

*Nostoc muscorum*과 식물배양세포의 공생유도에 관한 연구

II. *N. muscorum*과 담배배양세포의 혼합배양에 따른 질소고정능과 형태적 변화

鄭賢淑·黃柏*·康榮燾

(연세대학교 이과대학 생물학과, *전남대학교 자연과학대학 생물학과)

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

II. Changes of nitrogen fixation ability and morphology by association of *N. muscorum* with cultured tobacco cells

Cheong, Hyeon Sook, *Baik Hwang and Young Hee Kang

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul and *Department of Biology, Chonnam University, Kwangju)

ABSTRACT

Investigation on the ability of nitrogen usage by N_2 -fixing *Nostoc muscorum* and cultured tobacco cells when they were associately cultured on nitrogen-free media was carried out. Also, effect of polyamines on the associated cultured condition was carried out. In addition, morphological changes of *N. muscorum* and cultured tobacco cells in associate culture were observed to detect the possibility of induction of nitrogen fixing ability on cultured plant cells. The activity of nitrogenase increased markedly when *N. muscorum* was grown exclusively on nitrogen-free media. When *N. muscorum* was cultured associately with cultured tobacco cells on nitrogen-free media containing polyamines, high activity was detected in 10^{-4} M spermine treated group. Investigation on the change of polyamine amounts showed two times increase in spermidine and eight times increase in spermine on a associate culture. These effects of associated culture were shown through morphological change such as dense localization of *N. muscorum* around the cultured tobacco cells as well as inside the cells. These results indicate the viability of *N. muscorum* in cultured tobacco cells and possible induction of nitrogen fixation ability by symbiosis.

서 론

질소고정능을 가진 *N. muscorum*은 사상형으로 독립영양체이며, 무질소배지에서 배양할 때 heterocyst가 분화된다. heterocyst는형태적, 생리적으로 vegetative cell과는 다르며 대부분의 질소고정이 이루어지는 장소이다. 또한 heterocyst는 Mn^{++} 함량이 급속히 떨어짐으로써 Photo-

비교적 쉽게 고등식물세포와 혼합배양할 수 있다고 알려졌으며 (Yamada and Sakaguchi, 1980; Latorre *et al.*, 1986), vector system으로도 이용하고 있다(Chauvat *et al.*, 1986). Gusev 등(1982)은 담배배양세포와 *Anacystis nidulans*를 혼합배양할 때 MS배지의 무기염 농도를 반으로 줄였고 sucrose역시 농도를 낮추어서 배양함으로써 혼합배양에 적절한 조건을 알아보는 실험을 하였으며, 인삼배양세포와 *Chlorogloea fritschii*의 혼합배양이 *Chlorogloea*의 단독배양보다 nitrogenase activity가 높다고 했다(Butenko *et al.*, 1981). 이러한 혼합배양을 통하여 남조류의 질소고정능을 식물에서 이용할 수 있도록 남조류의 생리적 특성 (Spiller, 1980; Vaishampayan and Hamantaranja, 1984; Jensen and Burrics, 1986)과 nitrogenase activity 증가 (Hwang, 1984; Howarth and Codd, 1985; Kush *et al.*, 1985; Ernst and Böger, 1985)에 관한 일련의 연구가 계속되고 있다(Yoch and whitwing, 1986; Meeks *et al.*, 1985; Shearer *et al.*, 1982).

생체내에서 Mg^{++} 과 Ca^{++} 등의 이가 양이온은 세포막의 인지질과 결합하여 nitrogenase에 관여하는 Mg-ATP의 양을 조절함으로써 nitrogenase activity를 간접적으로 조절한다고 하였으며 (Davis and kotake, 1980) polyamine이 이가 양이온의 대치효과를 나타낸다는 것은 이미 알려진 사실이다(Yan and Tac, 1982).

또한 질소고정균과 식물배양세포의 혼합배양시 질소고정균은 식물배양세포의 세포벽에 밀착되어서 질소고정산물을 전달하고 (Butenko *et al.*, 1981) 남조류와 *Gunnera chilensis*의 공생시 *Gunnera*의 세포내에서 남조류가 살고 있으며 고등식물의 원형질막에 둘러싸여 있다고 하였다. 또 남조류가 숙주식물에 접촉될 때 처음에는 세포간극으로 파고 들어가고 나중에는 세포내로 들어가며 (Neumann *et al.*, 1970) 세포 내부로 들어갈 때 숙주식물의 세포벽과 원형질막의 위치에서 encapsulate되어진다(Silvester, 1976).

그러나 무질소배지에서 heterocyst분화에 따른 nitrogenase 증가로는 식물배양세포에 부족한 단백질을 보충하기에 부족하며 (Wolk, 1982) polyamine의 주된 작용이 단백질 합성을 조절하는 것(Altman *et al.*, 1977)이므로 polyamine을 첨가한 배지에서 남조류와 식물배양세포를 혼합배양하였을 때 nitrogenase activity가 현저하게 증가하였으며 단백질 함량도 높아졌다(Cheong *et al.*, 1986).

전보 (Cheong *et al.*, 1986)에서는 질소고정능을 가진 *Nostoc muscorum*과 식물 배양세포의 혼합배양시 담배 배양세포와 *Nostoc*의 친화도가 대두나 벼 배양세포보다 높았고, polyamine 처리시 nitrogenase 활성과 단백질 함량이 높아졌다는 것을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 *Nostoc*을 계속적으로 공기순환 하면서 현탁배양하여 heterocyst를 형성시킨 후 담배 배양세포와 혼합배양하여 nitrogenase 활성을 조사하였으며, 이때 polyamine이 nitrogenase의 활성에 미치는 영향과 단백질 함량의 변화를 보았다.

또 담배 배양세포를 단독배양하였을 때와 *Nostoc*과 혼합배양하였을 때 내재하는 polyamine의 함량을 측정하였으며 혼합배양시 nitrogenase 활성의 증가가 내재하는 polyamine의 양에 기인할 수 있는지 그 가능성을 추정하였다.

재료 및 방법

담배잎 세포의 배양. 담배 (*Nicotiana tabacum* L.) 배양세포는 담배잎을 작은 절편으로 만든 다음 70% ethanol에 1분, 1% sodium hypochlorite 용액에 7분 멸균하고 멸균 증류수로 3회 세척한 후 $1.35 \mu M$ 2,4-D가 첨가된 고체배지 (Rose and Matin, 1975)에 옮겨 $27 \pm 1^\circ C$ 에서 배양하여 callus를 유도시켰다. 유도된 callus를 2주간격으로 $0.34 \mu M$ 2,4-D를 첨가한 B5배지에서 계대 배양하여 이중에서 성장상태가 좋은 것만을 선택해서 사용하였다.

***Nostoc muscorum*의 배양.** 질소고정능을 가진 남조류인 *N. muscorum* UTEX 468은 Arnon배지 (Arnon *et al.*, 1974)를 수정하여 계속적으로 공기순환을시키면서 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지시킨 항온실에서 배양하였으며 $818 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ ($16 : 8$)에서 동일조건을 유지시켰다. heterocyst를 분화시키기 위해서는 KNO_3 를 제거시킨 배지에서 현탁배양하였다.

혼합배양방법. 성장상태가 양호한 담배 배양세포를 polyamine을 농도별로 처리한 무질소배지에 옮긴 다음, 무질소 Arnon배지에서 배양하여 heterocyst가 형성된 *Nostoc*을 혼합배양에 사용하였다. 이때 액체배지에서 현탁배양시킨 *Nostoc*을 $10,000 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 모은 다음 각 실험구에 담배 배양세포 0.5 g과 0.1 g의 *Nostoc*을 접종시켰다. 혼합배양에 사용한 배지는 1-B5배지에서 $(\text{NH}_4)^2 \text{NO}_3$ 를제외시키고 KNO_3 를 19.3 mM의 KCl로 대체시켰으며, sucrose는 1%로 농도를 낮추어서 사용하였다. 혼합배양한 세포는 $818 \mu\text{E}/\text{mm}^2/\text{sec}$ ($16 : 8$), $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온실에서 배양하면서 일정량을 2주 간격으로 같은 조성의 배지에 계대배양하여 동일조건을 유지하면서 60일간 배양하였다.

Heterocyst의 출현빈도. Arnon액체배지에서 90일간 현탁배양시킨 후 heterocyst출현빈도를 고체배지에서의 출현빈도와 비교하기 위하여 광학현미경하에서 heterocyst수를 조사하였다.

질소고정능 측정. Polyamine농도를 달리하여 첨가한 무질소배지에서 *Nostoc*만 단독배양한 것과 담배 배양세포와 혼합배양한 실험구에 각각 10%의 아세틸렌을 주입한 후 Fleming과 Haselkorn(1978)방법을 수정(Mathis *et al.*, 1986; Shankar *et al.*, 1986)하여 Gas Chromatography (GC-3BF, Flame Ionization Detector, Alumina Column 100~120 mesh, 100°C , air 0.4 kg. cm^{-2} , N_2 Carrier 2kg. cm^{-2} , H_2 0.4 kg. cm^{-2})로 아세틸렌 환원력을 측정하였다.

단백질 정량. 60일간 혼합배양한후 담배 배양세포의 표면에 밀집되어 있는 *Nostoc*을 증류수로 여러번 세척하고 원심분리하여 세번 후 Lowry등의 방법(1951)으로 단백질함량을 조사하였다.

Polyamine추출 및 정량. Goren등(1982)의 방법을 수정하여 담배 배양세포는 증류수로 3회 세척하고 *Nostoc*과 혼합배양한 세포는 표면의 *Nostoc*을 떼내고 여러번 증류수로 세척한 다음 5% perchloric acid로 균질화시키고 $27,000 \times \text{g}$ 로 20분간 원심분리하여 그 상정액을 polyamine정량에 사용하였다. 정량방법은 상정액 200 μl 를 혼합하여 상온의 암실에서 하루 방치시킨 다음 100 μl proline을 첨가하여 30분간 상온 암실에서 배양한 후 500 μl benzen으로 dansyl유도체를 추출하였다. 추출액 중 200 μl 를 silica gel plate에 점적하였다. 전개용매는 chloroform: triethylamine (25: 2, V/V)으로 전개시켜 ethylacetate에 용출하여 Photofluorometer로 형광강도를 측정하였다.

형태관찰. 시료는 2.5% glutaraldehyde를 포함한 인산완충용액에서 2시간 동안 전 고정한 후 1.3% OsO_4 를 포함한 인산완충용액에서 후 고정하였다. Ethanol series로 탈수시킨 다음 60°C 에서 36시간 Epon mixture와 propylene oxide를 침투시켜 block을 만들었다. 1~2 μm 두께로 semi-thin-section한 것은 광학현미경하에서 400배와 1,000배로 확대 관찰하였으며 700~800 \AA 으로 ultra-thin section한 것을 전자현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Heterocyst 분화 후에 polyamine이 nitrogenase활성에 미치는 영향. 무질소 Arnon배지에서 계속 공기순환하면서 3개월간 액체배양하여 분화된 heterocyst출현빈도는 약 57%이었으며 같은 기간 동안 무질소 1-B5고체배지에서 배양한 *Nostoc*의 heterocyst빈도가 약 18%인데 비하며 상당히 많은 수의 heterocyst가 형성되었다. heterocyst형성에 따라 대부분의 nitrogenase활성이 유도된

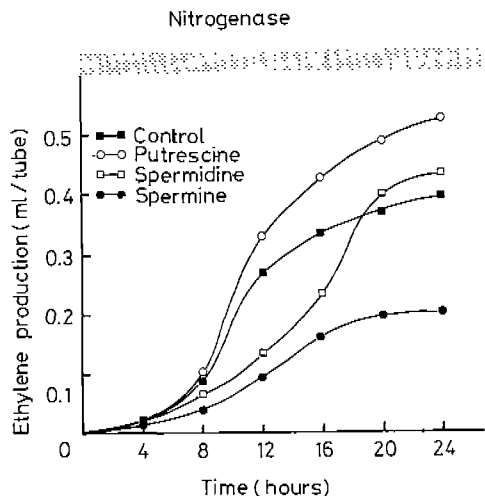


Fig. 1. Acetylene reductivity on *N.muscorum* in N-free 1-B5 media containing 10^{-4} M of polyamines after differentiation in Arnon suspension culture media without N-source for 90 days. Control is *N.muscorum* cultured in N-free 1-B5 media for 60 days. Samples were assayed for nitrogenase activity in time after addition of acetylene.

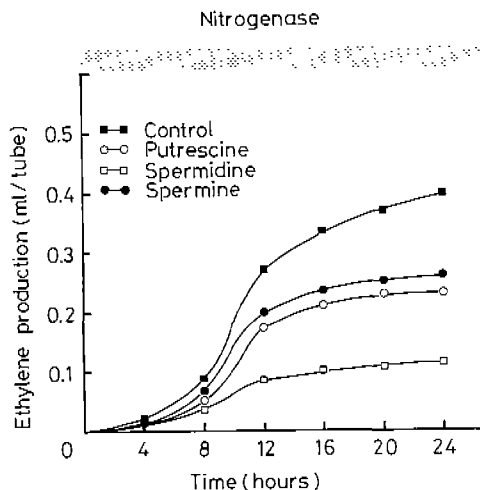


Fig. 2. Acetylene reductivity on *N.muscorum* cultured for 60 days in N-free media 1-B5 media cotaining 10^{-3} M of polyamines after differentiation in Arnon suspension culture media without N-source for 90 days. Control is *N.muscorum* cultured for 60 days in N-free 1-B5 media. Samples are assayed for nitrogenase activity in time after addition of acetylene.

다고(Flemng and Haselkorn, 1973; Lottore *et al.*, 1986)할 수 있는데 Fig. 1과 2는 polyamine 농도를 달리한 실험구에 heterocyst가 형성된 *Nostoc*을 단독배양한 다음 acetylene reductivity를 조사한 것이며 대조구는 polyamine을 제외한 동일배지에서 배양하였다. 같은 기간동안 1-B5고체배지에서 heterocyst를 분화시킨 것보다 (Cheong *et al.*, 1986)에틸렌 생성량은 모든 실험구에서 현저하게 증가하였으며 10^{-4} M putrescine처리구에서는 대조구에 비해 약 25% 증가하였다. 특이할만한 점은 10^{-4} M spermine처리구에서 *Nostoc*의 단독배양시 에틸렌 생성량이 대조구에 비해 약 50% 감소되는 양상을 보였으며 10^{-3} M polyamines처리구에서는 모두 대조구보다 에틸렌 생성이 낮은 경향이므로 polyamine종류에 따른 효과가 서로 다르며 (Cho *et al.*, 1985), heterocyst형성에 미치는 polyamine의 영향은 더 자세한 연구가 수반되어야 할 것 같다.

Fig. 3은 heterocyst를 형성시킨 후 무질소 1-B5배지에서 담배 배양세포와 혼합배양하였을 때 polyamine이 nitrogenase활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10^{-4} M의 polyamine을 처리한 무질소배지에서 혼합배양하여 아세틸렌 환원력을 조사한 것이다. 대조구는 polyamine을 첨가하지 않은 무질소배지에서 혼합배양한 것이며, *Nostoc*의 단독배양에 비하여 혼합배양시 아세틸렌 주입후 24시간 후에는 polyamine처리구 모두에서 2배이상의 아세틸렌 환원력을 나타냈으며 특히 spermine처리구는 대조구보다 약 3배, putrescine처리구는 약 2.7배, spermidine처리구는 약 1.7배 활성이 증가했다.

Fig. 4는 10^{-3} M ployamine을 첨가한 무질소 배지에서 혼합배양하였을 때 아세틸렌 환원력을 나타낸 것이다. 모든 10^{-3} M polyamine처리구에서 대조구보다 낮은 아세틸렌 환원력이 나타났

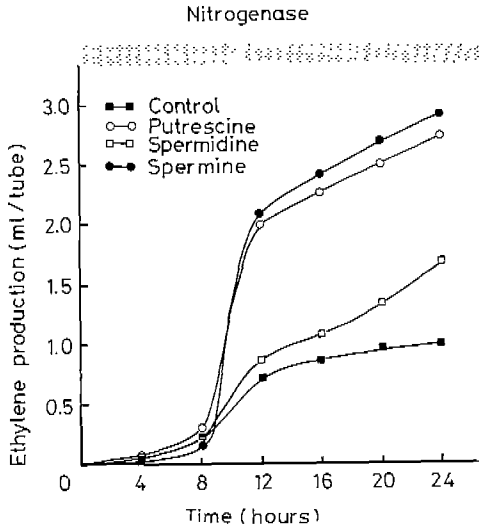


Fig. 3. Acetylene reductivity on *N.muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing 10^{-4} M polyamines for 60 days after *N.muscorum* were differentiated in Arnon suspension culture media without N-source for 90 days. Control is cultured *N.muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days. Samples were assayed for nitrogenase activity in time after addition of acetylene.

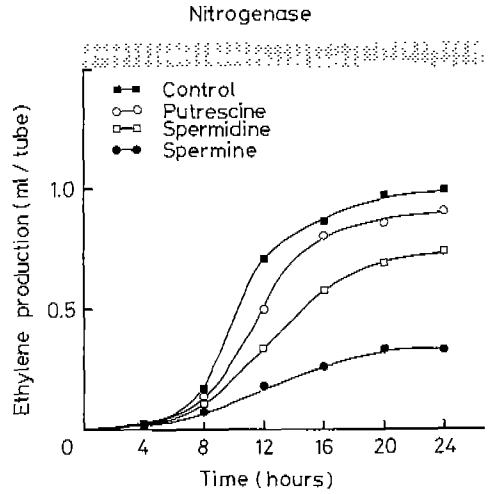


Fig. 4. Acetylene reductivity on *N.muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing 10^{-3} M of polyamines for 60 days after *N.muscorum* were differentiated in Arnon suspension culture media without N-source for 90 days. Control is cultured *N.muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days. Samples were assayed for nitrogenase activity in time after addition of acetylene.

으며 이와같은 결과는 10^{-4} M polyamine처리구(Fig. 3)보다도 아세틸렌 환원력이 훨씬 낮다는 것을 알 수 있었다. 이와같이 *Nostoc*의 현탁배양으로 충분한 heterocyst를 분화시킨다음 혼합배양하였을 때 nitrogenase활성이 증가하여 NH_4^+ 의 합성이 증가하므로 무질소배지에서 식물배양세포와 남조류의 공생유도가 가능하리라고 사료되며, heterocyst가 분화된 후에는 polyamine의 농도가 높을 때 오히려 nitrogenase활성이 낮아지는 것으로(Fig. 4) 미루어보아 polyamine이 heterocyst분화에 어떻게 영향을 주는지는 앞으로 더 연구할 필요가 있다고 생각된다.

Fig. 5는 polyamine의 농도를 달리한 무질소배지에서 담배 배양세포를 단독배양하였을 때 단백질 함량을 나타낸 것이다. 무질소배지에서 자란 담배 배양세포는 정상적인 배지에서 자란 것에 비하여 약 31% 감소하였으며 polyamine처리구에서 배양한 것은 무질소배지에서 배양한 것보다 전반적으로 증가하였고, 특히 spermine처리구에서는 약 78%이상의 단백질함량이 증가하였다.

Fig. 6은 Fig. 5와 동일한 배지에서 *Nostoc*과 담배 배양세포를 혼합배양한 후 단백질함량을 비교한 것이다. 무질소배지에서 담배배양세포를 단독배양하였을 때보다 혼합배양시 단백질 함량이 약 78%정도 증가하였으며, 이때 혼합배양한 *Nostoc*은 증류수로 여러번 세척하고 원심 분리하여 담배 배양세포와 분리시켰다. 또한 *Nostoc*의 가용성 단백질함량은 heterocyst에서

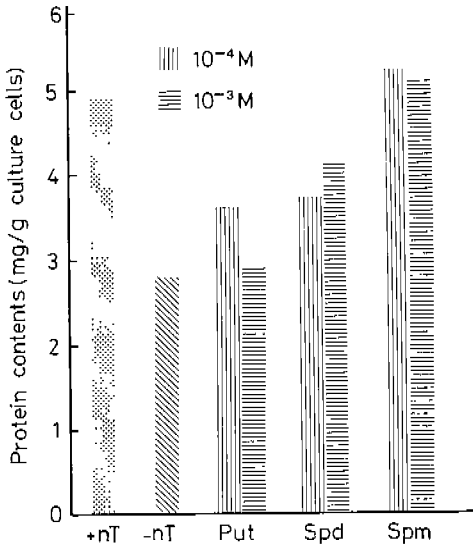


Fig. 5. The effects of polyamines on protein contents on cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days.
 +nT; cultured tobacco cells in 1-B5 media,
 -nT; cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media.

vegetative cell보다 약 4배 낮았다. nitrogenase 활성이 가장 높았던 10⁻⁴ M spermine 처리구 (Fig. 3)에서 단백질 함량이 최대가 아닌 점은 담배 배양세포의 성장에 비해서 *Nostoc*의 생장이 더 활발하게 진행되었기 때문에 담배 배양세포와 *Nostoc*의 균형있는 대사가 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

Polyamine 함량의 변화. 무질소 1-B5배지에서 담배 배양세포를 단독배양한 것과 *Nostoc*과 혼합배양하였을 때 담배 배양세포내의 polyamine 함량을 조사하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 단독배양과 혼합배양에서 모두 putrescine이 나타나지 않았으며 혼합배양시 단독배양보다

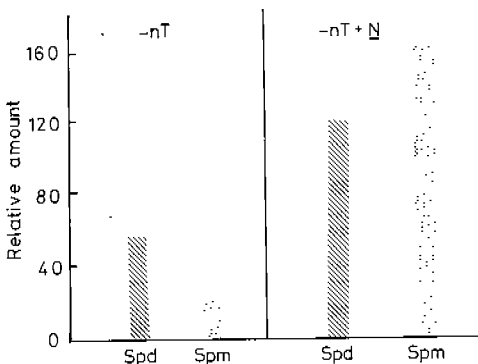


Fig. 6. The effects of polyamines on protein contents on *N.muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days.
 -nT; cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media,
 -nT + N; cultured tobacco cells associated with *N.muscorum*,
 +nN; *N.muscorum* cultured for 90 days in Arnon media,
 VC; vegetative cells of *N.muscorum* in N-free Arnon media,
 HC; heterocysts of *N.muscorum* in N-free Arnon media.

Fig. 7. The changes of spermidine and spermine in cultured tobacco cells and cultured tobacco cells associated with *N.muscorum* in N-free 1-B5 media for 60 days. *N.muscorum* transferred to association culture media after differentiation in Arnon suspension culture media without N-source for 90 days.
 -nT; cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media,
 -nT + N; cultured tobacco cells associated with *N.muscorum* in N-free 1-B5 media.

spermidine은 약 2배, spermine은 약 8배 증가하였다.

혼합배양에 있어서 형태적 변화. *Nostoc*의 heterocyst가 분화된 모습과 담배 배양세포와 혼합배양시 접종되는 형태를 관찰하였다.

Arnon배지에서 90일간 현탁배양 하였을 때 heterocyst출현빈도는 약 57%(Fig. 8)로 높은 nitrogenase활성을 나타냈다(Fig. 1,2). 이는 먼저 heterocyst를 분화시킨 후 혼합배양을 하면 (Cheong *et al.*, 1986) nitrogenase활성이 높아져 공생유도에 유용하리라고 생각된다(Fig. 3, 4). Fig. 9, 10과 같이 혼합배양시 담배 배양세포간극과 세포내에서 heterocyst를 볼 수 있으며 담배 배양세포벽이 안쪽으로 함몰되면서 *Nostoc*이 세포내로 들어가는 모습을 볼 수 있고 대부분 두

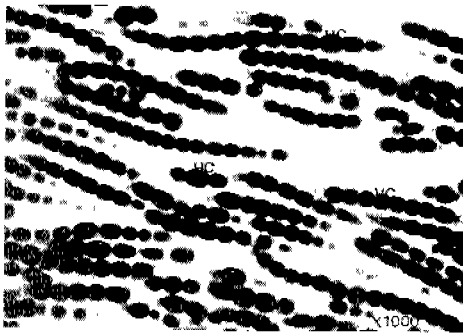


Fig. 8. Differentiated *Nostoc muscorum* in N-free Arnon media for 90 days(x 1,000).
VC; vegetative cell,
HC; heterocyst,
Note several paired heterocysts,
Heterocyst frequency 57%

Fig. 9. Differentiated *Nostoc muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days(x 1,200).

N. muscorum penetrated the intercellulars and cell wall of cultured tobacco cells.

TC; cultured tobacco cell,

NC; *Nostoc muscorum*

CW; cell wall of cultured tobacco cells,

IP; intercellular space of cultured tobacco cells.



Fig. 10. Heterocyst attached cultured tobacco cell wall(x 1,000).

Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* cultured for 60 days in N-free 1-B5 media after differentiation of *N. muscorum* in N-free Arnon media for 90 days.

TC; cultured tobacco cell,

N(HC); heterocyst of *Nostoc muscorum*,

CW; cell wall of cultured tobacco cell.

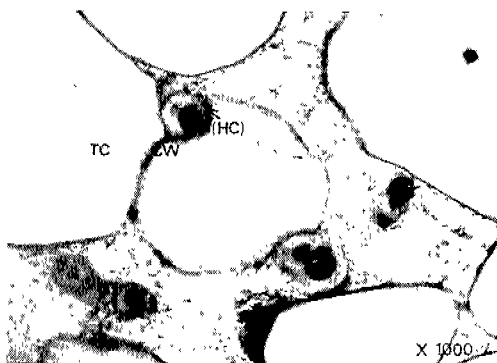




Fig. 11. Observation of *Nostoc muscorum* associated with cultured tobacco cells in N-free 1-B5media for 60 days(x 3,000).

Heterocysts of *N. muscorum* can be observed the intercellulars and cytoplasm of cultured tobacco cell.

TC; cultured tobacco cells,

NC; *Nostoc muscorum*,

CW; cell wall of cultured tobacco cell,

N;nucleus of cultured tobacco cells.

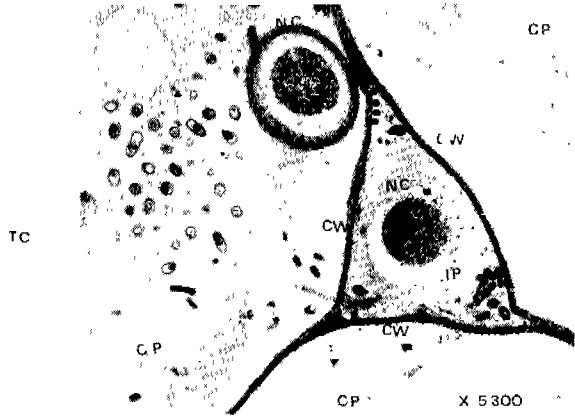


Fig. 12. *Nostoc muscorum* in intercellular space and cytoplasm of cultured tobacco cells in N-free 1-B5media cultured for 60 days(x 5,300).

NC; *Nostoc muscorum*,

CW; cell wall of cultured tobacco cells,

CP; cytoplasm of cultured tobacco cells,

IP; intercellular space.

꺼운 껍질로 둘러싸인 heterocyst임을 알 수 있다(Fig. 11). Fig. 12에서 3개의 담배 배양세포에 둘러싸인 *Nostoc*이 나타났으며 이러한 형태는 Newmann등 (1970)이 제시한 *N. punctiforme*와 식물세포의 공생에서 남조류가 숙주식물의 세포벽을 통해 세포내부로 들어가는 모습도와 비슷한 모습이었다. 이와같이 *Nostoc*이 식물 배양세포내로 들어갈 수 있음을 확인했고 식물세포내에 남조류의 공생가능성(Newmann et al., 1970;Silvester, 1976;Gusev et al., 1986)을 시사하였다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 *Nostoc*과 식물 배양세포의 혼합배양을 통하여 질소원 이용의 가능성과 polyamine이 혼합배양에 미치는 영향을 몇가지 밝혔지만 그에 대한 세부적인 기구는 더 많은 연구에 의해 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

적 요

질소고정능을 가진 *N. muscorum*과 담배 배양세포를 무질소배지에서 혼합배양하였을 때 질소이용 능력과 polyamines의 영향을 조사하였다. 또한 *N. muscorum*과 담배배양세포를 혼합배양 하였을 때 형태적인 관찰을 통하여 식물배양 세포에서 질소고정능을 유도할 수 있는지 그 가능성을 알아보았다.

Nitrogenase활성은 *N. muscorum*을 무질소배지에서 배양하였을 때 질소원을 첨가한 배지에서 배양한 것보다 현저히 증가하였으며, polyamines를 처리한 무질소배지에서 혼합배양하였을 때는 10^{-4} M spermine처리구에서 가장 활성이 높았다.

혼합배양시 내재하는 polyamines의 함량은 담배 배양세포를 단독배양하였을 때보다 spermidine함량은 약 2배, spermine함량은 약 8배 증가하였다. 그리고 혼합배양시 형태적인 변화는 *N. muscorum*이 담배배양

세포 표면에 밀집되어 있으며 세포내에서도 역시 관찰되었다.

이러한 결과는 담배배양세포내에서 *N. muscorum*이 생존할 수 있으며 공생을 통하여 질소고정능 유도가 가능함을 시사해준다.

참 고 문 헌

- Almon, H. and H. Böhme. 1982. Photophosphorylation in isolated heterocysts from the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Biochim. Biophys. Acta* **679**: 279-286.
- 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.
- Butenko, R. G., M. V. Gusev, T. G. Korzhenevskaya and E. S. Lobakova. 1982. Growth of an associative culture of ginseng (*Panax ginseng*) cells and a cyanobacterium (*Chlorogloea fritschii*) under light and in the dark. *Fiziologiya Rastenii.* **29**: 995-1001.
- Chauvat, F., L. De Vries, A. Van der Ende and G. A. Van Arkel. 1986. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PPC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 185-191.
- Cheong, H.S., C. M. Kim and Y. H. Kang. 1986. 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. *Korean J. Bot.* **29**: 67-75.
- Cho, Y. D., Y. H. Kang, S. H. Lee and B. S. Pyo. 1984. Cell biological studies on the mechanism of development and differentiation *Korean J. Bot.* **27**: 1-6.
- Davis, L. C. and S. Kotake. 1980. Regulation of nitrogenase activity aerobes by Mg^{2+} availability: An hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**: 934-940.
- Ernst, A. and P. Böger. 1985. Glycogen accumulation and the induction of nitrogenase activity in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3147-3153.
- Fleming, H. and R. Haselkorn. 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase is synthesized in heterocysts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **20**: 2727-2731.
- Goren, R., N. Palavan, H. E. Flores and A. W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Gusev, M. V., T. G. Korzhenevskaya and I. B. Yagodina. 1982. Associative culture of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and cyanobacterium (*Anacystis nidulans*) cells. *Fiziologiya Rastenii.* **29**: 550-556.
- Gusev, M. V., T. G. Korzhenevskaya, L. V. Pyvovarova, O. I. Baulina and G. Butenko. 1986. Introduction of a nitrogen-fixing cyanobacterium into tobacco shoot regenerates. *Planta* **16**: 1-8.
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 319-344.
- Haycs, P. K., A. E. Walsby and J. E. Walker. 1986. Complete amino acid sequence of cyanobacterial gas vesicle protein indicates a 70-residue molecule that corresponds in size to the crystallographic unit cell. *Biochem. J.* **236**: 31-36.
- 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.
- Igarashi, K., K. Kashiwaga, T. Kakegawa, R. Aoki and S. Hirose. 1981. Increase of degree of spermidine stimulation of polypeptide synthesis in the presence of phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**:

128-134.

- Jensen, B. B. and R. H. Burris. 1986. N_2O as a substrate and as a competitive inhibitor of nitrogenase. *Biochem.* **25**: 1083-1088.
- Kush, A., C. Elmerich and J. P. Aubert. 1985. Nitrogenase of *Sesbania*, *Rhizobium* strain ORS 571: Purification, properties and "switch-off" by ammonia. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1765-1778.
- Latorre, C., J. H. Lee, H. Spiller and K. T. Shanmugam. 1986. Ammonium ionexcreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice: A feasibility study. *Biotec. Lett.* **8**: 507-512.
- 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.
- Mathis, J. N., D. W. Israel, W. M. Barbour, B. D. W. Jarvis and G. H. Elkan. 1986. Analysis of the symbiotic performance of *Badyrhizobium japonicum* USDA 110 and its derivative I-110 and discovery of a new mannitol-utilizing, nitrogenfixing USDAZ 110 derivative. *Appl. Env. Microbiol.* **52**: 75-80.
- Meeks, J. C., C. S. Enderlin, C. M. Joseph, J. S. Chapman and M. W. L. Lollar. 1985. Fixation of [^{15}N]N $_2$ and transfer of fixed nitrogen in the *Anthoceros Nostoc* symbiotic association. *Planta* **164**: 406-414.
- Neumann, V. D., M. Ackermann and F. Jacob. 1970. The fine structure of the endosymbiotic blue-green algae in *Gunnera chilensis* LAM. *Biochem. Physiol. Pflanzen. (VPP) Bd.* **161**: 483-498.
- Rose, D. and S. M. Martin. 1975. Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea* sp.) in suspension cultures. *Can. J. Bot.* **53**: 1942-1949.
- Sawhney, R. K., N. S. Shekhawat and A. W. Galston. 1985. Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regulation* **3**: 329-337.
- Shankar, H. N. R., I. R. Kennedy and P. B. New. 1986. Autotrophic growth and nitrogen fixation in *Derxia gummosa*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1797-1803.
- Shearer, G. L. Feldman, B. A. Bryan, J. L. Skeeters, D. H. Kohl, N. Amarger, F. Mariottii and A. Mariotti. 1982. ^{15}N Abundance of nodules as an indicator of N metabolism in N_2 -fixing plants. *Plant Physiol.* **70**: 465-468.
- Silvester, W. B. 1976. Symbiotic nitrogen fixation in plants. *Cambridge Univ. Press*, pp. 521-541.
- Spiller, H. 1980. Photophosphorylation capacity of stable spheroplast preparations of *Anabaena*. *Plant Physiol.* **66**: 446-450.
- Vaishampayan, A. and A. Hemantaranjan. 1984. Physiological significance of vanadium uptake during N_2 and NO_3^- metabolism in various strains of a N_2 -fixing cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Plant Cell Physiol.* **25**: 845-850.
- Wolk, C. P. 1982. Heterocysts. The biology of cyanobacteria. pp. 359-387.
- 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.
- Yoch, D. C. and G. J. Whiting. 1986. Evidence of NH_4^+ switch-off regulation of nitrogenase activity by bacteria in salt marsh sediments and roots of the grass *Spartina alterniflora*. *Appl. Env. Microbiol.* **51**: 143-149.