

# 大豆組織培養細胞 - *Rhizobium*에 의한 窒素固定力

姜 相 載 · 朴 愚 喆

慶北大學校 農科大學 農化學科

## The Establishment of Nitrogen Fixation by Cultured Cell-*Rhizobium* Association through Tissue Culture Technique in Soybean

Kang, Sang Jae · Park, Woo Churl

Dept. of Agricultural Chemistry, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

### Summary

This experiment was carried out to elucidate the factor of nitrogenase formation and to establish the nitrogen fixation system in mixed culture of cultured cells and rhizobia through tissue culture technique using three soybean varieties, Hwangkeum, Namcheon and D 68-0099 as host plants.

The results obtained were as follows;

The callus was induced in embryo and radicle, but not in hypocotyl. The most favorable callus induction was caused by the individual application of 2,4-D and NAA at the concentration of 2mg/l and 4mg/l, respectively, but in case of treating both 2,4-D and kinetin, that was done at the concentration of 0.2mg(2,4-D)/0.05mg(kinetin)per liter. The growth of cultured cell was good at the concentration of 2.0mg(2,4-D)/1 and 0.2mg(2,4-D)/0.05mg(kinetin)per liter. When cultured cells were inoculated with *R. japonicum* 019 and 011, their growths were considerably inhibited.

The addition of single amino acid inhibited the growth of cultured cells. Hwangkeum was inhibited considerably by methionine and leucine. The inhibition of growth by single amino acid can be abolished by the addition of certain amino acids.

The differentiation of adventitious root was good at the concentration of 2.0mg 2,4-D and 0.2 mg 2,4-D/0.05mg kinetin per liter.

Of three host plants tested with 25 *R. japonicum* strains, Hwangkeum had affinity for 10 strains, Namcheon for 7 strains and D68-0099 for none. The nitrogen fixing abilities of Hwangkeum and Namcheon caused by cultured cell-*Rhizobium* association were high in strain 019, 007, and in 007 mixed with 119, respectively.

## 緒 論

豆科作物-根瘤菌 共生の 經濟的 重要性은 最近 數年동안 根瘤菌과 高等植物의 關係를 研究하기 爲하여 쏟은 努力만큼 크다고 하겠다. 그러나 이러한 係에 關한 많은 研究들이 根瘤의 多樣性和 複雜性으로 制限을 받아왔으며 이러한 關心들은 이들의 親和性을 研究하기 爲하여 *in vitro* 技術을 發達시키게 되었으며 *Rhizobium*에 依한 窒素固定 研究에 놀랄만한 知識을 提供하게 되었다.<sup>8)</sup>

White (1934, 1935)<sup>28,29)</sup>가 당근과 담배에서 最初로 Callus培養을 成攻한 以來 많은 品種에서 培養細胞로부터 植物體를 *in vitro*에서 再分化시키는 方法들이 研究되어 왔다.

Blaydes (1966)<sup>5)</sup>는 子葉에서 Gamborg (1968) 등<sup>13)</sup>은 뿌리細胞에서, Miller (1963)<sup>20)</sup>는 子葉과 뿌리細胞에서 各各 Callus를 誘導하였다는 報告가 있고 Kimball (1973)<sup>17)</sup> 등이 胚軸斷片에서 不定芽를 分化시켰다는 報告가 있으며 Bingham (1977)<sup>4)</sup> 등은 胚軸에서 誘導한 Callus組織에서 뿌리 및 胚와 類似한 構造를 얻었다는 報告가 있으나 完全한 植物體로의 分化가 극히 어려운 것으로 알려져 있으므로 大豆는 組織培養 研究의 좋은 對象으로 되어 왔다.

培養基에서 植物細胞가 成長하는 동안 必要한 窒素原은 Ammonium과 Nitrate이다.<sup>1, 3, 9, 10, 12, 26)</sup> 植物培養體에 있어서 Ammonium이 蛋白質 合成에 더욱 直接的이지만 암모늄염만을 넣은 培地에서의 培養細胞는 正常的인 成長을 하지 못하며 Nitrate를 利用하기 爲하여 Ammonium을 必要로 한다<sup>26)</sup>고 報告되어 있고 單一 아미노산은 大豆 培養細胞의 成長을 沮害하며 다른 아미노산의 添加로 그 沮害作用이 減少되는 것으로 報告되어 있다.<sup>1, 2, 3, 7, 26)</sup>

根瘤菌이 宿主植物인 豆科作物의 組織中에서 窒素를 固定하기 爲하여는 Nitrogenase 活性을 나타내기 爲한 特定한 Host factor가 必要하다고 생각되어 왔으며<sup>30)</sup> 豆科作物뿐만 아니라 非豆科作物의 培養細胞와 根瘤菌이 association하여 Nitrogenase 活性을 나타낸다는 報告가 있다.<sup>6, 18)</sup>

Rhizobia와 大豆培養細胞와의 混合培養에서 窒素固定係를 確立하기 爲하여는 根瘤菌이 培養細胞의 成長에 주는 影響이 重要하며, 特定條件下에서 大豆 培養細胞와 根瘤菌을 混合培養 하였을때 根瘤菌

Nitrogenase活性을 Acetylene還元法으로 測定하는 方法들이 報告되어 있다.<sup>7, 15, 23, 24, 25)</sup>

現在에는 根瘤菌의 Nitrogenase 生成要因과 根瘤의 感染機作을 究明하기 爲하여 組織 및 細胞培養 技術을 많이 利用하고 있다.

따라서 本 研究에서는 大豆 組織培養에 關한 基礎資料와 組織培養 細胞와 根瘤菌의 親和로 因한 Nitrogenase 活性의 測定 可能性을 調査하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. Callus의 誘導

供試材料는 黃金, 南川 및 無根瘤 大豆인 D68 0099等 세 品種이며 먼저 NaOCl 溶液에서 殺菌한 후 다시 Et-OH에서 殺菌하고 殺菌水로 洗滌하여 發芽前의 胚, 發芽後의 幼根 및 胚軸 斷片을 Callus 誘導用 explant로 使用하였으며 26°C±1에서 暗培養하였다.

#### • 生長調節劑의 影響

各 部位別 Callus形成能 및 Callus 形成에 必要한 生長調節劑의 適定 濃度를 찾기 爲하여 2, 4-D, NAA, Kinetin, 및 이들의 組合濃度에서 調査하였으며 이때 使用한 基本 培地는 PRL-4<sup>12)</sup> 培地이며 그 組性은 表 1과 같다.

### 2. 細胞培養

上記에서 誘導된 Callus는 26°C±1, 暗室에서 培養하면서 各 實驗을 修行하였으며 이때 使用한 培地는 B<sub>3</sub><sup>11)</sup> 培地이며, 그 組性은 表 1과 같다.

#### • 生長調節劑의 影響

2, 4-D 0, 0.2, 1.0, 2.0mg/l, Kinetin 0.00, 0.05, 0.25, 0.50mg/l 및 2, 4-D/Kinetin 0.00/0.00, 0.2/0.05, 1.0/0.1, 2.0/0.5mg/l.의 濃度에서 培養細胞의 成長에 對한 生長調節劑의 影響을 調査하였다.

#### • Rhizobium接種의 影響

培養細胞를 B<sub>3</sub>培地上에 接種하여 2日째와 4日 째에 *R. japonicum* 019, 011을 10<sup>8</sup>cell/ml 程度로 0.05 ml 接種하여 生體重量으로 成長을 調査하였다.

#### • 不定根의 生成

生長調節劑의 組合濃度에 따른 大豆 培養細胞의

Table 1. Composition of the media used for the soybean tissue culture

components (mg/l)	PRL-4	B <sub>5</sub>	SCP	SCN
KNO <sub>3</sub>	1000	2500	1000	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	134	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	300	300
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90	150	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30	-	-	-
KCl	300	-	65	65
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	1000	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	500	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	250	35	35
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	150	-	100
NaFe-EDTA	32	32	32	32
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	10	4.4	4.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	3	1.6	1.5
ZnSO <sub>4</sub>	3	2	1.5	1.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	-	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25	0.025	-	0.04
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.25	0.025	0.025	0.025
KI	0.75	0.75	0.75	-
m-inositol	100	100	100	100
Glycine	-	-	2.0	2.0
Thiamine HCl	10	10	0.1	0.1
Pyridoxine HCl	1	1	0.1	0.1
Nicotinic acid	1	1	0.5	0.5
2,4-D*	2.0	2.0	2.0	-
N-Z amine type A** 2000	-	-	-	-
Kinetin	-	-	0.1	-
Sucrose	30000	30000	30000	30000
Agar (g)	8	8	10	10
pH	5.8	5.5	6.0	6.5

\* : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

\*\* : Casein hydrolysate.

기관형성을 조사하기 위하여 2, 4-D 및 Kinetin 농도에 따른不定根의 形成 程度를 調査하였다.

#### • 아미노산의 影響

2, 4-D 2 mg/l가 들어 있는 B<sub>5</sub>基本培地에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1mM)代身에 아미노산 1mM씩을 넣어 培養細胞의 成長을 調査하였다.

#### • 窒素固定力 測定

約 6個月間 繼代培養하여 온 大豆 培養細胞와 *Rhizobium*의 親和에 依한 Nitrogenase 活性을 Acetylene還元法<sup>10)</sup>에 依하여 다음과 같은 Gas Chromatography 條件으로 하여 Porapak N이 충전된 0.3×2 m stainless steel Column을 使用하였고 Column, Injection 및 FID溫度는 各各 55°C, 65°C, 65°C로 하였으며 Carrier gas流速은 50ml/min로 하였다.

### 結果 및 考察

#### Callus의 誘導

大豆의 組織培養에서 品種, 部位 및 生長調節劑에 對한 影響등을 調査한 結果는 表 2~4와 같다.

表 2는 供試 세 品種의 部位 및 2, 4-D 濃度別 Callus 形成能과 生體重量을 調査한 結果이다.

Table 2. Callus induction frequency and fresh weight at 2,4-D conc. on PRL-4 medium

2,4-D conc. (mg/l)	Cultivars	2												
		0	2			4			8			16		
		E*	R**	H***	E	R	H	E	R	H	E	R	H	
Hwangkeum	C. I. F.	-	10/10	10/10	1/7	5/9	5/10	0/9	3/10	3/10	0/8	3/10	3/9	0/9
	F.W. (mg)	-	39.51	35.57	35.59	29.31	29.37	-	28.73	28.59	-	28.91	25.35	-
Namcheon	C. I. F.	-	9/9	9/19	0/10	5/7	5/7	0/10	3/10	3/10	0/9	1/9	1/10	0/10
	F.W. (mg)	-	65.73	57.58	-	50.05	48.45	-	33.99	33.85	-	33.91	23.10	-
D <sub>68</sub> -0099	C. I. F.	-	10/10	10/10	1/10	4/10	4/10	0/10	2/9	1/7	0/9	1/10	1/10	0/10
	F.W. (mg)	-	25.27	24.95	21.89	23.52	22.73	-	21.78	22.43	-	21.58	20.95	-

\* : Embryo, \*\* : Radicle, \*\*\* : Hypocotyl, C. I. F. : Callus Induce Frequency, F.W. : Fresh Weight

Table 3. Callus induction frequency and fresh weight at various NAA conc. on PRL-4 medium

NAA conc. (mg/l)	Cultivars	2											
		0	2			4			8			16	
		E*	R**	H***	E	R	H	E	R	H	E	R	H
Hwangkeum	C. I. F.	-	-	-	8/10	6/9	0/10	1/10	1/10	0/9	1/0	1/10	0/10
	F.W. (mg)	-	-	-	44.48	45.77	-	20.85	19.95	-	28.08	27.95	-
Namcheon	C. I. F.	-	-	-	9/10	4/10	0/9	1/10	1/9	0/10	-	-	-
	F.W. (mg)	-	-	-	41.85	40.07	-	29.18	29.10	-	-	-	-
D <sub>68</sub> -0099	C. I. F.	-	-	-	10/10	9/10	0/9	2/10	1/8	0/8	-	-	-
	F.W. (mg)	-	-	-	25.37	26.25	-	26.11	25.33	-	-	-	-

\* : Embryo, \*\* : Radicle, \*\*\* : Hypocotyl, C. I. F. : Callus Induce Frequency, F.W. : Fresh Weight

Table 4. Callus induction frequency and fresh weight at 2,4-D/kinetin conc. on PRL-4 medium

2,4-D conc. (mg/l)		0	0.2			1.0			2.0		
Kinetin (mg/l)			*H	N	D	H	N	D	H	N	D
0.00	C. I. F.	-	10/10	10/10	9/10	10/10	9/9	10/10	10/10	10/10	9/9
	F. W. (mg)	-	44.57	64.96	25.33	44.95	44.97	26.75	79.58	74.92	27.55
0.05	C. I. F.	-	9/9	10/10	9/9	10/10	9/10	8/8	10/10	8/8	9/9
	F. W. (mg)	-	102.11	85.34	31.19	79.92	65.38	28.54	45.66	46.53	25.24
0.25	C. I. F.	-	8/10	10/10	7/8	4/8	6/10	5/7	2/9	3/10	5/10
	F. W. (mg)	-	32.38	48.09	21.35	62.14	54.94	21.14	54.97	36.33	20.97
0.50	C. I. F.	-	1/8	2/10	2/10	2/10	3/9	2/9	2/7	1/10	1/9
	F. W. (mg)	-	23.53	26.53	19.87	27.55	30.22	20.01	26.84	25.74	18.79

\*: Hwangkeum. N: Namcheon D: D<sub>68</sub>-0099. C. I. F.: Callus Induce Frequency, F.W.: Fresh Weight

供試品種間에는 Callus 形成能의 差異가 없으나 南川의 境遇 生體重量이 가장 높았으며 D 68-0099는 낮은 편이었다.

胚와 幼根의 境遇 接種한 거의 모든 explants에서 Callus가 形成되었으나 胚軸에서는 形成되지 않았다.

供試品種 모두 2, 4-D의 濃度에는 큰 차이를 나타내고 있으며 2 mg/l 일때가 가장 良好하며 그 이상의 濃度에서는 Callus 形成能이 좋지 않았다.

表 3은 NAA의 濃度에 對한 影響을 調査한 것으로 供試品種間에는 差異가 없었으며 4 mg/l 일때가 Callus 形成能 및 生體重量이 가장 良好하였다.

表 4는 2, 4-D와 Kinetin 組合濃度에 對한 Callus 形成能 및 生體重量을 調査한 結果이다.

生長調節劑가 전혀없는 培地에서는 Callus가 전혀 形成되지 않았고 Kinetin만의 培地에서도 전혀 Callus가 形成되지 않았다.

供試品種 모두 2, 4-D (0.2mg/l) / Kinetin (0.05 mg/l) 일때 Callus 形成能 및 生體重量이 가장 良好하며 Kinetin을 0.5mg/l 넣은 培地에서는 Callus 形成能이 상당히 저하됨을 알 수 있다.

이와같은 結果는 Gamborg等<sup>11)</sup>이 뿌리細胞에서 Callus를 誘導하였다는 報告와 같으나 Kimball等<sup>17)</sup>이 可能하다고 報告한 胚軸에서 Callus 誘導는 전혀 되지 않았다.

2, 4-D는 植物 組織培養에 있어서 脫分化를 일으키는데 添加하는 物質로서 널리 使用되며 그 作用 機構 및 特性等은 널리 研究되어 왔으며 특히 蛋白質 合成에 影響을 주며 Nitrate reductase 活性等에 影響을 준다는 報告等이 있다.

## 細胞培養

### • 生長調節劑의 影響

2, 4-D, Kinetin 및 이들의 組合濃度에 따른 細胞의 成長을 調査한 結果는 그림 1과 같다.

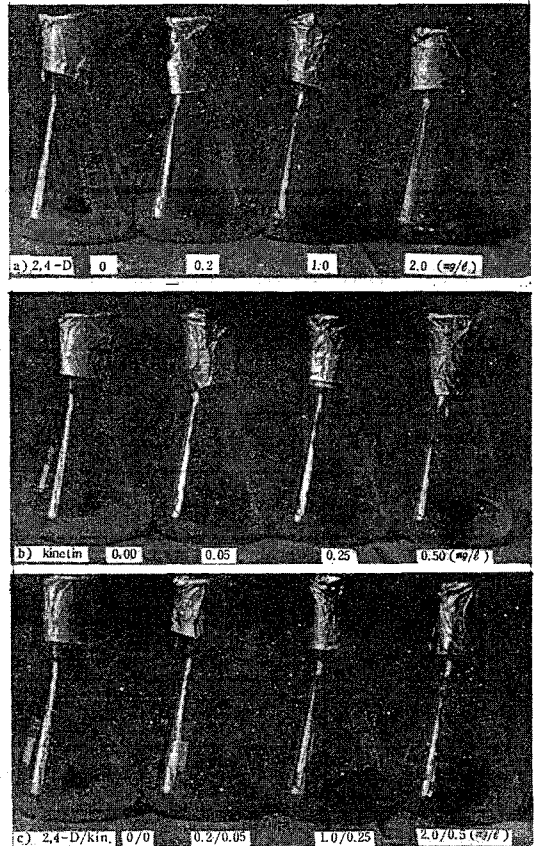


Fig. 1. Growth of soybean cultured cells at various 2,4-D, and kinetin conc. on B<sub>5</sub> medium.

2,4-D 1.0mg/l 2.0mg/l 일 때가 良好하며 2,4-D와 Kinetin 組合濃度에서는 2,4-D (0.2mg/l)/Kinetin (0.05mg/l) 일 때가 가장 良好하였으며 對照區에서는 成長이 거의 없었다.

• *Rhizobium* 接種의 影響

培養細胞는 純粹培養에서 新鮮한 培地로 옮겼을 때 正常的으로 成長한다.

移植한지 2日, 4日째에 *Rhizobium*을 接種한 結果는 그림 2, 3, 4와 같았다.

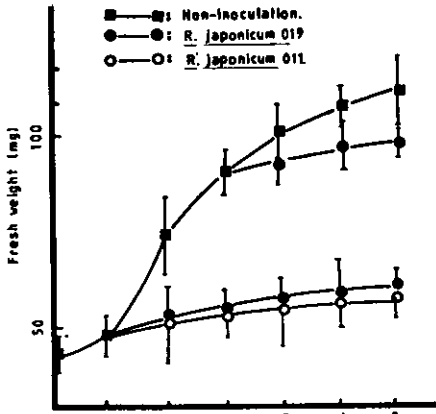


Fig. 2. Inhibition of growth of Hwangkeum soybean cells by *Rhizobium* cells. Soybean cells on BS medium were mixed with *Rhizobium* 019, 011 on the 2nd or 4th day.

Data are from 7 replicates, and inoculum was 43.5 mg.

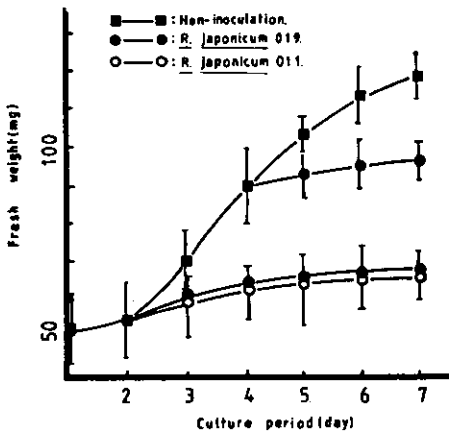


Fig. 3. Inhibition of growth Namcheon soybean cells by *Rhizobium* cells. Soybean cells on BS medium were mixed with *R. japonicum* 019, 011 on the 2nd or 4th day.

Data are from 7 replicates, and inoculum was 51.8 mg.

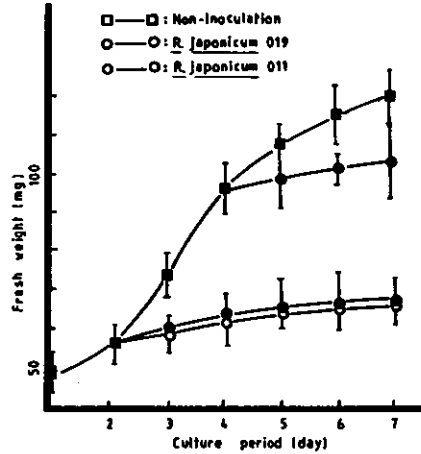


Fig. 4. Inhibition of growth of D68-0099 soybean cells by *Rhizobium* cells. Soybean cells on BS medium were mixed with *R. japonicum* 019, 011 on the 2nd or 4th day.

Data are from 7 replicates, and inoculum was 47.8 mg.

그림 2, 3, 4에서 보는 바와같이 大豆 培養細胞와 *Rhizobium*을 混合培養하였을 때 培養細胞의 成長은 減少되었으며 *Rhizobium*을 接種한지 24hrs 後에 Callus는 淡황색에서 적갈색으로 變化하였다.

이 結果는 Yamaguchi等<sup>21)</sup>의 報告와 一致하며, 2日째와 4日째에 *R. japonicum* 019 및 011을 接種하였을 때 培養細胞는 成長이 없었으며 약간의 증가는 菌體의 增加로 생각되며, 組織培養에서 細胞는 다른 細胞와 접촉하게 되면 풍부한 營養分이 있음에도 成長이 중지 된다는 報告<sup>19)</sup>와 同一한 結果로서 Soybean Cell이 *Rhizobium*에 依하여 細胞내 反應을 阻害함으로써 培養細胞의 成長이 阻害되는 것으로 생각된다.

• 不定根의 生成

培養細胞의 器官形成에 對한 生長調節劑의 影響을 調査한 結果는 表 5, 그림 5와 같다.

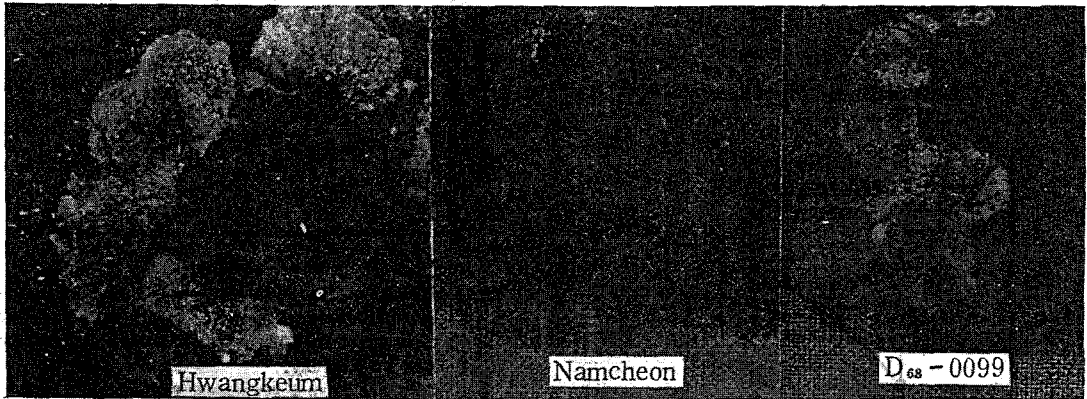
不定根의 生成은 2, 4-D 2.0mg/l 일때 좋은 反面 Kinetin만의 培地에서는 形成되지 않았다. 2, 4-D (0.2mg/l)/Kinetin (0.05mg/l) 일때 7개의 不定根이 分化되어 가장 왕성하였다.

個體分化는 Auxin과 Cytokinin 濃度の 調節로 可能하다는 報告<sup>4,17)</sup>가 있다.

즉, Auxin濃도가 높을 때 뿌리가 分化되고 Cytokinin의 濃도를 높이면 Shoot가 分化된다고 하였다.

Table 5. Adventitious root formation at various conc. of 2,4-D and kinetin on B<sub>5</sub> medium

Cultivars	2,4-D				Kinetin			2,4-D/Kinetin				
	0	0.2	1.0	2.0	0	0.05	0.25	0.50	0	0.2/0.05	1.0/0.25	2.0/0.50
Hwangkeum	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	++	-
Namcheon	-	+	+	+	-	-	+	-	-	++	++	-
D <sub>68</sub> -0099	-	+	-	++	-	-	-	-	+	+	-	-

Fig. 5. Adventitious root formation at various conc. of 2,4-D and kinetin on B<sub>5</sub> medium.

大豆에서는 完全한 植物體로의 再分化가 極히 어려운 것으로 알려져 있으므로 器官形成에 對한 生長調節劑에 關한 더 많은 研究가 있어야 할 것으로 思料된다.

#### • 아미노산의 影響

大豆 培養細胞의 成長에 아미노산의 有効度를 調査하기 爲하여 實驗한 結果는 그림 6, 7 과 같다.

그림 6, 7 은 황금콩의 아미노산 影響을 調査한 것으로 NO<sub>3</sub>만의 培地에서는 어느 정도 成長이 可能하였으며 대부분의 아미노산은 細胞의 成長을 둔화시켰다.

Methionine과 Leucine이 가장 저해를 많이하며 Asparagine과 Lysine은 약간 저해시켰다.

그러나 Glutamine은 황산 암모늄과 비슷한 結果를 나타내었다. 이러한 阻害作用은 다른 아미노산의 添加로 상당히 회복되었다.

이러한 結果는 Gamborg等<sup>12)</sup>과 Behrend等<sup>3)</sup>의 報告와 一致하며 成長의 阻害가 일어나는 理由는 培養細胞內의 Nitrate reductase 活性을 阻害하여 나타내는 現象이라고 思料된다.

#### • 培養細胞와 *Rhizobium*의 親和性

大豆 培養細胞와 *Rhizobium*의 親和에 依한 窒素

固定力를 調査한 結果는 表 6과 같다.

使用한 25個 菌株中에서 황금에서는 10個 菌株, 南川에서는 7個 菌株에서만 Nitrogenase活性을 나타내었고 D68-0099에서는 전혀 活性을 나타내지 않았다. *R. japonicum* 菌株 85-HG-1, 005, 180, 208等은 황금에, *R. japonicum* 010, 119, 602는 南川에만 特異的으로 Nitrogenase 活性을 나타내었다.

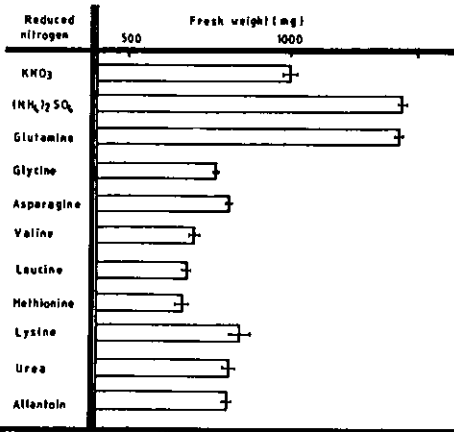
황금의 경우 *R. japonicum*. 菌株 85-HG-1, 010, 007이 높은 活性을 보였고, 菌株 208, 113, 320에서 낮은 活性을 보였다.

南川에서는 010이 特異的으로 親和性이 높았으며 007, 119는 비교적 높게 나타났으며 008은 가장 낮게 나타났다.

使用 菌株中 *R. meliloti*, *R. trifolii*는 전혀 活性이 나타나지 않았으며 Glutamine과 Succinate를 添加한 培地에서는 Nitrogenase 活性을 促進하였으나 添加하지 않은 培地에서의 *Rhizobium* 및 Callus自體만으로는 活性이 나타나지 않았다.

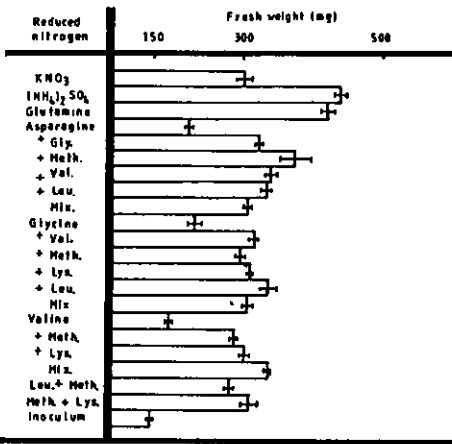
Callus에 對한 *R. japonicum*의 窒素固定 反應은 單一 菌株를 接種하였을때 보다 混合菌株를 使用하였을때가 대체로 높았다.

Scowcroft等<sup>22)</sup>은 Callus없이 *Rhizobium* 自體로서 Nitrogenase 活性이 나타난다고 報告하였으나 本實驗에서는 전혀 나타나지 않았다.



The amount of soybean cell inoculated initially was 580.77 mg, and grown for 10 days. Data are from 7 replicates. Ammonium sulfate in BS medium was replaced with several of 1 mM reduced nitrogen each

Fig. 6. The effect of reduced nitrogen on the growth of Hwangkeum soybean cells in cultures.



The amount of soybean cells inoculated initially was 163.5 mg, and grown for 10 days. Data are 7 replicates. Ammonium sulfate in BS medium was replaced with several of 1 mM amino acid each.

Fig. 7. The effect of amine acid mixture on the growth of Hwangkeum soybean cells in cultures.

이와같은 결과로 Callus에서는 同一 host 에서도品種에 따라서도接種效果的 差異를 볼 수 있으므로 根瘤菌에 의한 Nitrogenase와는 다른 어떤 要因이 있는 것으로 생각된다. 또한 混合菌株가 活性이 높게 나타나는 것은 Callus 内部로의 浸透가 빠르기 때문이며 D68-0099 品種에서 活性이 나타나지 않는 것은 Callus 内部의 Rhizobium 感染의 정도의 差異로 因한 것으로 思料된다.

Table 6. Acetylene reduction activity by Rhizobium-soybean cultured cells.

Strains	Hwangkeum	Namcheon
(nmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g.f.w./24 hrs.)		
<i>R. japonicum</i>		
85-HG-1	34.26	-
005	27.09	-
007	37.88	54.21
008	34.24	8.78
010	-	94.34
011	20.43	-
019	40.13	-
113	17.79	24.65
119	-	33.68
180	10.11	-
208	8.43	-
320	17.96	17.36
602	-	24.96
<i>R. meliloti</i>		
105	-	-
<i>R. trifolii</i>		
201	-	-
Mix.	338.53	476.50
Aver.	24.83	36.85

摘 要

Rhizobium의 Nitrogenase 生成要因과 感染機作을 究明하고 培養細胞와 Rhizobia의 混合培養에서 窒素固定係를 確立하기 爲하여 黃金, 南川, D68-0099等 세 品種을 組織培養한 結果는 다음과 같다.

Callus 形成能은 胚와 幼根에서는 良好하나 胚軸에서는 전혀 없었으며 2 mg/l 2, 4-D, 4 mg/l NAA에서 가장 良好하고 2, 4-D/Kinetin 組合濃度에서는 0.2mg(2,4-D)/l 과 0.05mg(Kinetin)/l 에서 가장 理想的이었다.

培養細胞의 成長에는 2,4-D 2 mg/l 와 2,4-D (0.2 mg/l)/Kinetin (0.05 mg/l)일 때가 가장 良好하며 R. japonicum 019, 011을 接種하였을때 培養細胞의 成長은 상당히 둔화되었다.

單一 아미노산은 培養細胞의 成長을 阻害 하였는데 黃金의 경우 Methionine, Leucine에서 阻害가 가장 컸으며 다른 아미노산의 添加로 阻害作用이 상당히 회복되었다.

不定根의 生成은 2, 4-D 2.0mg/l 에서나 0.2 mg/l 2, 4-D/0.05mg/l Kinetin에서 良好하였다.

培養細胞-Rhizobium의 親和에 依한 窒素固定力은 25個 使用 菌株中에서 黃金에서는 10個 菌株, 南川에서는 7個 菌株에서 나타났으며 D68-0099에

서는 전혀 나타나지 않았으며 黄金의 境遇 85-HG-1 019, 007, 南川에서는 007, 119等이 높은 活性을

나타내었다.

### 引用 文 獻

- 1) Bayley, J. M., J. King, and O. L. Gamborg :  
The effect of the source of inorganic nitrogen of growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *planta*, 105 : 15-24, 1972
- 2) Bayley, J. M., J. King, and O. L. Gamborg :  
The ability of amino compound and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. *Planta*, 105 : 25-32, 1972
- 3) Behrend, J., and R. I. Mateles : Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. I. Effect of amino acid on growth. *Plant Physiol.*, 56 : 584-589, 1975
- 4) Bingham, E. T., and W. D. Beverdorf : Degree of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species. *Crop sci.*, 17 : 307-311, 1977
- 5) Blaydes, D. F. : Interaction of kinetin and various inhibitor in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant* 19 : 748-753, 1966
- 6) Child, J. J., and J. A. Larue : A simple technique for the establishment of nitrogenase in soybean callus cultures. *Plant Physiol.*, 53 : 88-90, 1974
- 7) Child, J. J. : Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. *Nature*, 253 : 350-351, 1975
- 8) Devey, M. R., and E. C. Cocking : Tissue and cell cultures and Bacterial Nitrogen Fixation. In, *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation* (Ed. N. S. Subba Rao) Edward Arnold (1980) pp. 281-324
- 9) Erickson, T. : Studies on the growth requirement and measurements of cell cultures of *Haploppapus gracilis*. *Physiol. Plant*, 18:976-993, 1965
- 10) Filner, P. : Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophysic. Acta*, 118:299-310, 1966
- 11) Gamborg, O. L. : The effect of amino acid and ammonium on the growth of suspension culture. *Plant Physiol.*, 45:372-375, 1970
- 12) Gamborg, O. L., and D. E. Eveleigh : Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.*, 46:417- , 1967
- 13) Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima : Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151, 1968
- 14) Hardy, R. W. F., R. D. Hoslten, E. K. Jackson, and R. G. Burns : The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> Fixation; Laboratory and field evaluation, *Plant Physiol.*, 43 : 1185-1207, 1968
- 15) Holsten, R. D., R. C. Burns, R. W. F., Hardy, R. R. Herbert : Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. *Nature*, 232:173-176, 1971
- 16) Jack, W. : Selection and characterization of amino acid analog resistant plant cell cultures, *Crop Sci.*, 17:597-600, 1977
- 17) Kimball, S. L., and E. T. Bingham : Adventitious bud development of soybean hypocotyl section in culture. *Crop sci.*, 13:758-760, 1973
- 18) Kurz, W. G. W., and T. A. Larue : Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature*, 256:407-409, 1975
- 19) Martz, E., M. S. Sterinberg : The role of cell-cell contact in "Contact" inhibition of cell division: a review and new evidence, J.



- Cell. Physiol., 19;189-210, 1973
- 20) Miller, G. O. : A Kinetin and kinetin - like compounds. In: F. Linskens and M. V. Tracey (ed) Morden method of plant analysis. vol. 6, Springer-Verlag, Berlin pp. 194-202, 1963
  - 21) Ozawa, T. and M. Yamaguchi: Inhibition of soybean cell grown by the adsorption of *Rhizobium japonicum* Plant Physiol., 64:65-68, 1979
  - 22) Pagan, J. D., J. J. Child, W. R. Scowcroft, and A. A. Gibson: Nitrogen Fixation by *Rhizobium* cultured on defined medium. Nature, 256:406-407, 1975
  - 23) Phillips, D. A. : Factors affecting the reduction of acetylene by *Rhizobium* soybean cell associations in vitro. Plant Physiol., 54:654-655, 1974
  - 24) Phillips, D. A. : Promotion of acetylene reduction by *Rhizobium*-soybean cell associations in vitro Plant Physiol., 54:654-655, 1974
  - 25) Phillips, D.A. : The effect of combined nitrogen on *Rhizobium* - soybean cell association in vitro. International Symposium on N<sub>2</sub> - Fixation. Pullman, Wash.
  - 26) Shyluk, J. P., and O. L. Gamborg: The Culture of plant cells with ammonium salt as the sole nitrogen source. Plant Physiol., 45:598-600, 1970
  - 27) Thiman, K. : The synthetic auxins; relation between structure and activity in plant growth substances, Skoog, F. ed. Univ. of Wisconsin Press, Madison pp. 21, 1951
  - 28) White, P. R. : Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol., 9:525, 1934
  - 29) White, P. R. : Potentially unlimited growth of excised plant cells in a artificial nutrient. Am. J. Bot., 26:59, 1935
  - 30) 石澤修一 : 微生物と植物生育, 博文社, 日本東京(1980) p. 37