

뿌리 스트레스를 유발하는 agar 농도에 따른 *Kalanchoe pinnata*의 체세포 배 형성 변화

박종범 · 김진석 · 김동균

The change of somatic cell embryogenesis in *Kalanchoe pinnata* because of agar concentration in stimulating root stress

Jongbum Park · Jin-Seok Kim · Donggiun Kim

Received: 26 July 2017 / Revised: 5 September 2017 / Accepted: 5 September 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Development of modern agricultural machinery and accompanying agricultural development cause soil compaction and reduce growth by stressing roots. *Kalanchoe pinnata* was used to investigate the impact of stress on rooting and changes in plant growth and reproduction. *K. pinnata* forms somatic embryos capable of asexual reproduction at the edge of leaves. Impact of root pressurization of *K. pinnata* on somatic embryogenesis and organ differentiation according to external stress factors was investigated by using a high concentration of agar and this phenomenon was studied histologically. Agar concentration in culture media ranged from 0.5%-1.5% to induce a compression effect on roots. The stem and leaf of *K. pinnata* were subjected to a microtechnique process to study changes in tissue. *In vivo*, *K. pinnata* produced 2nd and 3rd plantlets at edges of leaves from lack of water and excessive lighting conditions. In *in vitro* culture studies, the lower the concentration of agar, the higher the population and the higher the biomass, but plantlet did not occur in leaf bends. Conversely, as concentration of agar increased, increase in the number of individuals was low. Plantlet development occurred only in agar 1.5% medium. The difference in agar concentration was a stressor in the root of *K. pinnata*, and thus the pattern of asexual reproduction changed from the division method in root to a plantlet generation in leaf. This suggests root pressurization may act as stress and change in the plant reproduction pattern.

Keywords Agar concentration, *In vitro* culture, *Kalanchoe pinnata*, Somatic cell embryogenesis

서 언

전 세계적으로 인구증가와 경제발전은 계속되고 있지만 필요한 식량을 증산시키기 위한 토지는 제한적이다. 그래서 식량문제를 해결하기 위해서 현대화된 높은 기계 의존으로 집약적 농업방법을 편리하게 이용한다. 하지만 농업용기계의 다양화, 작물의 다양화 그리고 수분 함량이 낮은 유기물 비료 등의 사용으로 토양이 압축되어 간다(Shah et al, 2017). 토양의 압축이 증가되면 토양의 경도, 관입 저항성, 용적밀도 증가가 가속화 되어 다공성, 응집체 안정성, 토양수분 전도성, 영양소 가용성을 감소시켜서 토양의 양질 상태가 악화되어 간다(Lee et al, 2015). 이러한 토양 압축현상은 깊은 토양에서 뿌리 신장을 제한하고 더욱이 토양이 건조해져 뿌리에 저항이 증가하여 뿌리성장을 방해하게 된다(Lynch and Wojciechowski, 2015). 결과적으로 뿌리가 받는 흙의 압박 스트레스는 토양의 건조와 함께 식물 성장에 작용되어서 식물의 생식에 영향을 주게 되어 최근에 농작물 생산성에 민감한 과제이다(Hussain et al, 1999, Shen et al, 2016).

*Kalanchoe pinnata*는 환경영향에 민감하게 반응하여 무성생식이 가능한 식물로서 피자식물문, 목련강, 범의귀목, 돌나물과, *Kalanchoe*속에 속하는 식물이며 만손초 또는 air plant 라고도 불리는 넓은 잎을 가진 열대성 다육식물이다. *Kalanchoe*속의 식물들은 일반적으로 잎의 가장자리에서 체세포배가 형성되어 이것이 budding되어 궁극적으로 plantlet를 형성한 후 땅에 떨어져 동일한 유전자의 개체가 생성되는 무성생식을 하는 특징이 있다(Baldwin, 1938). *Kalanchoe*속은 총 125종으로써 아시아, 유럽, 아프리카가 원산지이며, 대부

J.B. Park · J.-S. Kim · D.G. Kim (✉)
신라대학교 생명과학과
(Department of Life Science, Silla University, Busan 46958, Korea)
e-mail: botanist@silla.ac.kr

분 관목 또는 다년생이지만, 몇몇은 1년생 또는 2년생이다. *Kalanchoe*속에서 속하는 식물들의 공통점은 꽃잎의 안쪽 세포가 성장하여 꽃잎들을 바깥으로 밀어내어 꽃이 피고 꽃잎의 바깥 세포가 성장하여 꽃이 닫히는 특징이 있다(Jung et al, 2011). *Kalanchoe pinnata*는 단주기 때 꽃봉오리를 형성하여 개화하지만 장주기가 되면 영양생식 방법으로 무성생식 방법의 체세포 배를 형성하게 된다(Garces et al, 2007). 대부분의 *Kalanchoe pinnata*는 스트레스에 의해서 체세포배 형성을 유도한다. 특히 성장환경에 따른 조건으로써 햇빛의 강도, 습도변화, 영양분 부족, 온도상승 등이 스트레스의 종류로 작용하여 *K. pinnata* 성장에 영향을 준다(Koltunow and Grossniklaus, 2003, Arnold et al, 2002).

본 연구는 농업 생산성과 관계 있는 뿌리의 생장발육과 뿌리에 미치는 토양의 압박 스트레스의 연관관계를 연구하기 위하여 무성생식의 모델 식물인 *Kalanchoe*를 선택하였다. 그 이유는 여러 종류 스트레스에 반응하고 스트레스를 받을 경우 빨리 반응하여서 체세포 배를 형성함으로써 스트레스 여부를 표현형으로 알려주기 때문이다. 또 뿌리 스트레스를 식물에 주면서 오랜 기간 배양 실험을 하기 위하여서 흡을 사용한 토양 압박 실험보다는 효율적이고 정량적인 토양 압박현상과 유사한 효과를 시도하기 위해서 여러 agar 농도를 사용한 기내 배양 방법을 사용하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 *Kalanchoe pinnata*는 실험실 창가에서 성장 시켜서 발생된 소식물체를 멸균 처리하여 사용하였다. 이때 실험실 창가의 생육 조건은 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 3000 lux 광도에 8H/16H 장주기 조건이었다. 배지 제조에 쓰인 MS (Murashige & Skoog) 배지는 Duchefa Biochemie에서 구입하였고 agar는 Becton, Dickinson and Company 사의 Bacto Agar를 사용하였다.

Agar 농도에 따른 식물 배양

배지는 일반적으로 식물조직배양에서 쓰이는 MS배지를 이용하였으며, 1N NaOH과 1N HCl을 사용하여 pH 5.7~5.8로 조정하였다. MS배지에 agar 농도를 서로 달리 하여 0.5~1.5%씩 첨가하여 autoclave (121°C , 20분)한 후 멸균된 배양병에 분주하거나 또는 멸균된 plastic petri dish에 분주하여 실험에 사용하였다.

배양병에 접종할 때는 실험실에서 성장시킨 *K. pinnata*의 체세포 배를 채취한 뒤 2%의 NaOCl로 10분간 표면살균한 다음 clean bench에서 멸균수로 5회 세척한 후 체세포 배를 3개씩 접종하였으며, petri dish에 접종할 때에는 위와 같은 방법

으로 체세포 배를 5개씩 접종하였다.

Agar 농도에 따른 실험은 14시간 30분 명처리와 9시간 30분 암 처리하여 $22 \sim 24^\circ\text{C}$ 로 조절된 low temp incubator에서 식물을 성장시켰다. Incubator 안의 조명은 1,010 lm의 광도를 지닌 식물재배용 형광등 PG램프 4개를 통해 빛을 제공했으며, 습도는 50~80%로 유지하며 접종 후 50일 동안 성장시켰다.

Microtechnique

식물체를 $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ 이내의 조각으로 절단하여 FAA (formalin, acetic acid, ethyl alcohol)용액으로 36시간 실온에서 고정시킨 후 alcohol 상승농도 순서로 탈수하고 xylen으로 치환하였다. Xylen치환된 조직을 순수 paraffin으로 침투, 매몰 시켜서 rotary microtom으로 $10 \mu\text{m}$ 두께로 절단하고 0.05% toluidine blue에 30분 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

스트레스에 의한 plantlet 형성 관찰

*Kalanchoe pinnata*는 잎 만곡부위에서 무성생식을 체세포 배 형성조직을 통해서 한다. *K. pinnata*의 이러한 체세포 배는 in vivo 상태에서 3000-lux 과도한 햇빛, 28°C 의 높은 온도 등에 의한 외부 스트레스에 따라 1st plantlet (budding)이 형성될 뿐만 아니라 2nd plantlet (budding), 3rd plantlet (budding)까지도 형성이 된다 (Fig. 1).

Agar 농도에 따른 식물 생장 비교

외부 스트레스에 반응하여 plantlet를 형성하는 무성생식 방법을 응용하여 뿌리발생과 무성생식의 연관관계를 연구하기 위하여 agar 농도를 달리한 MS배지에서 *K. pinnata*를 배양한 결과, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.5% agar농도에서 생육 변화가 뚜렷하게 관찰되었다. 저농도(0.5%)의 agar배지에서는 급속



Fig. 1 Generation of the 1st, 2nd, 3rd plantlet of *Kalanchoe pinnata*, grown at 28°C with 8/16 dark/light cycles at least 3000-lux standard light

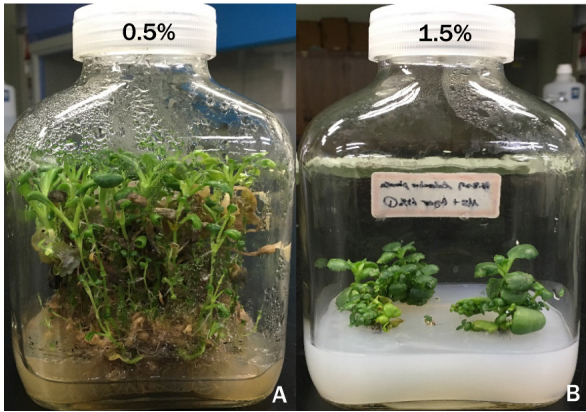


Fig. 2 Sixty-day-old *K. pinnata* in culture bottles (A: MS media with 0.5% agar, B: MS media with 1.5% agar)

히 성장해서 개체수가 급격히 증가하여 성장발육이 뚜렷하게 나타났다. 그러나 고농도의 agar를 포함할수록 발육상태는 늦어졌다. 특히 1.5%의 agar에서는 성장이 매우 저조하였다 (Fig. 2). 서로 다른 agar 농도의 배양병에서 60일 가량 성장시킨 *K. pinnata*의 줄기 길이, 무게, 개수, 그리고 plantlet의 개수를 agar 농도별로 비교한 결과, agar 농도가 낮을수록 agar 농도가 높은 배지의 식물체 보다 줄기, 즉 뿌리에서 포기나누기방법의 무성생식으로 개체 수가 증가하는 경향을 나타내었다. 식물의 생체량(biomass)을 파악하기 위하여 줄기 길이를 측정한 결과, agar 농도가 낮은 배지 위의 식물은 agar 농도가 높은 배지의 식물보다 길이생장을 많이 이루었다. agar 농도가 낮을수록 식물체의 길이가 길어지는 경향을 나타냈으며 agar 농도가 높을수록 농도가 낮은 식물체와 반대로 줄기 길이가 짧아지는 경향을 나타냈다(Fig. 3A). 즉, agar의 농

도가 낮은 배지에서는 agar농도가 높은 배지보다 생체량이 빠르게 증가하는 경향을 나타내었음을 알 수 있다.

생체량 비교의 정확도를 높이기 위하여 식물체들의 무게를 측정된 결과, 식물체 무게는 agar 농도가 낮을수록 무게가 증가하였는데(Fig. 3B), 이러한 현상은 agar 농도가 낮을수록 길이생장을 많이 하는 이유와 연관되어 있다고 볼 수 있다. 길이생장을 많이 할수록 개체 개수당 길이는 길어지며 이는 곧 무게와 연결된다. 따라서, 길이를 비교한 것과 마찬가지로 agar 농도가 낮음에 따라 생체량이 증가하며 농도가 높아지면 생체량이 상대적으로 낮은 현상을 나타내었다. 저농도의 agar는 성장발육에 있어서 스트레스로 작용하지 않기 때문에 정상적인 발육을 하여서 뿌리에서 포기나누기방법의 무성생식으로 개체량이 종합적으로 증가한다. 하지만, 배지 안에서 1% 이상의 agar 농도는 성장발육에 스트레스로 작용하여서 생육에 저해하는 효과를 보인다.

Agar 1%와 1.5%에서는 개체 수의 변화가 없었지만 0.5%와 0.8%는 5~6배 개체 수 증가를 보였다(Fig. 3C). 즉, agar 농도가 낮을수록 뿌리에서 포기나누기방법의 무성생식으로 개체수가 빠르게 증가하는 경향이 있으나 앞만곡부에서 무성생식 방법의 plantlet 발생은 거의 없었으며, agar 농도가 높은 배지에서는 개체수의 증가가 낮은 경향을 나타냈다.

*K. pinnata*의 plantlet 개수를 agar 농도별로 비교하여 *K. pinnata*의 특징 중 하나인 잎의 만곡부에서 발생하는 무성생식 방식의 plantlet의 형성 및 발달에 영향을 주는지에 대해 실험한 결과, agar 1.5% 농도를 제외한 나머지 농도에서는 plantlet이 발생하지 않는 현상이 나타났다(Fig. 3D). 인위적인 스트레스로 agar가 사용되어서 1.5% agar 농도를 포함한 배지에서는 외부 환경의 스트레스인 수분부족, 과도한 햇빛, 영양결핍에

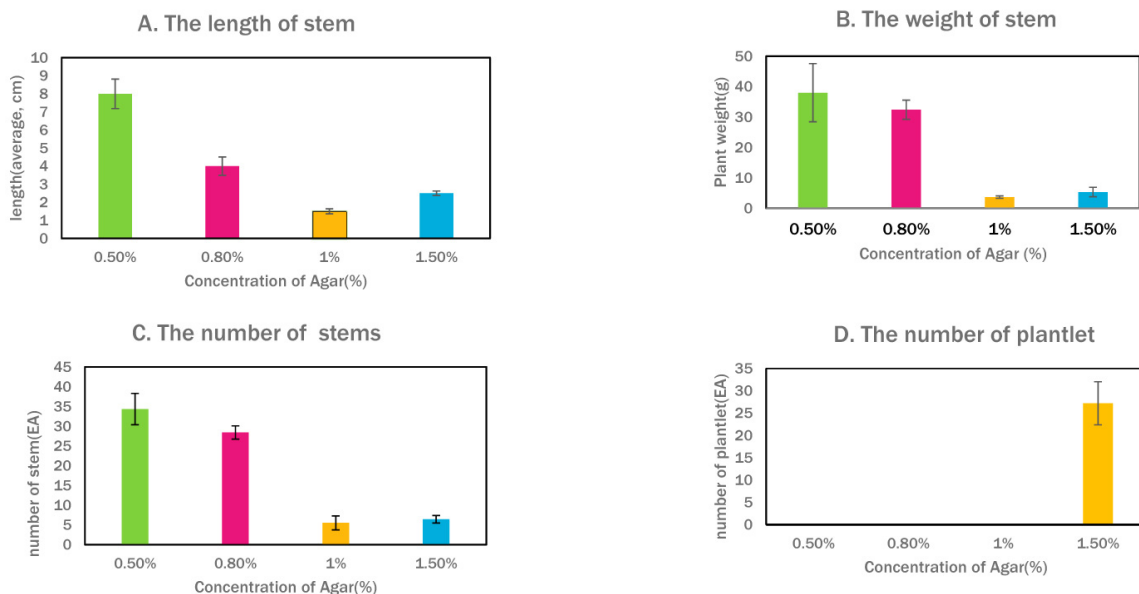


Fig. 3 Impact of growth and increases in average of plantlet in various concentration of agar media in culture bottle with *K. pinnata*. Results are representative of three independent experiments

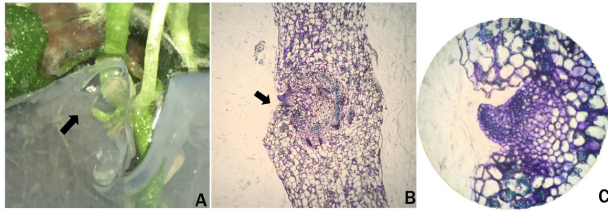


Fig. 4 Plantlet generation from stem (A) and longitudinal section of plantlet with *K. pinnata* stem grown-up on the 0.5% agar media (B, C). The arrows indicate somatic embryo cell: B. $\times 40$, C. $\times 100$

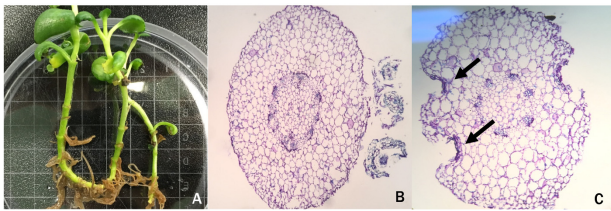


Fig. 5 *K. pinnata* stem grown-up on the 0.5% agar media. Transverse section of stem (B, C: $\times 40$) and shoot of *K. pinnata* grown-up on the 0.5% agar (A). The arrows indicate scar of plantlet

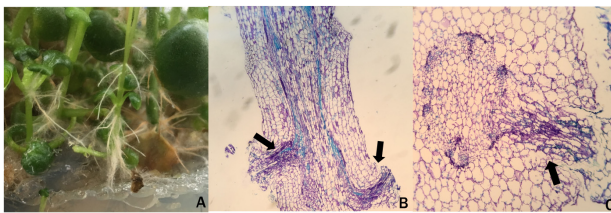


Fig. 6 *K. pinnata* shoot grown-up on the 0.5% agar media. Lateral root generation; longitudinal (B), transverse (C) section. (B - C: The arrows direct bundle sheath and pericycle)

서 나타나는 plantlet 형성을 관찰하였다(Fig. 3D). 이러한 비정상적인 plantlet 형성은 정단분열조직의 비정상적 형성과 관계가 있을 것이라 생각된다.

Agar 0.5% 배지의 배양병에서 자란 *K. pinnata*의 줄기를 microtechnique을 사용하여 횡단 및 종단 방향으로 절단한 뒤 줄기에서 plantlet, 줄기, 뿌리의 분화를 관찰하였다. 다량의 세포가 집적되어 뿌리 등의 조직이 발생할 부분을 관찰할 수 있었다(Fig. 4~6).

또한 유관속 및 중심주가 일반적인 쌍자엽식물의 줄기가 아닌 뿌리와 유사하며, agar 0.5% 에서의 *K. pinnata*는 배지의 경계면 근처에서 직접 plantlet과 뿌리, shoot를 유관속으로부터 분화시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 측근은 유관속초에서 발생하는 것을 관찰하였다(Fig. 6). 유일하게 plantlet이 발생한 agar 1.5% 배지에서 생장시킨 *K. pinnata* 잎의 만곡부에 있는 plantlet 형성 부위를 횡단 절단하여 관찰한 결과, 체세포 배 형성조직을 기점으로 유관속이 점차 바깥으로 뻗어 나가는 것을 관찰할 수 있었으며, 뻗어 나간 유관속은 바로 옆의

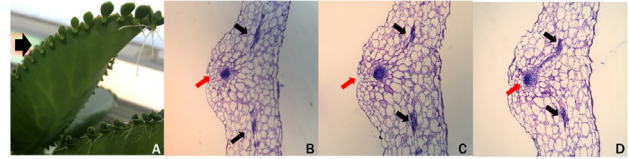


Fig. 7 Plantlet generation at leaf margin (A) and histological observation of plantlet generation with *K. pinnata* grown-up on the 1.5% agar media. Transverse section (B~D): The arrows indicate somatic embryo cell (red) and vascular bundle (black).

체세포 배 형성조직과 연결되는 것을 확인하였다(Fig. 7).

*Kalanchoe pinnata*에서 무성생식으로 plantlet 형성방법은 잘 알려져 왔지만 기원 조직이 어디서부터인지는 2가지 학설이 있다. 첫째는 엽맥의 형성조직의 사부에서 세포분열이 시작되어 체세포배를 형성한다는 “endogenous” theory(내부기원설)이 있다(Beal, 1932). 반면에 앞에서 표피조직아래 위치한 일차 책상 유조직중에서 체세포배로 기원 된다는 “exogenous” theory(외부기원설)이 있다(Hofmeister, 1868, Howe, 1931). 고온과 강한 빛에 의한 외부 스트레스가 체세포배 발생원인이라면 외부기원설이 합리적인 설명이 될 수 있을 것이다. 그것은 잎에 영향을 직접 주어서 유조직인 책상 유조직이 가능성 있게 배발생을 유도할 수 있기 때문이다(Garce’s et al, 2007). 그러나 뿌리에서 받는 스트레스가 잎에 전달되어서 배발생을 유도할 경우는 내부기원설이 더욱 설득력 있게 설명될 수 있다. 그리고 본 연구의 0.5% agar배지에서 포기 나누기식 무성생식으로 개체 수가 증식하는 것과, 1.5% agar배지에서 체세포 배형성에 따른 개체 수 증식 조직에서 관찰되는 유관속 형성조직에서 기원되는 체세포 배형성 과정은 내부기원설을 설명하는데 효과적이다. 그 이유는 뿌리 압박스트레스 유무에 관계없이 무성생식은 내부기원이지만 스트레스가 주어질 때는 무성생식 방식이 뿌리에서 앞으로 바뀌는데 식물내부기관에서 스트레스를 전달하는 가능성을 설명하기 때문이다. 이는 유전자와 그에 따른 단백질을 연구하면 분명해 질 것으로 사료된다.

*Kalanchoe pinnata*는 잎의 만곡부에서 형성되는 체세포 배에 의해 무성생식 하는 것으로 알려져 왔고 체세포 배 형성을 증가시키는 원인은 강한 빛, 고온 생육조건, 습도 부족, 물 공급 부족에 의한 것으로 알려져 왔다(Koltunow and Grossniklaus, 2003, Arnold et al, 2002). 본 실험 결과에 의하면 agar 고농도(1.5%)에 따른 뿌리의 발육 저하가 잎에서 체세포 배 형성의 중요한 원인이 될 수 있음을 보여준다. Agar의 농도가 높아짐에 따라 강한 빛, 고온 생육조건, 저습도, 건조한 환경과 유사하게 생육이 지연되면서 앞에서 plantlet이 증가하는 것은 뿌리의 발육상태가 나빠지는 고농도의 단단한 agar 배지가 뿌리로 번식하는 삼목, 포기나누기 방법 등의 무성생식현상을 저해하는 스트레스의 일종으로 식물이 받아들이기 때문으로 생각된다(Pedroso and Durzan, 2000). Agar 0.5%에서 배양된 식물은 뿌리 번식되는 무성생식 방법으로 대량생산이

가능할 수 있을 정도로 급속도로 증가하는 현상을 보인다. 특히 측근 발생은 특이할 만하고 식물체 발생 또한 증가한다. 일반적으로 plantlet 형성이 잎에서 일어나는데 반하여 agar 0.5%에서 배양된 식물에서는 plantlet 이 특이하게도 줄기에서 형성되어 나타난다. 이것은 체세포 배가 잎 대신 줄기에서 일어나는 이례적인 현상으로 생각된다. 뿌리에 압박 스트레스가 증가하면 무성 생식 양식의 변화가 잎에서 소식물체 형성으로 나타나는 현상을 보인다. 이는 뿌리에서 받는 스트레스가 뿌리에서 형성되는 무성생식 양식인 포기 나누기식 소식물체 형성이 방해 받고 스트레스가 잎으로 전이되어서 나타나는 것으로 사료 된다. 뿌리 압박 스트레스는 뿌리 성장 저하와 생육발달은 저하되지만 잎에서 체세포 배 형성 촉진현상은 식물의 종 보존 본능적 현상으로 보여진다. 그러나 농업 생산성 관점에서는 소출감소와 영양결핍으로 토양 압박현상은 농업의 미래를 어둡게 한다. 토양의 압박을 피할 수 있는 유기농법 혹은 자연농법 등 다양한 대체방법을 찾아야 한다(Lee et al, 2015). 또한 뿌리 압박에 관계하는 유전자를 찾는 것도 병행되어야 한다. 우리가 *kalanchoe* 식물의 영양번식에 영향을 줄 수 있는 유전자 선발 연구에서 stress에 의해서 증가될 수 있는 anthocyanin 축적 유전자와 상관관계가 있다는 것을 제시하였다(Jung et al, 2011). 앞으로 뿌리와 토양 압박에 관한 연구를 많이 수행하여 이에 효과적인 유전자 연구가 활발히 계속된다면 뿌리 압박에 관한 stress가 밝혀질 것을 기대한다.

적 요

현대적인 농업기계발달과 그에 따른 집약농업 발달은 토양 압축을 야기하고 뿌리에 압박 스트레스를 가하여 생육을 저하시킨다. 뿌리에 압박 스트레스를 작용하여 식물 성장발육에 영향과 생식의 변화 양상을 연구하기 위해 *Kalanchoe pinnata*를 사용하였다. *K. pinnata*는 잎의 가장자리에서 무성 생식이 가능한 체세포 배를 형성하는 것으로 알려져 왔다. *Kalanchoe pinnata*의 뿌리 압박 효과를 고농도 agar 농도를 사용하여 외부 스트레스 요인에 따른 체세포 배 형성 및 기관 분화 경향의 변화를 관찰하고 이러한 현상을 조직학적으로 연구 하였다. 스트레스 요인으로 배양배지에서 agar의 농도를 0.5%에서 1.5%까지의 범위로 조성하여 뿌리에 압박 효과를 야기하였고, 이후 *K. pinnata*의 줄기와 잎 등을 microtechnique 방법으로 조직의 변화를 연구하였다. *In vivo*에서 *K. pinnata*는 수분부족 및 과도한 광조건에 의해 잎 가장자리에서 2nd, 3rd plantlet이 생성이 되는 것을 확인하였다. 기내배양 연구에서 agar의 농도가 낮아질수록 개체 수의 증가 및 생체량의 증가가 빠르지만 잎 만족부에서 plantlet의 발생은 나타나지 않는 경향을 나타냈다. 반면에 agar의 농도가 증가할수록 개체 수의 증가가 낮은 경향을 나타냈다. 또한 agar 1.5%의 배지에서

만 잎에서 plantlet 발생현상이 나타났다. Agar 농도의 차이는 *K. pinnata*의 뿌리에 스트레스 요인으로 작용하여 무성생식의 양상이 뿌리에서 포기 나누기 방법에서 잎에서 소식물체 형성으로 변화하는 경향을 나타냈다. 이는 뿌리 압박 효과가 스트레스로 작용하여 식물 생식 양상을 변화시킬 수 있게 되는 것으로 사료된다.

References

- Arnold S, Sabal a I, Bozhkov P, Dyachok J, and Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Pla Cell, Tiss and Org Cul* 69:233-249
- Baldwin, JT (1938) *Kalanchoe*: The Genus and its Chromosomes. *Ameri J Bot* 25:572-579
- Beals CM (1923) An histological study of regenerative phenomena inplants. *Ann Misso Bot Gard* 10:369-384
- Buchheim JA, Colnurn SM, and Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plant growth. *Pla Physio* 89:768-775
- Garce's HMP, Connie EM, Champagne B, Townsley T, Park S, Malho R, Pedroso MC, Harada JJ, and Sinha, NR (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *PNAS* 104:15578-15583
- Hofmeister W (1868) *Allgemeine Morphologie der Gewächse*. p.422
- Howe MD (1931) A morphological study of the leaf notches of *Bryophyllum calycinum*. *Ameri J Bot* 13:387-390
- Hussain A, Black CR, Taylor IB, and Roberts JA (1999) Soil Compaction. A Role for Ethylene in Regulating Leaf Expansion and Shoot Growth in Tomato? *Plat Physio* 121:1227-1237
- Jung Y, Chung Y, and Kim D (2011) Screening of Genes Which are able to Affect *Kalanchoe* Vegetative Reproduction. *J Life Sci* 21:865-874
- Koltunow AM and Grossniklaus U (2003) A Developmental Perspective. *Annu. Rev. Plant Biol* 54:547-574
- Lee SB, Choi WA, Hong SG, Park KL, Lee CR, Kim SC, and An MS (2015) Physical Properties of Organic Vegetable Cultivation Soils under Plastic Greenhouse. *Kor J Org Agric* 23:963-974
- Lynchand JP and Wojciechowski T (2015) Opportunities and challenges in the subsoil: pathways to deeper rooted crops. *J Exper Bot* 66:2199-2210
- Pedroso MC and Durzan DJ (2000) Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell Death in *Kalanchoë* Leaves. *Ann Bot* 86:983-994
- Shah AN, Tanveer M, Shahzad B, Yang G, Fahad S, Ali S, Bukhari MA, Tung SA, Hafeez A, and Souliyanonh B (2017) Soil compaction effects on soil health and crop productivity. *Environ Sci Pollut Res*
- Shen P, Wu Z, Wang C, Luo S, Zheng Y, Yu T, Sun X, Sun X, Wang C, and He X. (2016) Contributions of rational soil tillage to compaction stress in main peanut producing areas of China. *Sci Repor* 6:38629