

생물학실험

-모듈 2 실험 보고서-

생물학실험 (001)

서울대학교 컴퓨터공학부
2017-18570 이성찬

2017년 11월 9일

Plant Biology

Abstract

이번 실험에서는 Model Organism으로 널리 쓰이는 애기장대(*Arabidopsis Thaliana*)를 특별한 처리가 된 MS 배지들에 배양하여 어떤 처리가 된 배지들인지 추측해 본다. 우선 애기장대 성체를 관찰하여 특징들을 파악해 보고, 약 2주간 배양된 애기장대를 현미경으로 관찰하여 각 배지에 어떤 처리가 되어있었는지 추측하고 배지에 배양된 식물들 간의 표현형을 비교해 본다. 실험을 통해 식물의 생장에 있어서 빛과 식물 호르몬의 역할을 알아본다.

1 Introduction

1.1 배경 이론

1.1.1 애기장대(*Arabidopsis Thaliana*)

애기장대는 가을에 파종하는 한해살이 식물으로, 상대적으로 짧은 생활사를 갖고 있어 식물학과 유전학에서 자주 사용되는 모델 식물이다. 진핵 생물인데 상대적으로 적은 게놈 (135 Mpb)을 갖고 있다. [1] 애기장대는 처음으로 DNA가 sequencing 된 식물이며, 식물 연구에 자주 쓰인다. [2]

애기장대는 완전한 생활사를 거치는데 약 6주가 걸린다. 꽃이 피는 중심 줄기는 3주 뒤에 자라기 시작하며 그 꽃은 자연적으로 수분된다. 더불어 페트리 접시, 수경 재배, 형광 조명, 온실에서도 잘 자란다. [3] 게다가 크기가 작아 좁은 공간에도 많이 배양할 수 있으며, 한 번에 많은 씨앗을 만들어 낸다. 이러한 점들로 인해 애기장대는 식물 연구에서 가장 널리 사용된다.

1.1.2 식물 호르몬

식물 호르몬은 식물의 생장, 발달, 세포와 조직의 분화에 영향을 주는 소량의 화학 물질이다. [4] 본 실험에서는 앱시스산과 에틸렌을 사용한다.

앱시스산 (Abscissic Acid)은 주로 식물 내에서 다른 호르몬들을 억제하는 역할을 한다. 식물이 일찍 발아하는 것을 막아주고 씨앗의 휴면 상태를 유지해 준다. 예를 들어 식물의 생장에 적합한 환경일 때 (충분한

빛, 온도, 수분이 존재할 때) 씨앗이 발아하여 원활하게 성장할 수 있도록 해준다. 앱시스산은 수분 조절에도 영향을 준다. 식물이 말라가고 있을 때, ABA가 축적되어 식물 잎의 기공을 막아준다. 이를 통해 증산작용을 억제하여 수분 손실을 막는다. [5]

에틸렌(Ethylene)의 경우 외부 기계적 stress에 대해서도 반응하며, 프로그램된 세포 자살 (apoptosis) 에도 관여한다. 가을이 되면 잎이 떨어지고 꽃이 시들어 떨어지는 것도 에틸렌에 의한 현상이다. 겨울이 되어서 뿌리에 수분이 부족해지는 경우에는 스스로 잎을 떨어뜨려 그 양분을 내년 봄에 새 잎을 만드는데 다시 사용하기로 한다. (이 과정은 Ethylene 과 Auxin 호르몬의 비율에 따라 조절된다) [6] 또 에틸렌은 과일이 익는 것을 도와준다. 처음에는 동물들로부터 자신의 씨앗을 보호하기 위해 열매를 딱딱하고 초록색으로 만들지만, 에틸렌이 생성되어 과일이 익은 후에는 과일의 싱싱함이 동물들을 유도하여 자신의 과일을 먹고 씨앗이 널리 퍼지도록 한다. [5] [6]

이번 실험에서 사용되는 *Arabidopsis* 에서 에틸렌은 hypocotyl(배축)을 신장시키기도 한다. [7] 그리고 에틸렌은 기체 호르몬이기 때문에 본 실험에서는 에틸렌의 전구체인 ACC를 사용할 것이다.

1.1.3 배지 배양

배지는 미생물, 세포, 작은 식물들의 생장을 돕기 위해 만들어진 고체, 액체이다. [8]

식물 배양 환경을 세밀하게 조절할 때 유용하게 사용할 수 있다. 현재 가장 널리 사용되는 MS 배지 (Murashige and Skoog)는 배지에 적절한 처리를 해주어 식물 조직 배양에 쓰인다. [9]

1.2 실험 목표

이 실험에서는 식물의 생장에 대해서 관찰하고 식물 호르몬들에 대해 알아보는 것을 목표로 한다. MS 배지를 직접 만들어 보고, 배지에 호르몬을 처리하여 애기장대를 배양해 본다. 광조건과 암조건 등 조건들에서 애기장대를 배양하여 시간이 지난 후 각 배지에서 처리에 따른 애기장대의 생장 상태를 살펴보고 비교해 본다.

1.3 실험 재료 및 방법

1.3.1 씨앗 소독 및 씨앗 뿌리기

다음 과정들은 모두 clean bench에서 수행하였다. 애기장대 씨앗을 준비하여 1.5ml e-tube에 넣었다. 여기에 Seed Washing Solution(75% EtOH + Triton X-100 0.1%) 1ml를 첨가하여 5분간 세게 흔들어 주었다. 파이펫으로 씨앗은 남긴 채 솔루션을 제거하고 한 번 더 솔루션을 넣고 15분간 세게 흔들어 주었다. 마찬가지로 솔루션을 제거하고 이번에는 100% EtOH 1ml를 넣고 살짝 흔들어 주었다. 이렇게 씨앗을 소독한 후, 필터페이퍼를 준비해 그 위에 파이펫으로 빨아들인 씨앗을 뿌렸다. 씨앗이 건조되는 동안 배지에 labeling을 해 주었고, 건조되면 최대한 일렬로 배지에 뿌려주었다. 그리고 배지를 테이프로 감아 닫아주었고, 은박지로 감싸 주었다. 모두 5개의 플레이트에 씨앗을 뿌렸는데, 각각 명조건, 암조건, $2.5\mu\text{M}$ ABA, $5.0\mu\text{M}$ ABA, $10\mu\text{M}$ ACC 배지이다.

1.3.2 애기장대 성체 관찰

준비된 애기장대 성체를 현미경으로 관찰해 보았다. 꽃잎, 암술, 수술, 꽃받침, 줄기

와 잎 그리고 뿌리 (뿌리의 경우에는 접시에 담아 흙을 털어내기 위해 반복적으로 물로 씻어내어 주어야 했다)를 관찰하고 사진을 촬영하였다.

1.3.3 애기장대 표현형 관찰

1.3.1에서 뿌린 애기장대를 일주일 후 은박지를 제거하고 플레이트에 따라 처리를 해 주고 배양기에 넣어주었다. 그리고 일주일 후 배양기에서 애기장대를 꺼내 애기장대의 표현형을 관찰하였다.

준비된 Scale Bar (1cm)를 테이블에 올려 놓고 배양한 식물이 손상되지 않도록 조심스럽게 핀셋으로 애기장대를 빼내어 테이블에 올렸다. 그리고 사진을 촬영하였다.

촬영한 사진들은 컴퓨터로 옮겨 ImageJ 프로그램을 이용해 애기장대 표현형(뿌리의 길이, 하배축 길이)를 계산해 보고 그 값들을 기록했다.

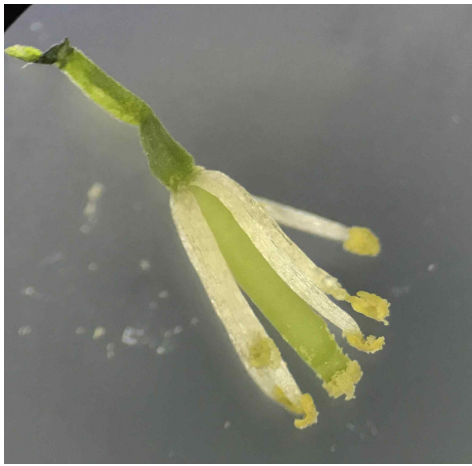
2 Results

2.1 애기장대 성체 관찰 결과

애기장대의 꽃잎, 암술, 수술, 줄기, 잎, 뿌리를 50배로 관찰해 보았다. 꽃잎의 경우 아래 그림1과 같았다. 꽃에 꽃잎이 6개 정도 붙어 있음을 확인할 수 있었다. 꽃잎을 핀셋으로 떼어내니 그림2와 같이 암술과 수술을 확인할 수 있었다. 그 다음으로는 줄기를 관찰하였는데, 그림3에 희미하게 나타난 결을 관찰할 수 있었다. 줄기에 붙어있었던 잎을 떼어 잎을 관찰해 보니 그림4와 같이 잎에 붙어있는 삼각 구조를 확인할 수 있었다. 마지막으로는 뿌리를 관찰했는데, 흙을 완벽하게 털어내지는 못했지만 그림5와 같이 수염 뿌리를 관찰할 수 있었고, 뿌리털도 관찰이 가능했다.



<그림1: 애기장대 성체 꽃잎, 50배>



<그림2: 애기장대의 암술과 수술, 50배>



<좌: 그림3: 애기장대 줄기, 50배>



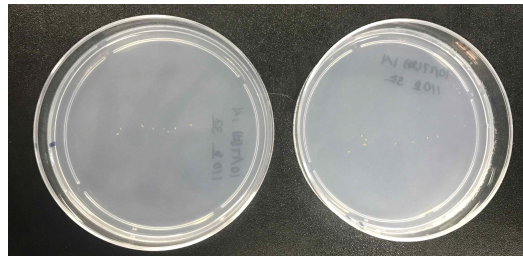
<우: 그림4: 애기장대 잎, 50배>



<그림5: 좌- 애기장대의 수염뿌리, 6.7배
우- 애기장대 뿌리의 뿌리털, 50배>

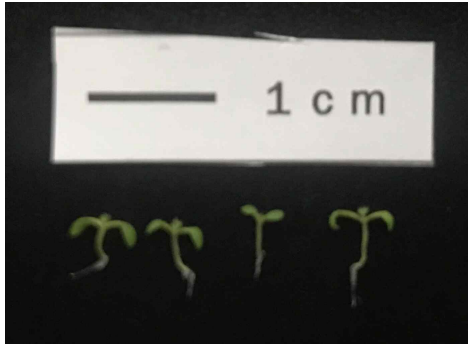
2.2 애기장대 배양 결과

5개의 MS 배지에 애기장대를 배양했고, 명조건, 암조건, ABA ($5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$), ACC의 5가지 처리를 해 주었다. 우선 ABA의 경우 1.1.2에서 살펴보았듯이 씨앗이 휴면 상태를 유지하도록 해주는 호르몬이다. 그렇기에 ABA를 처리해준 호르몬은 그림6과 같이 애기장대가 발아하지 않았다.



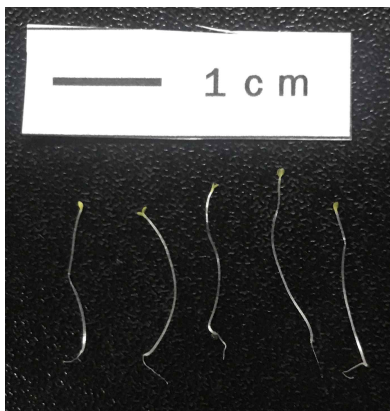
<그림6: ABA를 처리한 배지에서는 애기장대가 발아하지 않았다.>

한편, ACC를 처리한 배지에서는 그림7과 같이 에틸렌의 Triple Response로 인해 줄기가 짧아지고 두꺼워졌으며 줄기가 휘어져 있는 모습을 관찰할 수 있었다.

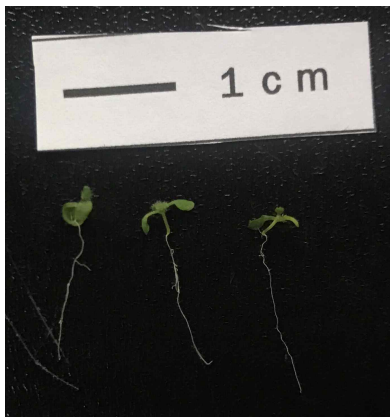


<그림7: ACC 처리한 배지에서 배양된 애기장대>

남은 2개의 배지에 대해서는 다음과 같이 판단하였다. 식물의 발달에는 빛이 필수적이기 때문에, 그림8과 같이 떡잎이 없는 애기장대는 암조건에서 배양된 것이며, 그림9처럼 떡잎이 있는 애기장대는 명조건에서 배양된 것이라고 결론을 내렸다.



<그림8: 암조건에서 배양된 애기장대>



<그림9: 명조건에서 배양된 애기장대>

더불어 아래 표는 각 배지에서 배양된 애기장대의 부위별 길이이다. 이 데이터는 ImageJ 프로그램을 사용해서 얻어졌다.

	명조건	암조건	ACC
하배축	2.30	-	3.17
표준편차	0.21	-	4.04
뿌리	13.6	17.3	2.59
표준편차	1.51	0.84	0.72

<표1: 배양된 애기장대의 부위별 길이(mm)>

3 Conclusion

이번 실험을 통해 성체 애기 장대를 각 부위별로 관찰해 보고, 또 주어진 5개의 MS배지에서 각각 자라난 애기장대의 표현형을 보고 각 배지가 어떤 처리를 받았는지 결론을 내렸다.

씨앗에서 싹이 나오지 못한 2개의 배지들은 식물의 싹을 휴면상태로 유지시켜 주는 ABA가 처리된 배지들이었다. 나머지 3개의 배지들 중에서 배양된 식물의 길이가 유난히 짧고 두꺼운 배지가 있었는데 이는 에틸렌의 Triple Response가 나타난 것으로 이 배지는 ACC가 처리된 것이라고 판단했다. 마지막 2개의 배지들에 대해서는 싹이 난 것을 명조건에서 배양된 배지, 싹이 나지 않은 것을 암조건에서 배양된 배지라고 결론을 내렸다. 명조건과 암조건에서 식물이 표현형의 차이를 보였던 것으로 보아 식물이 성장하는데 빛이 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

표1의 결과와 그림7, 8, 9를 참고해 보면, 명조건의 경우 떡잎이 나며 하배축과 뿌리가 자랐다. 이와 암조건을 비교해 보면 암조건의 경우 아예 싹이 나지 않았고 뿌리가 났는데, 뿌리의 길이가 명조건과 비슷하다.

명조건과 ACC 처리된 배지를 비교해 보면 ACC가 처리된 애기장대는 Triple Response에 의해 식물 전체의 길이가 짧아졌다는 것을 확인할 수 있다. 명조건에서 자

란 애기장대와 비교했을 때 하배측과 뿌리 길이의 합이 ACC 처리된 애기장대가 작다. 또 그림7에서 알 수 있듯이 식물의 줄기나 뿌리가 휘어져서 자랐다.

4 Discussion

4.1 식물 호르몬

식물 호르몬은 유전자의 표현과 전사 단계, 세포 분열, 식물의 생장에 영향을 주며, 식물 호르몬은 식물 개체 내에서 자연적으로 생성된다. 식물들의 경우 동물들과 달리 호르몬을 생성해주는 샘/선(gland)가 없어서 (이 차이는 동물에게는 lymphatic, cardio-vascular circulatory system이 있다는 것에 기인한다) 식물들의 경우 화학 물질을 개체 내에서 이동시킬 때 다른 방법을 사용해야 한다.

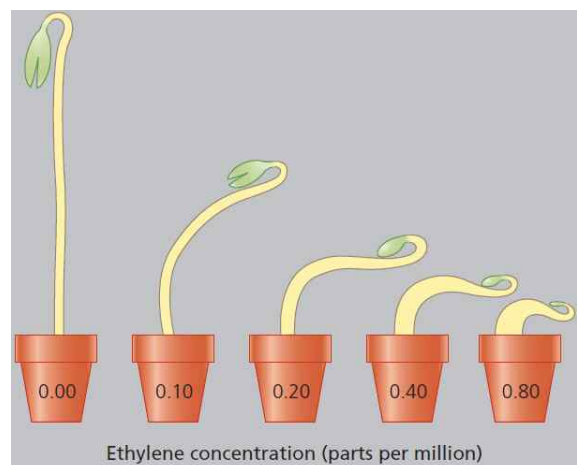
식물 내에서 식물 호르몬이 이동하는 방법은 다양하지만 세포질 유동과 세포들 사이에서 입자와 이온이 서서히 확산되는 것을 활용한다.

식물 호르몬이 개체에 영향을 주기 위해 필요한 호르몬의 양이 매우 작아서 식물 호르몬에 대한 연구는 어려웠고, 1970년대가 되어서야 과학자들이 호르몬과 식물 생리학을 연관 지어 잘 설명할 수 있었다. [10]

4.2 Triple Response [5]

콩 씨앗이 토양 아래서 발아하려고 하는데 위에서 돌이 가로막고 있는 상황을 생각해 보자. 씨앗의 싹이 장애물(돌)을 밀어내려 하다 보면 돌의 무게에 의해 식물에게 전달되는 힘이 식물에서 에틸렌을 생성하게 만든다. 에틸렌은 이렇게 삼중 반응(Triple Response)을 일으켜 장애물을 피할 수 있도록 해준다. 이 반응의 3단계는 다음과 같다. 우선 줄기의 생장 속도가 더뎈다. 그리고 줄기는 두꺼워져서 튼튼해지도록 하며, 수직으로 돌을 뚫을 수는 없으니 줄기가 휘어 가로로 자라게 한다. 이렇게 튼튼해진 줄기가

가로로 자라다가 에틸렌의 효과가 미비해지면 식물은 다시 수직으로 자라기 시작하게 된다. 그런데 또 장애물을 만나면 또다시 에틸렌을 생성하여 위 과정을 반복하여 장애물이 없으면 수직으로 자라 싹을 틔우게 된다. 여기서 식물이 가로로 자라는 이유는 돌 때문에 가로막혀서 그런 것이 아니라 에틸렌 자체의 효과에 의한 것임을 확인할 수 있다. 위의 그림7에서도 장애물이 없었지만 애기장대가 휘어져 있는 것으로 보아 장애물에 의한 것은 아님을 확인할 수 있다. 장애물이 없어도 삼중 반응은 나타남을 알 수 있다. 이러한 삼중 반응은 Arabidopsis 돌연변이들이 비정상적인 삼중 반응을 나타낼 때, 식물의 신호 전달 경로를 파악하는 데에도 도움을 준다.



<그림10: 에틸렌의 농도에 따른 식물의 삼중 반응>

* Reference

- [1] "Genome Assembly". The Arabidopsis Information Resource. Retrieved 29 March 2016.
- [2] Coelho SM, Peters AF, Charrier B, et al. (2007). "Complex life cycles of multicellular eukaryotes: new approaches based on the use of model organisms". *Gene*. 406 (1-2): 152-70. doi:10.1016/j.gene.2007.07.025. PMID 17870254.
- [3] D.W. Meinke; J.M. Cherry; C. Dean; S.D. Rounsley; M. Koornneef (1998). "Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis". *Science*. 282 (5389): 662-682. Bibcode:1998Sci...282..662M. doi:10.1126/science.282.5389.662. PMID 9784120.
- [4] Öpik, Helgi; Rolfe, Stephen A.; Willis, Arthur John; Street, Herbert Edward (2005). *The physiology of flowering plants* (4th ed.). Cambridge University Press. p. 191. ISBN 978-0-521-66251-2.
- [5] Campbell Biology, 10th Edition, pp 846~848
- [6] Principles of life, 2nd Edition, pp 557~567
- [7] Debatosh Das, "Ethylene- and shade-induced hypocotyl elongation share transcriptome patterns and functional regulators", "Plant Physiology", 21-06-2016
- [8] Madigan M, Martinko J, eds. (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1
- [9] Trigiano, Robert N. & Gray, Dennis J. (2010). *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. p. 186. ISBN 1-4200-8326-0.
- [10] Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press. p. 140. ISBN 0-12-660570-X.