있는 유용한 식물이다 [10-12].

*Kalanchoe pinnata*의 체세포 배는 식물기내배양 기술을 통해 호르몬의 종류와 여러 농도의 조합으로 직접 및 간접기관분화를 발생 할 수 있다. 식물조직배양에 쓰이는 auxin과 cytokinin의 비율과 적용시기에 따라서 기내 배양 결과가 여러 형태로 나타난다. kinetin은 Cytokinin에 속하는 것으로 식물의 세포분열을 촉진하는 호르몬으로 알려져 있다. Auxin에 속하는 호르몬들은, 식물의 정단에 작용을 하여 뿌리나 줄기발생을 돕는다 [13]. 여러 종류 중에서 Picloram(4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid)은 캘러스의 형성을 촉진하고 기관형성과 발생 역할을 하는 식물 호르몬이다. 이 호르몬들의 농도에 비율에 따라서 *K. pinnata*를 기관분화로 유도할 수 있다. 본 연구는 기내배양기술을 이용하여서 호르몬 종류에 따른 직접 기관 형성 과정과 그 효율성을 연구한다.

II. 재료 및 연구방법

1) *Kalanchoe pinnata* 재료 및 성장 방법

실험에 사용한 *Kalanchoe pinnata* 는 기내에서 배양되어서 무성생식으로 번식되어온 실험체이다. 포기나누기 방식으로 한 실험관에서 배양된 것을 사용되었기에 유전적으로 동일하다(Figure 1).

2) 시약

배지 제조에 쓰인 MS (Murashige & Skoog) medium 는 Duchefa Biochemie에서 구입하였다. Becton, Dickinson and Company 사의 Bacto Agar를 사용하였다. 식물호르몬으로 쓰인 시약은 성장조절물질로써 cytokinin과 auxin을 사용하였다. cytokinin으로 사용된 합성호르몬은 kinetin 이고 auxin은 picloram을 사용하였다. Sigma Chemical Co.에서 picloram (4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) 과 kinetin (N⁶-furfurylamino-purine)을 구입하여 사용하였다.



그림 1. 0.5% agar 배지에서 *Kalanchoe pinnata*가 지속적으로 성장
Figure 1. Continually growing on *Kalanchoe pinnata* with 0.5% agar medium

3) 식물조직배양

배양에 쓰인 배지는 1L의 비커에 MS배지 분말 4.48 g/L 과 sucrose 30g/L를 넣고 증류수에 용해한 다음 증류수를 첨가하여 1L로 만들었다. 250ml 씩 4개로 나눈 후에 호르몬을 첨가하였다. 이때 호르몬 농도는 kinetin (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L)과, picloram (0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4, 4.5, 5 mg/L)을 서로 조합하여 첨가한 뒤, autoclave (121°C, 20분)를 하였다.

4) 배양조건

기내배양 상태는 온도를 유지하기 위해서 incubator에서 성장시키며, 22~24°C의 온도에 24시간 중 14시간 30분을 빛 처리를 하였다. 암 처리로 9시간 30분을 설

정하였다. 일정한 조도를 유지하기 위해서 1,010 lm의 광도를 지닌 기내배양용 Plant Growth 램프를 사용하여 빛을 제공했다. 접종 후 성장시킬 때 스트레스를 경감시키기 위해서, 습도는 50~80%로 유지하였다.

5) 현미경 연구

현미경 Image는 TE2000(Nikon) inverted microscope를 사용하여 촬영하였다.

III. 연구결과 및 논의

1) 스트레스에 의한 소식물체 형성

*Kalanchoe pinnata*는 잎 가장자리 부위에서 체세포 배 형성을 무성생식을 통해서 한다. *K. pinnata*의 이러한 체세포배는 *in vivo* 상태에서 수분부족, 과도한 햇빛, 높은 온도, 높은 agar 농도 등에 의한 외부 스트레스에 따라 1st plantlet이 생성될 뿐만 아니라 2nd, 3rd. 까지도 생성이 된다(Figure 2). 기내배양에서도 이런 현상이 나타나서 스트레스에 관한 실험이 가능하다. 이러한



그림 2. *Kalanchoe pinnata* 잎에서 2번째 소식물체(화살표)의 생성
Figure 2. Generation of the 2nd plantlets(arrow) on a *Kalanchoe pinnata* leaf

요인들과 식물호르몬의 적절한 조합은 식물 체세포 배 발생, 기관 형성을 효율적으로 가능하게 한다 [13].

식물조직배양에서 일반적으로 식물체의 지지효과를 위해서 agar사용하는데 1%가 대부분에서 사용한다. 하지만 시간이 경과할수록 굳어지고 단단해지는 경향을 뛰어서 뿌리에 스트레스를 주는 경향을 주고 1.5%이상을 주면 수분부족현상과 압박효과로 잎에 스트레스가 전달하는 효과로 잎에 소식물체가 형성된다 [13-14]. 스트레스를 피하고 호르몬 효과를 위해서 그리고 배양배지에서 한천 0.5%에서 개체 형성이 증가하는 결과를 참고하여 직접기관형성을 유도하기 위한 실험을 진행

하였다. 무성생식을 유도하는 포기 나누기 방법으로 배양한 식물의 잎을 사용하였고 이를 유지하기 위해서 0.5% agar 농도를 첨가하여 조직의 발생을 유도하였다 (Fig 1).

2) 잎에서 뿌리의 발생과 분화

호르몬 농도로 kinetin은 0mg/L에서 0.5mg/L까지 0.1mg/L 간격으로 처리하여 실험을 진행하여 그 효과를 측정하였다. picloram은 0.5에서 5mg/L까지 0.5mg/L 간격으로 처리하여 조합을 사용하였다. 그 결과 잎에서 뿌리 분화율을 8주간 관찰한 결과이다 (Figure 3). kinetin 농도가 고정된 상태에서 picloram 농도 조합에서 고농도의 상태에 노출된 잎은 직접적인 뿌리 발생율은 낮아지는 경향을 나타내었고 0.1에서 70% 이상의 발생율을 보였다. 1.0을 초과할 경우부터 급속도로 저항하는 경향을 보여 2.5mg/L 이상 농도에서는 완전한 저항성을 띠었다. 이는 조직 발생 호르몬은 고농도에서 뿌리 발생을 억제하는 효과를 보여준다 할 수 있다. kinetin 농도는 0 - 0.5까지 영향이 미미하다. 반면에 picloram이 결정적으로 뿌리 발생에 중요하다는 것을 보여 주는 결과이다 (Figure 3).

Effects of Picloram with Various Concentration of Kinetin for Rooting

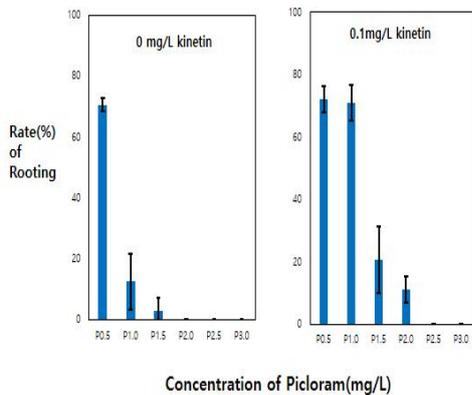


그림 3. 키네티와 피클로람을 여러 조합으로 처리한 8주 후 *K. pinnata* 잎의 발근 효과. X축의 P 0.5는 0.5mg/L 피클로람의 농도를 나타낸다.

Figure 3. After treating with various concentration of kinetin and picloram, effects of rooting from *K. pinnata* plantlet leaf after 8 weeks. P 0.5 on X axial represents concentration of 0.5mg/L picloram.

아직 초기발생이어서 주축과 모용만 발생하여 발달 상태를 좀 더 관찰해야 한다. 하지만 쌍자엽 식물의 전

형적인 주근계 발생구조를 나타낸다(Figure 4). *Kalanchoe pinnata* 절편에 호르몬을 처리한 후 직접기관발생을 유도하는 호르몬으로 kinetin과 picloram의 효과가 입증되는 결과를 보여주었고, 그 비율이 1:5-1:10의 농도차이가 효과적이라는 것이 입증 되었다. 뿐만 아니라 옥신의 효과가 *Kalanchoe pinnata* 뿌리 발생에 필수적이라는 명확한 실험 결과이다.

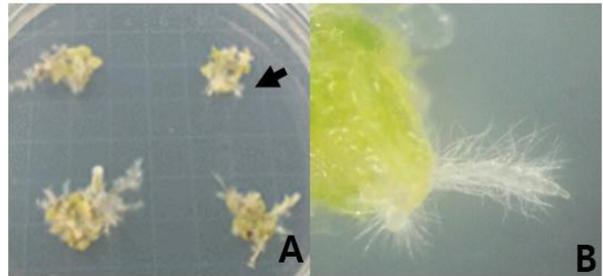


그림 4. 피클로람 0.5mg/L 와 키네티 0.1mg/L 처리, 8주 후 *K. pinnata* 소식물체 잎의 발근 효과. B는 A 이미지의 화살표 부분을 40배 확대한 발근 사진.

Figure 4. After treating with picloram 0.5mg/L and kinetin 0.1mg/L, effects of rooting from *K. pinnata* plantlet leaf after 8 weeks. B is a rooting picture from enlarged 40 times of arrow part on A image.

3) 잎에서 경엽부의 발생

잎에서 직접적으로 경엽부(shoot)발생에서 호르몬 효과를 실험하기 위해서 호르몬 농도는 kinetin 0mg/L에서 0.5mg/L까지 0.1mg/L 간격으로 처리하여 실험을 진행하여 그 효과를 측정하였다. picloram은 0.5에서 5mg/L 까지 0.5 mg/L 간격으로 처리하여 조합을 사용하였다. 그 결과를 잎에서 경엽부 분화율을 8주간 관찰한 결과이다(Figure 5). kinetin 농도가 고정된 상태에서 picloram 농도 조합에서 고농도의 상태에 노출된 잎은 직접적인 경엽부 발생율은 낮아지는 경향을 나타내었다. kinetin 0.5 mg/L에서 약 60% 정도의 발생율을 보였다. 1.0 mg/L을 초과할 경우부터 급속도로 저항하는 경향을 보여 완전한 저항성을 띠었다. 이는 고농도의 조직 발생 호르몬은 경엽부 발생을 억제하는 효과를 보여준다 할 수 있다. kinetin 농도는 0.5mg/L까지 영향이 점점 증가한다. 이는 경엽부 발생효과에는 cytokinin도 중요하다는 것을 보여준다.

경엽부 발생에 호르몬에 종류로 고려하여 보면 cytokinin 과 auxin의 조합이 결정적으로 경엽부 발생에 중요하다는 것을 보여 주는 결과이다. 그 비율이 1:1-1:2의 농도

차이가 효과적이라는 것이 입증 되었다(Figure 5). 피클로람 0.5mg/L 와 kinetin 0.5mg/L 처리한 후 8주 후는 발생초기 단계이다. 이것을 관찰한 외부모습은 모용에 둘러싸인 정단분열조직의 형태이며 잎과 줄기를 포함하는 전형적 경엽부 형태이다(Figure 6).

Effects of Picloram with Various Concentration of Kinetin for Shooting

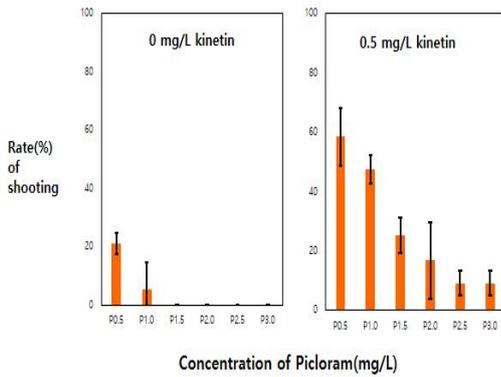


그림 5. 키네티와 피클로람을 여러 조합으로 처리한 8주 후 K. pinnata 잎의 경엽부 발생 효과. X축의 P 0.5는 0.5mg/L 피클로람의 농도를 나타낸다.

Figure 5. After treating with various concentration of kinetin and picloram, effects of shooting from K. pinnata plantlet leaf after 8 weeks. P 0.5 on X axial represents concentration of 0.5 mg/L picloram.

이 결과는 세포로부터 시작되는 발생과정에서 여러 요인 중에서 호르몬의 조합을 사용하여 전형성능의 효과를 극대화시켜 직접기관형성을 유도할 수 있다. 그리고 기내에서 대량 증식을 유도하는 기술의 기초가 될 수 있다고 사료된다 [15].

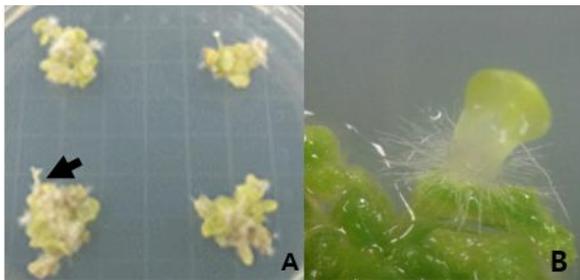


그림 6. 피클로람 0.5mg/L 와 키네티 0.5mg/L 처리, 8주 후 K. pinnata 소식물체 잎의 경엽부 발생 효과. B는 A 이미지의 화살표 부분을 40배 확대한 경엽부 발생 사진.

Figure 6. After treating with picloram 0.5mg/L and kinetin 0.5mg/L, effects of shooting from K. pinnata plantlet leaf after 8 weeks. B is a shooting picture from enlarged 40 times of arrow part on A image.

우리는 무성생식이 가능한 식물인 *Kalanchoe pinnata* 로 전형성능을 실험하였다. 잎 절편에서 직접발근 효과로는 picloram 농도가 0.1 mg/L에서 70%의 최고의 발생율을 보였다. kinetin 농도는 0 - 0.5까지 영향이 미미하다. *Kalanchoe pinnata* 절편에 호르몬을 처리한 후 직접기관발생을 유도하는 호르몬으로 kinetin과 picloram의 비율이 1:5-1:10의 농도차이가 효과적이라는 것이 입증되었다. 이것은 오옥신의 효과가 *Kalanchoe pinnata* 뿌리 발생에 필수적이라는 명확한 실험 결과이다.

잎 절편에서 직접 경엽부 발생 효과로는 picloram 농도가 0.5 mg/L에서 60%의 최고의 발생율을 보였다. kinetin 농도는 0.5 - 1.0 mg/L이며 발생에 중요한 영향을 준다. 이것은 *Kalanchoe pinnata* 절편에 호르몬을 처리한 후 직접 경엽부 발생을 유도하는 호르몬으로 kinetin과 picloram의 비율이 1:1-1:2의 농도 차이가 효과적이라는 것이 입증 되었다. cytokinin과 auxin의 조합이 결정적으로 경엽부 발생에 중요하다는 것을 보여주는 결과이다. 식물은 발생과 분화의 연속된 과정에서 호르몬의 효과는 중요하다.

References

- [1] Ikeuchi, M., Ogawa, Y., and Iwase, A., Sugimoto, K., Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143, 1442 - 1451, 2016.
- [2] Horstman A, Bemer M, and Boutilier K, A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*,4:201-216, 2017.
- [3] Krikorian, A. D., and Simola, L. K., Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris. *Physiologia Plantarum*, 105, 348-355, 1999.
- [4] Guha, S., and Maheshwari, S. C., Development of embryoids from pollen grains of *Datura* in vitro. *Phytomorphology*, 17,454-461,1967.
- [5] Arnold S., Sabala I, Bozhkov P., Dyachok J., and Filonova L., Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249, 2002.
- [6] Feher, A., Somatic embryogenesis-stress induced remodeling of plant cell fate. *BBA Gene Regulation Mechanisms*, 1849, 385 - 402, 2015.
- [7] Jung Y, Chung Y, and Kim D., Screening of Genes Which are able to Affect *Kalanchoe* Vegetative Reproduction. *Journal of Life Science* 21(6) 865~874, 2011.

IV. 결론

- [8] Miguel, C." and Marum, L., An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713-3725, 2011.
- [9] Williams, E. G. and Maheswaran, G., Somatic embryogenesis – factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443 - 462,1986.
- [10]Buchheim J.A., Colnum S.M., and Ranch J.P., Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plant growth. *Plant Physiology*. 89:768-775, 1989.
- [11]Garce's HMP, Connie EM, Champagne B, Townsley T, Park S, Malho R, Pedroso MC, Harada JJ,and Sinha, NR., Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *PNAS*. 104: 15578-15583, 2007.
- [12]Baldwin, J..T Jr *Kalanchoe*: The Genus and its Chromosomes. *American Journal of Botany*. 25: 572-579, 1938.
- [13]Park,J., Kim,J.S. and Kim,D., The change of somatic cell embryogenesis in *Kalanchoe pinnata* because of agar concentration in stimulating root stress. *J Plant Biotechnol* 44:320-324, 2017.
- [14]Kim, D., Overexpression of the Metal Transport Protein1 gene (MTP1) in *Arabidopsis* Increased tolerance by expression site, *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol.5(3), pp.327-332, 2019
- [15]Koltunow A.M. and Grossniklaus U., A Developmental Perspective. *Annu. Rev. Plant Biol*, 54, 547-574, 2003.