

植物培養細胞—*Rhizobium*에 의한 窒素固定에 관한 研究

朴 愚 喆 · 谷 田 澤 道 彦*

W. C. Park, M. H. Yatazawa: Nitrogen fixation by
Rhizobium-Plant cell cultures

Summary

Curing the studies on the mechanism of the nodule formation and the infection of *rhizobia* using the continuously cultured plant cell tissues, it was found that some calluses possess high nitrogen fixation activity. This experiment was conducted to know the differences among the calluses and the *Rhizobia*.

The results obtained were as follows;

1) In a single inoculation the nitrogenase activity of soybean cell cultures-*rhizobium* was moderately higher than non-leguminous cell cultures, however, in the mixing inoculation that was reversely found.

2) Host factor, which was characteristics for the nodule formation and the nitrogenase activity, was not appeared generally in the plant cell cultures except for *Kūamusume* and *Toyozuzu* in soybean, and *Datura* in non-leguminous cell cultures.

3) In the 012 *rhizobium* cultured on soybean cell cultures and in the 010, 023 and 024 *rhizobia* cultured on non-leguminous cell cultures the nitrogenase activity higher than the others.

緒 言

根瘤 Bacteria *Rhizobium*이 宿主植物인 콩과植物의 組織中에서 N₂를 固定하기 爲하여는 Nitrogenase 活性을 나타내기 爲한 特定の host factor가 必要하다고 생각되어져 왔다.²⁾

그러나 最近에는 어떤種類의 *Rhizobium* 菌株는 콩과식물에서 뿐만아니라 非콩과 植物의 培養細胞와 association에 依하여 Nitrogenase 活性이 나타나며^{1, 8, 9)} , 또 合成培地에 있어서도 *Rhizobium* 單

獨으로도 Nitrogenase 活性을 나타낸다는 것이 밝혀졌다.^{3, 4, 5)}

著者들은 培養細胞-*Rhizobium* association에 있어서 Nitrogenase 活性의 生成要因과 *Rhizobium* 感染의 mechanism을 알기 爲하여, 數年間 繼續培養하여 온 多數의 培養細胞와 根瘤菌과의 association에 對하여 調査하여 온 結果 어느程度 Nitrogenase 活性이 比較的 높은 材料를 얻었기에 여기에 報告코져 한다.

慶尚大學 (Gyeongsang University)

*名古屋大學 農学部 (Faculty of Agriculture, Nagoya University)

材料 및 方法

結果 및 考察

Table 1에 表示한 13種의 培養 Callus組織을 Philips合成培地⁶⁾ 위에 置床하여 25°C 暗所에 7日 間 培養한 다음, 따로 7日間 純粹培養⁶⁾ 한 各菌株을 接種하여 다시 7日間 25°C 暗所에서 培養한 다음 Acetylen reduction activity를 Gas chromatography法⁶⁾으로 測定했다.

Table 1. Plant tissue cultres used for Nitrogen fixation by Association with *Rhizobium*

These callused have been cultured continuously for many years.

legumes			non-legumes
茶	大	豆	Rice
黑	大	豆	Tobacco
矢	作 大	豆	Datura
東	洋	鈴	<i>Solanum laciniatum</i>
北		娘	<i>Digitalis</i>
北	見	白	
茶	穀 早	生	
大	正 金	時	
寶	小	豆	
奧		原	

表 2에 나타난 바와같이 콩과식물의 Callus에 對한 *Rhizobium japonicum*의 窒素固定 反應은 大體로 單一菌株을 接種했을 때보다 混合菌株을 處理했을 때가 Nitrogenase活性이 높다는 것을 알수 있었고, 또 菌株과 callus사이의 獨特한 關係를 보인 것으로는 北娘, 東洋鈴는 大體로 그 活性이 높게 나타나 있으나 北見白은 제일 낮은 活性을 나타내며, 나머지는 대개 같은 活性을 나타내고 있다. 이것은 根瘤로서의 大豆品種間 Nitrogenase活性은 그 差가 크게 없으나⁷⁾ callus에서는 그 樣狀이 다르다는 것을 나타내어 주고 있다. 그리고 菌株別로 Nitrogenase活性을 보면, 010, 023, 024菌株는 混合接種에 버금가는 높은 Acetylene還元力을 나타냈으나 이제까지 많이 使用해온 002菌株와 그外 009, 017菌株는 그 活性이 매우 낮았다.

따라서 이제까지 말해 온 host factor로써의 相互 接種이 不可能하다¹⁾는 것이 Callus에서는 같은 host에서도 品種別에 따라서도 뚜렷이 接種效果의 差異가 나타나므로 根瘤에 依한 Nitrogenase와는 多少 다른 어떤 factor가 作用하는 것으로 생각되어진다. 表2, 表3, 特히 表3에 나타난 바와 같이 非콩과 식물 Callus와의 Nitrogen fixation을 볼것 같으면 全然 찾아 볼 수 없이 거의 같은 Nitrogenase 活性을 나타내고 있으며 菌株別에 있어서도 012菌株를 除

Table. 2 Acetylene reduction actiivty by *Rhizobium*-leguminous cell cultures(Callus) cultured on Phillips' medium.

(n mol C₂H₄ per g dry weight per hour)

品 種	菌 株									平 均	混 合
		002	009	010	014	017	021	023	024		
北 見 白		23.1	43.4	25.8	48.6	30.2	32.5	60.7	56.2	40.1	46.5
矢 作 大 豆		25.2	39.1	40.3	77.8	31.2	80.7	42.7	98.1	54.4	52.7
黑 大 豆		34.5	25.6	120.8	45.6	69.3	30.8	87.6	86.4	62.6	416.5
北 娘		86.7	30.5	1276.3	801.4	81.8	605.2	1055.7	1528.4	683.3	3414.6
東 洋 鈴		32.5	40.3	79.6	57.2	62.6	76.2	785.4	1011.5	268.2	1289.1
大 正 金 時		40.8	38.3	65.8	26.4	79.3	62.9	124.5	88.7	65.8	275.1
寶 小 豆		38.7	28.5	70.5	67.5	53.6	43.2	40.5	53.1	49.5	49.3
奧 原		84.8	71.2	80.3	68.2	42.8	73.8	81.7	92.7	74.4	238.2
平 均		45.8	39.6	219.2	149.1	56.4	125.7	284.9	376.9		722.8

Table 3 Acetylene reduction activity by *Rhizobium*-non-leguminous cell cultures(*Callus*) cultured on Phillips' medium.

(n mol C₂H₄ per g dry weight per hour)

菌 株 Callus	011	012	023	024	027	平 均	混 合
Rice	40.1	114.5	30.5	61.2	84.4	66.1	877.8
<i>Tabacco</i>	65.5	114.8	45.2	50.8	60.5	67.4	186.0
<i>Datura</i>	45.5	92.5	40.9	62.1	78.3	63.9	1535.7
<i>Solanum laciniatum</i>	50.6	89.5	85.8	58.1	101.5	77.1	260.9
<i>Digitalis</i>	60.2	117.8	90.6	45.6	87.4	62.8	106.8
平 均	52.4	105.8	58.6	55.6	82.4		593.4

외하고는 거의 같은 활성을 나타내고 있으므로 host factor로써의 相互接種이 培養 Callus組織에서는 可能하다는 것을 알 수 있었다.

混合接種効果는 確實히 콩과식물에서나 非콩과식물에서도 그 효과가 컸다. 이는 Nitrogenase의 活性이 *Rhizobium japonicum*의 Callus와의 Symbiotic 내지는 association의 強弱에 基因되기 때문일 것이므로 混合接種이 Callus 内部에로의 侵透(inoculation)에 依한 感染)가 빠르기 때문이 아닌가 생각되어진다. 即 담배 Callus와 cowpea type 菌株 32HI를 GLN agar위에 5mm간격으로 둔 實驗에서 Scowcroft 8) 등이 밝힌 바와 같이 *Rhizobia*의 Nitrogenase 活性은 Callus가 없이는 나타나지 않는다고 하였으며, N¹⁵의 實驗에서도 *Rhizobia*쪽이 植物組織쪽보다 많은 N¹⁵分配를 나타냄으로써 Nitrogenase의 活性은 *Rhizobia*쪽에 關係가 더욱 깊다고 한 것처럼 混合接種에 依한 各菌株의 特性들이 調和되므로 酵素의 特性도 補完시켜지는 結果로써 그 活性이 높아지는 것이 아닌가 類推되어진다.

以上の 點으로 Callus의 條件이 根瘤의 條件과는 多少 差異(host factor)가 있는 것으로 생각된다.

摘 要

數年間 繼續培養한 植物培養細胞와 根瘤菌과의 窒素固定에서 그 mechanism을 알기爲하여 根瘤形成 및 感染過程을 알기爲해 研究하던 중 培養細胞에

單一菌株 및 混合菌株의 接種에 依한 Nitrogenase의 活性이 높은 것을 發見하였기에 그 差異를 調査한 結果는 다음과 같았다.

1) 單一接種에 있어서는 大豆에서의 Nitrogenase의 活性이 非콩과 식물보다 大體的으로 높았고, 混合接種에 있어서는 非콩과 식물에서 活性이 높았다.

2) 根瘤形成 및 Nitrogenase 活性에 있어서의 特性인 host factor를 Callus에서는 大豆中 北娘 및 東洋鈴, 非콩과 식물중에서는 *Datura*를 除外하고는 찾아볼 수가 없었다.

3) 菌株別의 Nitrogenase 活性은 非콩과 식물에서는 012 菌株가 콩과 식물인 大豆에서는 010, 023, 024 菌株가 大體로 높았다.

引用文獻

- Child, J. J., Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell cultures, Nature 253: 350~351
- 石澤修一, 1977. 微生物と 植物生育, P. 95~104, 博友社, 日本東京.
- Kurz, W. G. W., T. A. LaRue, 1975, Nitrogenase activity in *rhizobia* in absence of plant host, Nature 265: 407~409.
- McComb, J. A., J. J. Child, A. H. Gibson and W. R. Scowcroft, 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* in pure culture medium, Nature 256: 409~410.

5. Pagan, J. D., J. J. Child, W. R. Scowcroft and A. H. Gibson, 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium, *Nature* 256 : 406~407.
6. Philips, D. A., 1974, Factors affecting the reduction of acetylene by *Rhizobium*-Soybean cell associations *in Vitro* *Plant Physiol*, 53 : 67~72.
7. Ryu, J. C., 1979, Studies on Biological Nitrogen fixation, Gyeong sang Graduate school Theses 2 : 19~30.
8. Scowcroft, W. R. & A. H. Gibson, 1975, Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell culture 263 : 351~352.
9. Trinick M. J., 1973, Symbiosis between *Rhizobium* and the Non-legume, *Trema aspera*, *Nature* 244 : 459~450.