

## *Nostoc muscorum*과 植物培養細胞의 共生誘導에 관한 研究

### I. Polyamine에 *N. muscorum*과 담배 및 大豆 培養細胞의 混合培養에 미치는 影響

鄭 賢 淑·金 昌 美·康 榮 熹  
(延世大學校 理科學科 生物學科)

## Induction of Symbiosis between *Nostoc muscorum* and Cultured Plant Cells

### I. Effects of Polyamines on the Association of *N. muscorum* with Tobacco and Soybean Cultured Cells

Cheong, Hyeon Suk, Chang Mee Kim and Young Hee Kang

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

#### ABSTRACT

An experimental system for the possibility of association between cultured plant cells and a cyanobacterium (*N. muscorum*) was investigated. The association was established in nitrogen-free medium, and nitrogen source was provided by *N. muscorum* through its own nitrogen fixation. *N. muscorum* was distributed on the outer part and intercellular spaces of the cultured plant cells. Polyamines were treated to the nitrogen-free medium to improve the association. Polyamines increased nitrogenase activity and protein amount in the association between *N. muscorum* and the cultured plant cells, as compared to the association without polyamines. Especially, spermine showed an increasing effect on the nitrogenase activity and the protein content in the association of tobacco and *N. muscorum*, while spermidine showed similar effect in case of soybean and *N. muscorum*.

#### 緒 論

高等植物과 질소고정능을 가진 生物體의 共生유도에 대한 많은 연구가 行해지고 있으며, 최근에는 生物學的 窒素固定을 인위적으로 유도하기 위하여 대두 培養세포와 *Rhizobium*의 混合培養(Child and Larue, 1974; Phillips, 1974; McComb *et al.*, 1975)은 물론 벼, 담배,

이 論文은 韓國科學財團의 1985年度 獎學研究費 支援으로 이루어진 것임.

당근, 밀 등 高等植物의 培養세포와 다양한 窒素固定菌과의 混合培養(Child, 1975; Larue *et al.*, 1975; Scowcraft and Gibson, 1975; Child and Kurz, 1978)을 시도하여 形態의 변화와 acetylene reduction assay를 통하여 窒素固定능력을 조사하는 등 固定된 窒素源의 이용과 植物培養세포의 viability에 관한 많은 실험이 이루어지고 있다.

특히 남조류는 비교적 용이하게 다른 植物과 共生관계를 유지하여 窒素固定을 하는 것으로 알려져 있고(Yamada and Sakaguchi, 1980), 絲狀形 남조류의 경우 窒素源을 유리시킨 배지에서 窒素固定능을 갖는 heterocyst라는 分化된 세포가 形成되는 것으로 알려져 있다(Fleming and Haselkorn, 1973; Haselkorn, 1978; Murry *et al.*, 1983). *Nostoc muscorum*은 無窒素배지로 옮긴 후 24시간안에 heterocyst가 생기며, nitrogenase活性的 증가가 수반된다고 보고되었다(Hwang, 1984; Howarth and Codd, 1985; Kush *et al.*, 1985).

또한 polyamine들은 모든 生物體에 널리 분포하고 있으며, 植物體에서도 生長과 分化에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Bagni *et al.*, 1971; Altman and Bachrach, 1981; Lin *et al.*, 1984), 植物原形質體의 세포막을 安定시켜서 노화를 지연시키고(Altman *et al.*, 1977; Apelbaum *et al.*, 1981), 아미노산과 핵산물질의 incorporation을 증가시키며(Fuchs and Galston, 1976; Kaur-Sawhney *et al.*, 1980),  $Mg^{++}$  등 양이온과 대치효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Yan and Tao, 1982). 또한  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  등이 nitrogenase의 활성에 영향을 미치며(Andrew, 1976; Lawrence and Orme-Johnson, 1976; Lawrence and Kotake, 1980), 이러한 이온들이 窒素固定菌과 alfalfa의 共生的 窒素固定에 영향을 미친다고 보고되고 있으므로(Miller and Sirois, 1983), 生物學的 窒素固定을 유도하는데 있어서 polyamine들이 混合培養조건을 유리하게 하리라 생각되어진다.

본 실험에서는 남조류중 *Nostoc muscorum*과 담배 및 대두 培養細胞와의 混合培養時 窒素源이용에 대한 가능성과 polyamine들이 混合培養조건에 미치는 效果를 알아보고자 하였다.

## 材料 및 方法

植物培養細胞 및 *N. muscorum*의 培養. 담배(*Nicotiana tabacum* L.) 培養細胞는 MS배지(2, 4-D, 2 mg/l), 대두(*Glycine max* L.) 培養細胞는 1-B5배지(2, 4-D, 5 mg/l)에서 각각 유도하여 3회 계대배양한 다음 사용하였다. *N. muscorum*은 Harder배지(Table 1)를 사면으로

Table 1. Composition of *Nostoc muscorum* culture media

Salts	concentration (mg/l)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.01
Agar	1.4%
pH	7.5

하여 25±1°C, 2,000 Lux하에서 培養하여 acetylene환원력을 측정한 후 사용하였다.

混合培養. 活性的 증은 培養細胞를 窒素源을 유리시킨 대조구와 polyamines을 농도 별로 첨가한 처리구로 옮기고, 액체배지에서 suspension시킨 *N. muscorum*을 혼합하여 배양하였다. 이때 無窒素培地는 (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub>를 결제시키고, KNO<sub>3</sub>대신 18.3 mM의 KCl을 첨가하여 만들었다. *N. muscorum*을 植物培養細胞에 混合한 후, 25±1°C, 2,000 Lux하에서 2주일 간격으로 계대배양하여

동일조건을 유지시켜 사용하였다.

**窒素固定能 측정.** *Nostoc*단 단독배양한 대조구와 無窒素培地에서 2주간격으로 계대배양하여 60일간 混合培養한 실험구에 10% acetylene기체를 注入시킨 후 4시간 간격으로 24시간 동안 Gas chromatography로 ethylene생성량을 測定하였다.

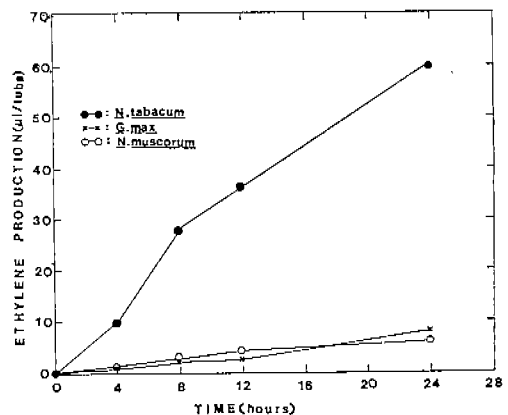
**蛋白質 定量.** 蛋白質은 Lowry 등의 방법을 변형하여 定量하였다(Lowry *et al.*, 1951). Whatman GF/C pad를 사용하여 培養細胞를 모은 후 90°C의 70% ethanol로 2회 세척하고, acetone으로 말린 다음, 1N NaOH 10 ml를 첨가하여 80°C에서 100분간 가수분해한 후 여과시켜서 定量하였다.

**形態的 變化의 觀察.** *N. muscorum*과 60일간 混合培養한 植物培養細胞를 glutaraldehyde와 OsO<sub>4</sub>를 이용하여 固定시킨 다음 Epon mixture와 propylene oxide를 침투시켜 단단 block을 1~2 μm두께로 semi-section하여 광학현미경(100배, 400배)하에서 觀察하였다.

### 結果 및 考察

混合培養시의 **nitrogenase의 活性과 蛋白質含量의 變化.** Fig. 1은 窒素源을 유리시킨 培地에서 *N. muscorum*과 植物培養細胞와의 混合培養을 하였을 때 **nitrogenase活性을 acetylene환원력으로 測定한 것이다.** 이때 대조구는 混合培養과 동일한 培養조건에 *N. muscorum*을 單獨培養한 것으로 定하였다. 담배 培養細胞의 경우 *N. muscorum*과 混合培養하였을 때 acetylene기체를 注入한지 24시간 후에는 대조구보다 6배 이상의 acetylene환원력을 가지며, 대두 培養細胞는 대조구와 비슷한 acetylene환원력을 나타냈다. 이는 窒素固定菌과 培養細胞들간의 친화도가 다르기 때문이며, 대두에 비해서 담배와의 친화도가 더 높은 것으로 사료되어진다. 또한 담배 培養細胞와 *N. muscorum*과의 混合培養시 ethylene生成量이 크게 증가된 것은 대두 培養細胞와의 混合培養과 *N. muscorum*單獨培養시보다 *N. muscorum*의 生長이 급격히 증가했기 때문이라고 생각된다. 混合培養조건에 따라서 培養細胞의 成長을 저해할 정도로 菌體가 불균형한 증식을 하는 경우가 있어서 培養細胞의 viability가 저하됨을 보고한 바 있다(Hwang, 1984). 그러나 한편으로는 *Azospirillum*과 사탕수수, 그리고 *Azotobacter*와 당근의 混合培養에서 無窒素배지에서 배양세포의 成長이 계속 가능함도 보고되었다(Berg *et al.*, 1979; Vasil *et al.*, 1979; Bradley, 1984). 混合培養시 培養細胞는 菌體가 成長에 필요한 영양분을, 菌體는 窒素를 固定하여 培養細胞에 제공한다고 추측할 수 있는데, 실험적으로는 확실한 뒷받침이 되어 있지 않다.

본 실험에서 사용한 窒素固定菌인 *N. muscorum*은 광영양독립체로서, 無窒素培地에서 植物培養細胞와 混合培養하였을 때와



**Fig. 1.** Acetylene reductivity in *N. muscorum* associated with *N. tabacum* and *G. max* cultured cells in N-free media.

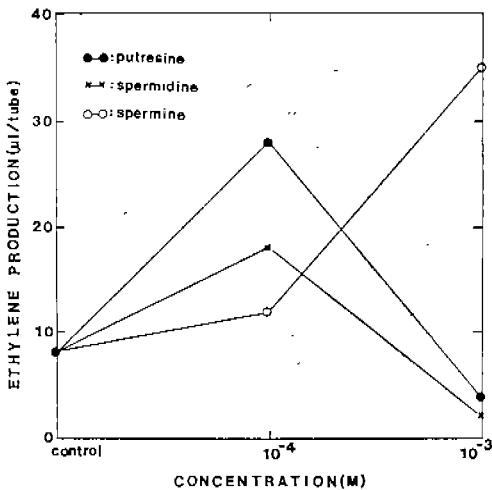
**Table 2.** Change in protein content of *G. max* and *N. tabacum* cultured cells

(mg/g culture cells)		
Materials	<i>G. max</i>	<i>N. tabacum</i>
Culture media		
+N	5.55	8.55
-N	3.83	3.90
Co-Culture (-N)	5.65	7.60

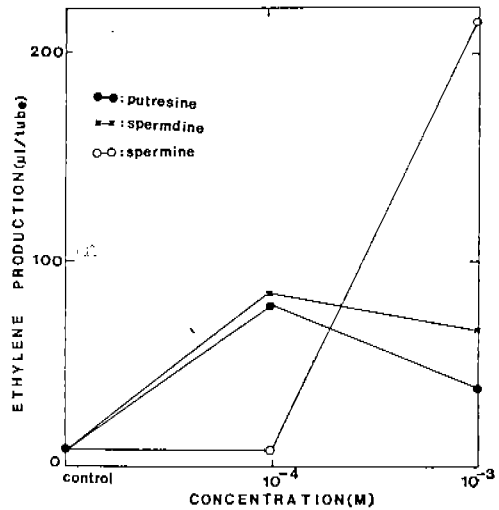
窒素源이 있는 培地에서 植物培養細胞만 培養하였을때의 植物培養細胞내의 蛋白質含量은 비슷하게 나타났으며 (Table 2), 이는 無窒素培地에서 담배와 대두를 單獨培養한 2주일 후에 蛋白質含量이 50%정도 감소하는 것으로 미루어보아 混合培養한 培養細胞와 *N. muscorum* 사이에 窒素源 供給이 이루어지고 있으며 viability가 계속 유지되고 있음을 추측할 수 있다. 그러나 *N. muscorum*

과 친화도가 높은 담배 培養細胞의 경우 대조구보다 단백질함량이 약간 감소하는 것은 *N. muscorum*의 왕성한 成長으로 인하여 成長物質의 과다한 소비와 산소부족 등의 결과로 담배 培養細胞의 成長이 억제되기 때문이라고 사료된다. 따라서 培地조성, 온도, 빛 등 적정 배양조건을 맞추어주면 植物培養細胞와 窒素固定菌과의 共生유도가 가능하리라 생각되어 진다.

**Polyamines의 效果.** 無窒素培地에 polyamines를 농도별로 첨가하여 2주일동안 混合培養하였다. Fig. 2는 대두 培養細胞와 混合培養하였을 때 polyamines의 영향을 본 것으로  $10^{-4}M$  처리구에서 ethylene생성량이 대조구에 비하여 putrescine처리시는 2배 이상 증가되고, spermine과 spermidine처리시는 약간 증가하였으며,  $10^{-3}M$ 처리구에서는 putrescine과 spermine은 대조구보다도 오히려 감소시키는 경향을 보인 반면에, spermidine은 4배 이상 증가시키는 양상을 나타냈다. Fig. 3은 담배 培養細胞와 混合培養할 때 polyamines의 效果를 나타낸 것으로 putrescine처리구의 경우 대두와 비슷한 양상을 보이거나 spermidine을  $10^{-3}M$  처



**Fig. 2.** Acetylene reductivity in *N. muscorum* associated with *G. max* cultured cells in N-free media containing polyamines.



**Fig. 3.** Acetylene reductivity in *N. muscorum* associated with *N. tabacum* cultured cells in N-free media containing polyamines.

**Table 3.** Effects of polyamines on protein contents in *N. muscorum* associated with *N. tabacum* cultured cells (mg/g culture cells)

Material	Treatment		Experiment					
	Control	Putrescine		Spermidine		Spermine		
		10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	
<i>N. tabacum</i>	3.90	5.07	3.65	5.46	5.70	7.80	6.98	
<i>N. muscorum</i> + <i>N. tabacum</i>	4.60	7.25	6.80	6.53	6.07	8.64	9.20	

**Table 4.** Effects of polyamines on protein contents in *N. muscorum* associated with *G. max* cultured cells (mg/g culture cells)

Material	Treatment		Experiment					
	Control	Putrescine		Spermidine		Spermine		
		10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-3</sup> M	
<i>G. max</i>	3.83	4.68	5.30	4.29	4.62	6.70	5.98	
<i>N. muscorum</i> + <i>G. max</i>	5.65	6.51	6.16	6.51	4.50	7.93	7.12	

리한 배지에서는 대조구보다 ethylene 생성이 높았지만 10<sup>-4</sup>M 처리구보다 감소하는 경향을 보였으며 spermine은 10<sup>-4</sup>M 처리구에서는 대조구와 같은 수준을 보이다가 10<sup>-3</sup>M 처리구에서는 현저한 증가를 나타냈다. 이 결과는 植物의 種에 따라 polyamines의 농도와 효과가 서로 다르다는 보고(Cho *et al.*, 1983; Cho *et al.*, 1985)와 일치하였다.

Table 3, 4는 無窒素培地에서 培養細胞를 單獨培養하였을 때와 *N. muscorum*과 混合培養하였을 때의 蛋白質含量에 미치는 polyamines의 效果를 나타낸 것으로 polyamines를 처리하지 않은 대조구에 비하여 처리구에서는 單獨培養시와 混合培養시 모두 蛋白質含量이 상당히 증가하는 것으로 나타났다. 단, 대두의 경우 spermidine 10<sup>-3</sup>M 처리구에서는 混合培養시 대조구보다도 낮은 含量을 나타냈는데, 이때의 nitrogenase活性이 4배 이상 높은 것으로 보아 *N. muscorum*의 왕성한 증식이 대두培養細胞의 成長을 억제하고 있다고 볼 수 있다. 그러나 담배의 경우 polyamines을 처리하지 않은 無窒素培地에서 混合培養하였을 때는 蛋白質含量이 窒素源이 있는 培地에서보다 감소하는 경향을 보인 것과는 달리 polyamines을 처리하였을 때는 전체적으로 蛋白質含量의 증가를 보였으며, 특히 spermine 처리구의 경우에 대조구에 비해서 2배 정도의 증가를 보였다.

Fuchs와 Galston은 polyamines이 단백질 합성을 촉진시킨다고 하였으며(Fuchs and Galston, 1976; Cho *et al.*, 1983), 각 polyamines들에 대한 영향은 크게 차이가 나지 않으나 tetraamine인 spermine의 경우 diamine인 putrescine과 triamine인 spermidine에 비해 더욱 증가시키는 것을 알수 있었다. Polyamines는 귀리엽육세포 原形質體의 단백질 합성을 촉진시킨다고 보고되었고(Fuchs and Galston, 1976), 原形質體 세포막을 安定化시키며(Altman *et al.*, 1977; Apelbaum *et al.*, 1981), Mg<sup>++</sup> 등 양이온과 대체효과를 나타내는 등 植物體의 分化와 成長에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져있다(Bagni *et al.*, 1971; Altman and Bachrach, 1981). 본 실험에서 polyamines가 혼합배양의 nitrogenase活性을 촉진시키고 蛋白質

質含量的 증가에 영향을 미치는 것은 직접적으로 nitrogenase와 연관시키는 것보다는 polyamines에 의해 混合培養의 조건이 더욱 유리하게 되는 것으로 생각할 수 있다.

Polyamines는 음진하를 띤 세포막과 결합하여 세포막을 安定化시키는 것으로 알려져 있고 (Altman *et al.*, 1977; Apelbaum *et al.*, 1981), 原形質體 分離시에 原形質體를 安定化시켜 原形質體의 수율과 生存力을 더욱 증가시키고 polyamines중 spermine이 가장 효과적이라고

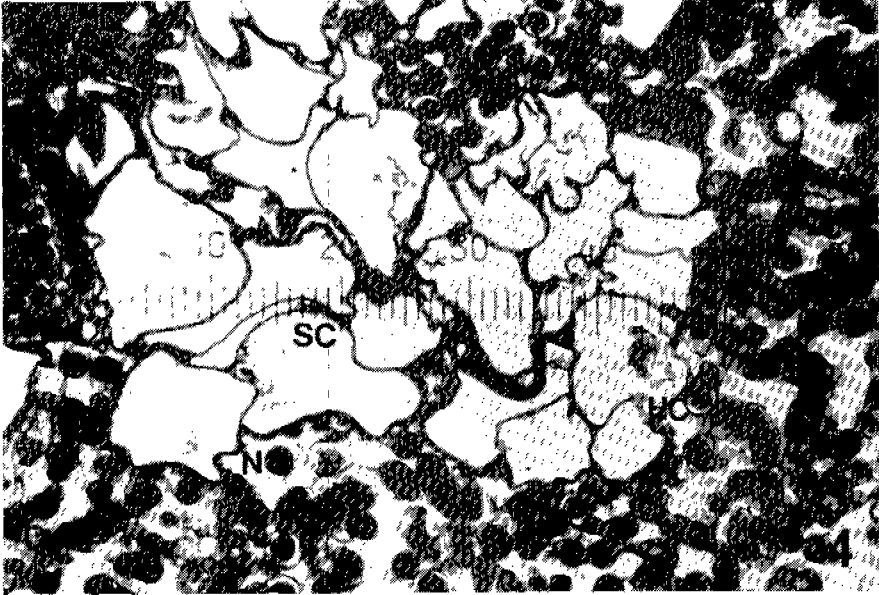


Fig. 4. *N. muscorum* (N) associated with *G. max* cultured cells (SC.) ( $\times 400$ )

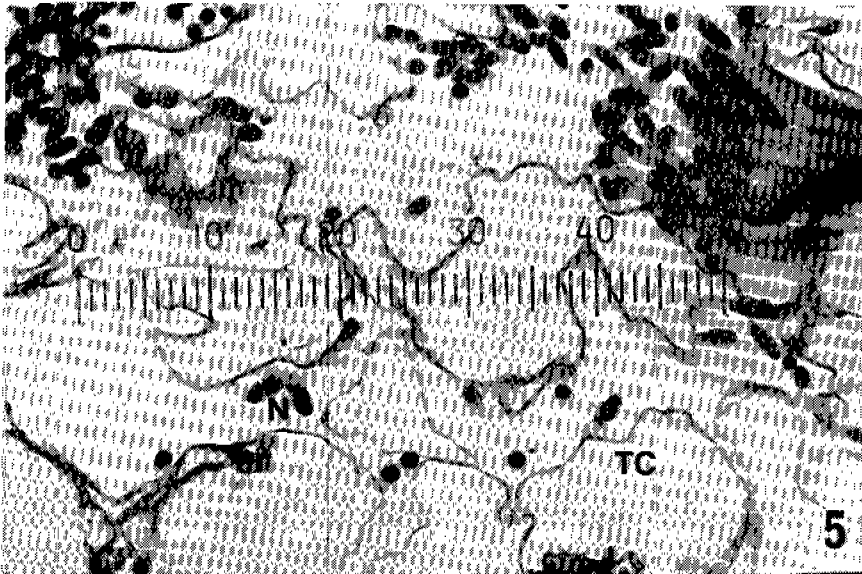


Fig. 5. *N. muscorum* (N) associated with *N. tabacum* cultured cells (TC). ( $\times 100$ )

보고되어 있다(Altman *et al.*, 1977; Altman and Bachrach, 1981). 본 실험결과에 따르면 polyamines처리구에서 nitrogenase活性도 증가되고 窒素固定菌과의 混合培養시 培養조건을 더욱 유리하게 하므로 植物培養細胞와 窒素固定菌과의 共生유도에 좋은 영향을 미치리라 사료된다.

混合培養時 形態的 變化. Fig. 4, 5는 60일동안 無窒素培地에서 담배나 대두培養細胞와 *N. muscorum*과 混合培養한 것을 고정시켜서 광학현미경으로 관찰한 것으로 heterocyst(HC)가 발달되어 있는 것이 관찰되며, 또한 *N. muscorum*만을 無窒素培地에서 培養하였을때도 24시간 培養 후에 分化되어 있는 heterocyst가 觀察되었다. 混合培養시에는 담배와 대두培養細胞 表面에 *N. muscorum*이 많이 분포되어 있었고, 細胞와 細胞 사이의 공간으로도 침투되어 있는 것을 볼 수 있었다.

이러한 形態的인 관찰을 통하여 植物培養細胞와 *N. muscorum* 사이에 窒素源과 영양물질 공급과 共生유도의 가능성을 확인할 수 있었다.

### 摘 要

담배(*Nicotiana tabacum* L.)와 대두(*Glycine max* L.)培養細胞와 窒素固定能을 가진 絲狀形남조류 *N. muscorum*과 混合培養하여 窒素源이용에 대한 가능성과 polyamines가 窒素固定能에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 混合培養時 nitrogenase活性이 현저히 증가하며 無窒素培地에서도 蛋白質含量의 감소를 회복시키는 것을 알 수 있었다. Polyamines을 처리하였을 때 nitrogenase活性과 蛋白質含量이 더욱 증가하였으며, 담배培養細胞의 경우 spermine이 가장 效果的인 것으로 보아 polyamines는 *N. muscorum*과 植物培養細胞의 混合培養시 서로의 균형있는 生長을 위해 유리하게 작용 하리라 사료된다. 混合培養 60일 경과시에 *N. muscorum*이 植物培養細胞 주위에 많이 분포되며, 細胞와 細胞사이에도 침투되어 있는 것도 觀察되었으며 heterocyst도 발달되어 있었다. 이는 植物培養細胞의 窒素源이용에 대한 가능성을 시사하여 준다.

### 參 考 文 獻

- Altman, A., R. Kaur-Sawhney and A.W. Galston. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60: 570-574.
- Altman, A. and U. Bachrach. 1981. The involvement of polyamines in plant growth and senescence. *In Advances in Polyamine Research*, Vol. 3, Raven Press, New York. pp.365-375.
- Andrew, C.S. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. *Aust. J. Agric. Res.* 27: 611-623.
- Apelbaum, A., A.C. Burgoon, J.D. Anderson and M. Lieberman. 1981. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplast. *Plant Physiol.* 68: 453-456.
- Bagni, N., E. Corsini and S. Fracassini. 1971. Growth-factors and nucleic acid synthesis in *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.* 24: 112-117.
- Berg, R.H., V. Vasil and I.K. Vasil. 1979. The biology of *Azospirillum* sugarcane association. II. Ultrastructure. *Protoplasma* 101: 143-163.

- Bradley, P.M. 1984. Induced *in vitro* symbiosis using algae and callus of *Daucus carota* on medium deficient in nitrogen. Unpublished.
- Child, J.J. and T.A. Larue. 1974. A simple technique for the establishment of nitrogenase in soybean callus culture. *Plant Physiol.* 53: 88-90.
- Child, J.J. 1975. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. *Nature* 253: 350-351.
- Child, J.J. and W.G.W. Kurz. 1978. Inducing effect of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* *in vitro*. *Can. J. Micro.* 24: 143-148.
- Cho, Y.D., Y.H. Kang, M.J. Cho, S.K. Kim and S.H. Lee. 1983. Cell biological studies on the mechanism of development and differentiation. VI. Studies on polyamines and related enzymes during organ development. *Korean Biochem. J.* 16:151-159.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, M.W. Kim and H.M. Lee. 1985. Cell biological studies on mechanism of development and differentiation. X. Effect of polyamines of glucan synthetase activity. *Korean J. Bot.* 28: 243-252.
- Fleming, H. and R. Haselkorn. 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase in synthesized in heterocysts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 20: 2727-2731.
- Fuchs, Y. and A.W. Galston. 1976. Macromolecular synthesis in oat leaf protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 17: 475-482.
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 319-344.
- Howarth, D.C. and G.A. Codd. 1985. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1561-1570.
- Hwang, B. 1984. Association cultures of nitrogen fixing bacteria and plant cultured cells *in vitro*. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 11: 43-47.
- Kaur-Sawhney, R., H.E. Flores and A.W. Galston. 1980. Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65: 358-371.
- Kush, A., C. Elmerich and J.P. Aubert. 1985. Nitrogenase of *Seshania*, *Rhizobium* strain ORS 571: Purification, properties and "switch-off" by ammonia. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1765-1778.
- Larue, T.A., W.G.W. Kurz and J.J. Child. 1975. Methods for growing nitrogen-fixing bacteria separated from plant cells. *Can. J. Micro.* 21: 1884-1886.
- Lawrence, C.D. and S. Kotake. 1980. Regulation of nitrogenase activity in aerobes by Mg<sup>+2</sup> availability: An hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 934-940.
- Lawrence, C.D. and W.H. Orme-Johnson. 1976. Effect of the Mg-ATP generator on the catalytic and EPR properties of the enzyme *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 452: 42-58.
- Lin, P.P.C., D.B. Egli, G.M. Li and L. Meckel. 1984. Polyamines titer in the embryonic axis and cotyledons of *Glycine max* L. during seed growth and maturation. *Plant Physiol.* 76: 366-371.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- McComb, T.A., J. Elliot and M.J. Dilworth. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature* 256: 406-410.
- Miller, R.W. and J.C. Sirois. 1983. Calcium and magnesium effects on symbiotic nitrogen association in the alfalfa (*M. Sativa*)-*Rhizobium meliloti* system. *Physiol. Plant.* 58: 464-470.
- Murry, M.A., D.B. Jenson and J.R. Benemann. 1983. Role of ammonia in regulation of nitrogenase



- synthesis and activity in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Acta* 756: 13-19.
- Phillips, D.A. 1974. Factors affecting the regulation of acetylene by *Rhizobium*-soybean cell association *in vitro*. *Plant Physiol.* 53: 67-72.
- Scowcraft, W.R. and A.H. Gibson. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell culture. *Nature* 253: 351-352.
- Vasil, V., I.K. Vasil, D.A. Zuberer and D.H. Hubbell. 1979. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. I. Establishment of the association. *Z. Pflanzen.* 95: 141-147.
- Yamada, T. and K. Sakaguchi. 1980. Nitrogen fixation associated with a hot spring green algae. *Arch. Micro.* 124: 161-167.
- Yan, T.F.J. and M. Tao. 1982. Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257: 7037-7043.

(1985. 12. 14. 接受)