

벼(*Oryza sativa* cv. Tongil) 뿌리에 있어서 Nitrate 환원에 필요한
환원력의 공급원에 관한 연구

張 楠 基 · 崔 弘 瑄
(서울대학교 師範大學 生物教育科)

A Study on the Source of Reductants for Nitrate Reduction in
Rice (*Oryza sativa* cv. Tongil) Roots

Chang, Nam-Kee and Hong-Gwan Choe
(Dept. of Biology, College of Education, Seoul National University)

ABSTRACT

There was a decrease in nitrate reductase activity(NRA) measured *in vivo* in rice roots (*Oryza sativa* cv. Tongil) grown in anaerobic culture solution. But it was reversed by addition of malonate to the *in vivo* nitrate reduction assay medium. Malonate increased the *in vivo* NRA during 2-5 hours incubation and decreased it in longer incubation hours.

In vivo NRA was stimulated by addition of NaHCO_3 to the assay medium, but not by Na_2CO_3 . The stimulation of NRA by NaHCO_3 was not observed in shoot removed rice roots.

It is suggested that CO_2 from NaHCO_3 is carboxylated by phosphoenol pyruvate carboxylase, results in increasing the malate contents in the rice roots, and stimulates the *in vivo* NRA. NADH needed in nitrate reduction is supported by malate oxidation. In rice roots, it seems probable that malate oxidation in the mitochondria is more important to nitrate reduction than malate oxidation in cytoplasm.

서 론

일반적으로 고등식물은 질소원으로 nitrate를 흡수하여 nitrite, ammonia로 환원하여 amino acid를 만들어 낸다. 이러한 일련의 질소동화과정은 nitrate reductase(NR)의 관여에 의해 조절되고 있다(Hewitt, 1975).

벼 묘종에 있어서 NR을 질소원으로 nitrate를 주었

을 경우 작뿐 아니라 뿌리에서도 나타나며 어린 것일수록 뿌리의 nitrate reductase activity(NRA)가 높게 나타난다는 것이 알려져 있다(Marwaha and Juliano, 1976). Suzuki 등(1981)은 벼 뿌리에 있어서 nitrite reductase(NiR)는 protoplast에서 발견되었으나 NR은 세포질 내에 존재한다고 발표하였다. 벼는 물에 잠긴 경작지에서도 잘 성장하며 이는 벼 뿌리가 그 구조와 생리적 특징에 있어서 산소가 부족한 환경에 잘 적응하고 있다는 것을 의미한다(Drew and Lynch, 1980).

엽록체를 가지고 있는 잎의 경우에 NRA는 빛이 있을 때가 없을 때보다 현저하게 증가하는 일주기 현상을 보이고 있다. Naiks 등(1982)은 그 원인으로 빛에 의한 광합성 산물인 triose phosphate가 nitrate 환원에 직접적으로 환원력을 제공하기 때문이라기(klepper *et al.*, 1971) 보다는 mitochondria에서 만들어진 NADH가 ATP생산 보다 nitrate 환원에 더 많이 사용될 수 있기 때문이라고 하였다(Sawhney *et al.*, 1978) 이것은 *in vivo* NRA가 phosphoenol pyruvate(PEP)와 pyruvate 및 다른 유기산들에 의해 증가된다는 발견에 그 근거를 두고 있다(Naiks *et al.*, 1982).

뿌리의 경우 nitrate 환원에 필요한 환원력의 공급원에 대한 연구가 충분하지 않은 상태이다. 그러나 뿌리 내의 탄수화물 양 증가에 따라 NRA가 증가된다는 보고가 있고(Minottii and Jakson, 1970) 싹이 제거된 뿌리에 외부에서 sugar를 공급해 주면 nitrate 환원이 계속될 수 있다는 보고가 있다(Sasakawa and Yomamoto, 1978; Lee, 1978). 그리고 지상부에서 일어나는 광합성에 의해 보리 뿌리의 *in vivo* NRA가 증가하며 또한 malate가 보리 뿌리 NRA에 영향을 준다는 것이 알려져 있다(Deane-Drummond and Clarkson, 1979; Deane-Drummond *et al.*, 1980).

본 연구에서는 배양액내의 용존산소량과 싹의 제거가 벼 뿌리 *in vivo* NRA에 미치는 영향을 조사하고 *in vivo* 효소 반응액에 NaHCO₃, malonate를 첨가했을 때 나타나는 NRA의 변화로부터 벼 뿌리에 있어서 nitrate 환원에 필요한 환원력이 공급되는 경로를 추적해 보고자 한다.

재료 및 방법

종자의 처리 및 묘종의 배양

벼 종자(*Oryza sativa* cv. Tongil)를 1%(v/v) sodium hypochlorite 용액에 담가 15분간 표면 살균을 한 후 증류수로 10회 씻어내었다. 살균된 종자를 증류수에 담가 30°C로 유지된 암소에서 48시간동안 12시간 간격으로 증류수를 갈아 주면서 발아시켰다. 발아 상태가 고른 종자만을 골라 plastic 망위에 퍼진 cheese cloth 위에 옮기고 이를 5l의 증류수가 담긴 단면적이 900cm²인 plastic 용기위에 엮었다. 이후 6일 동안 28°C로 유지된 암소에서 계속하여 생육시켰으며 이때는 증류수를 24시간 간격으로 갈아 주었다. 6일 후 plastic 용기내의 증류수를 modified Hoagland 용액(Yoshida

et al., 1972)으로 바꿔주고 온실로 옮겼다. 질소원으로는 120µg/ml의 KNO₃를 배양액 중에 넣어 주었고 pH는 5.0으로 조절하였다. 조도는 자연광과 형광등을 이용하여 싹 높이에서 8,000~12,000 Lux 가량이 되도록 조절하였다. 낮의 온도는 25±3°C이었으며 밤의 온도는 20±2°C였다. 배양액에 O₂와 N₂ gas를 처리할 경우에는 25ml/min 정도의 양을 유리관을 통하여 bubbling 시켰다. 용존 산소량은 Müller 법으로 측정하였다.

in vivo NRA의 측정

실험 재료로는 9일동안 자란 묘종을 오전 10시에 채취하여 뿌리를 잘라 실험에 사용하였다. 실험방법은 Deane Drummond (1979)의 것을 변형하여 사용하였다. 효소반응액의 pH는 유기산의 막 투과성이 좋은 5.0으로 (Beever, 1961) 조절하였고 효소 반응액에는 50 mM K-phosphate buffer(pH 5.0), 2%(v/v) 1-propanol, 100mM KNO₃와 실험에 따라 NaHCO₃, Na₂CO₃, malonate와 각 유기산들이 포함되었다. 3개체의 뿌리를 3ml의 반응액이 담긴 마개달린 시험관에 넣어 28°C에서 30분간 배양한 후 10분간 100°C에서 중탕하여 반응을 종결시켰다. 실온으로 식힌 후 1ml의 반응액을 추출하여 1ml의 sulfanilic acid(3N HCl의 1%액)와 1ml N-1-naphtyl-ethylene diamine dihydrochloride(0.05%)를 가하여 발색시켰고 2시간이 지난 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 nitrite의 양을 결정하였다. NRA는 n moles NO₂⁻ formed/plant, hr.로 표시하였다. 반응시간에 따른 NRA의 변화는 18ml의 반응액에 18개체의 뿌리를 갈라넣고 일정한 시간마다 0.5ml의 반응액을 추출하여 측정된 nitrite의 양을 측정하여 결정하였다.

결 과

배양액 내의 용존 산소량이 벼 뿌리 *in vivo* NRA에 미치는 영향

용존 산소량은 O₂ gas로 bubbling된 배양액의 경우 9.17ppm 이었고 N₂ gas로 bubbling된 것은 0.73 ppm 이었다. Fig. 1에서 보이는 바와 같이 O₂ gas를 공급한 경우의 *in vivo* NRA는 35n moles NO₂⁻/plant,hr.로 아무런 gas도 공급하지 않은 경우(Fig. 2)와 거의 같았고 N₂ gas가 공급된 경우는 24 n moles NO₂⁻/plant, hr.로 가장 낮았다. 이러한 차이는 NaHCO₃, pyruvate를 반응액에 첨가시켜준 실험에서도 나타났

으나 malonate를 첨가시켜줄 경우 N_2 gas를 공급해 준 것의 *in vivo* NRA가 O_2 gas를 공급한 경우와 거의 같게 되었다(Fig. 1). 홍수에 잘 견디는 많은 식물들에 있어 뿌리 주변의 O_2 농도가 낮아지면 NRA가 증가한다는 보고들이 있으나(Srivastava, 1980) 본 실험에서는 그러한 증가를 볼 수 없었다. Blevins 등(1976)도 O_2 농도가 낮은 조건에서 보리 뿌리의 NRA가 증가하는 것을 볼 수 없었다고 발표한 바 있다.

싹의 제거가 벼 뿌리 *in vivo* NRA에 미치는 영향

벼 뿌리 *in vivo* NRA는 밤보다 낮에 전반적으로 높았고 해가 뜬 1~2시간 후에 최저치를 보이고 4~5시간 후에 최고치를 나타내었다. 그러나 해가 뜨기 직전에 싹을 제거한 경우에는 4~5시간 후 정상적 개체에서 보이는 최고치가 나타나지 않았다(Fig. 2). 이걸

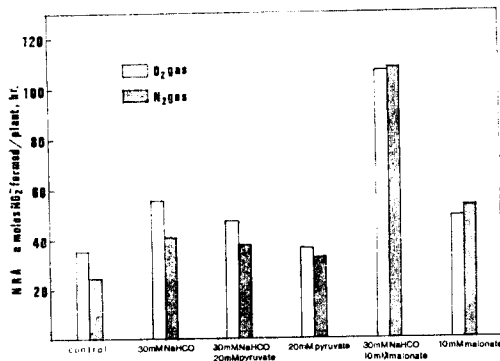


Fig. 1. Influence of bubbling O_2 or N_2 gas through culture solution on *in vivo* NRA with various incubation mediums in rice root. $NaHCO_3$, pyruvate, and malonate were added to *in vivo* NRA assay medium as described.

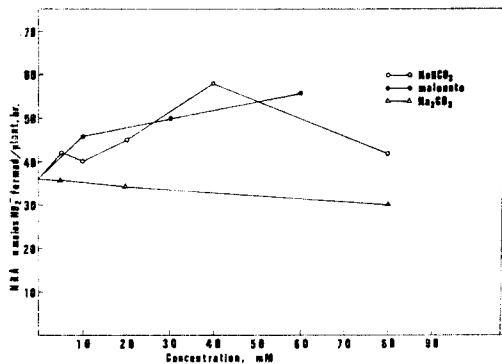


Fig. 2. Effect of various concentrations of $NaHCO_3$, malonate, and Na_2CO_3 on *in vivo* NRA in rice root.

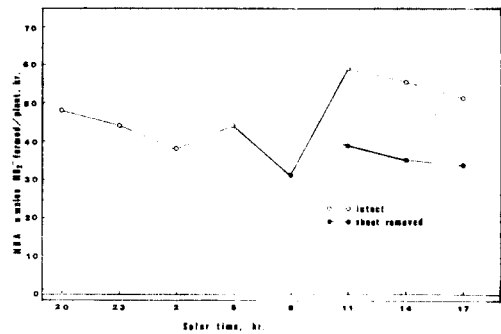


Fig. 3. Effect of shoot removal on circadian rhythm of *in vivo* NRA in rice root. Shoot was removed at 05:30.

과는 Dean-Drummond와 Clarkson(1979)이 보리 뿌리를 이용하여 행한 실험 결과와 일치한다. 그들은 싹 제거 실험에서 싹을 자르기 3시간 전에 malate를 배양액에 첨가시켜주면 싹이 있는 뿌리와 같은 최고치를 회복할 수 있다고 발표했다. Fig. 4에서 보이는 바와 같이 싹이 제거된 벼 뿌리의 경우 08:00시에서는 $NaHCO_3$ 와 malonate에 의한 증가가 싹이 있는 경우와 큰 차이가 없으나 11:00시에는 싹이 제거된 뿌리에 $NaHCO_3$ 를 제공하면 *in vivo* NRA가 오히려 저해되었다.

반응액 내의 $NaHCO_3$, malonate가 벼 뿌리 *in vivo* NRA에 미치는 영향

반응액 내의 $NaHCO_3$ 와 malonate 농도를 증가시키는데 따라 벼 뿌리 NRA가 증가되었다(Fig. 2). $NaHCO_3$ 의 경우 40mM에서 1.6배 가량 NRA를 증가시켰고 그 이상의 농도에서는 증가율이 감소되었다. Na^+ 에 의해 NRA가 영향을 받을 수 있으므로(Blevins *et al.*, 1978) 이에 대한 비교군으로 Na_2CO_3 를 반응액에 처리해 주었으나 별 다른 영향을 볼 수 없었다. $NaH-$

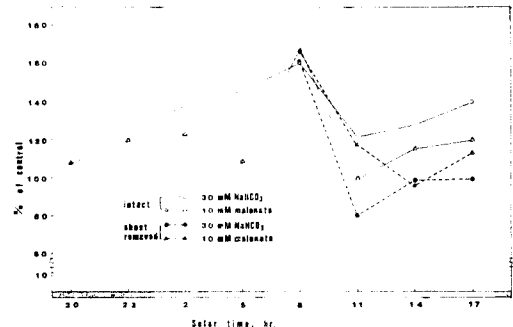


Fig. 4. Effect of $NaHCO_3$ and malonate on *in vivo* NRA in intact or shoot removed rice root.

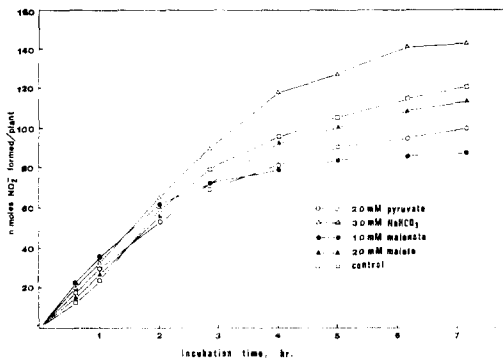


Fig. 5. Time course of nitrite formation with various incubation mediums in rice root sampled at 10:00. Pyruvate, NaHCO_3 , malonate, and malate were added to *in vivo* NRA assay medium as described.

CO_2 에 의한 *in vivo* NRA의 증가는 NaHCO_3 에서 공급된 CO_2 가 뿌리에서 carboxylation되어 뿌리내에 malate가 축적된 결과로 보인다. Aslam등(1979)은 보리 묘종을 CO_2 가 없는 대기에 노출시키면 NRA가 떨어지며 CO_2 가 있을 때만 광합성에 의해 고정된 CO_2 가 nitrate환원에 필요한 환원력을 제공하게 된다고 밝혔다. 싹이 제거 되었을 경우 NaHCO_3 에 의해 오히려 NRA가 감소되는 경향이 나타났다(Fig. 4). 이것은 싹이 제거되어 싹으로부터 광합성 산물이 뿌리로 이동해 오지 못했을 때 PEP와 같은 glycolytic intermediate가 제한 요인이 되어 carboxylation이 일어나지 못한 결과라 생각된다.

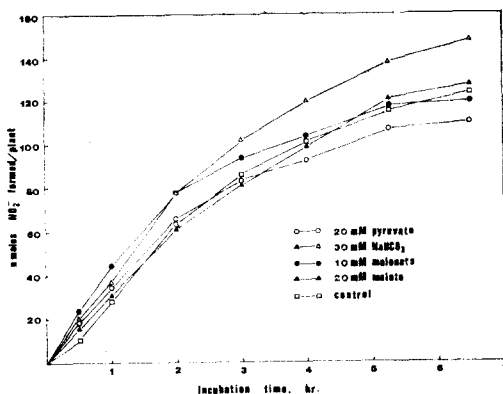


Fig. 6. Time course of nitrite formation with various incubation mediums in rice root sampled at 15:00. Pyruvate, NaHCO_3 , malonate, and malate were added to *in vivo* NRA assay medium as described.

malonate가 첨가된 반응액에 의한 *in vivo* NRA 증가는 N_2 가 공급된 배양액에서 자란 벼 뿌리의 경우 더욱 뚜렷했고(Fig. 1) malonate를 반응액에 첨가시켰을 때 반응시작 2~5시간후까지는 *in vivo* NRA를 증가시켰으나 그 이후에는 오히려 감소시켰다(Figs. 5, 6, 7).

반응액 내의 malate와 pyruvate가 *in vivo* NRA에 미치는 영향

10:00시와 15:00시에 채취된 벼 뿌리에서 반응액에 malate가 첨가된 경우 반응시간이 연장됨에 따라 control과 축적된 nitrite의 양이 큰 차이가 없으나(Figs. 5, 6) 20:00시에 채취된 경우에는 반응시간이 길어지면서 control보다 축적된 nitrite의 양이 많아지고 있다(Fig. 7).

malate가 NRA를 증가시킨다는 많은 보고가 있으나 (Deane-Drummond and Clarkson, 1979; Woo and Calvin, 1980; Woo *et al.*, 1980) 본 실험에서는 재료의 채취시간에 따라 malate에 의한 효과가 다르게 나타났다.

pyruvate를 반응액에 첨가시킬 경우 벼 뿌리가 채취된 시간에 관계없이 초기에는 control에 비해 축적된 nitrite의 양이 많으나 반응시간이 계속됨에 따라 control보다 떨어졌다(Figs. 5, 6, 7). 이러한 양상은 malonate가 반응액에 첨가된 경우와 매우 비슷하였다.

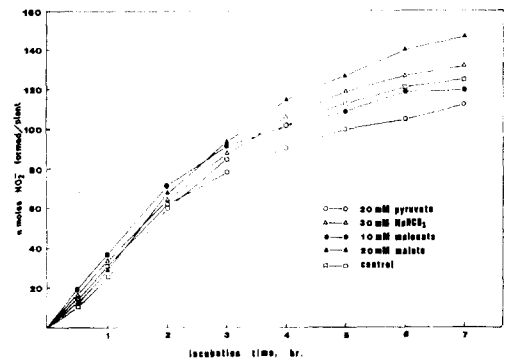


Fig. 7. Time course of nitrite formation with various incubation mediums in rice root sampled at 20:00. Pyruvate, NaHCO_3 , malonate, and malate were added to *in vivo* NRA assay medium as described.

논 의

Nitrate 환원에 필요한 NADH가 어떻게 공급되는가 하는 것은 아직 많은 문제점을 가지고 있다(Naiks *et*

al., 1982). Woo와 Canvin(1980)은 시금치 잎에서 반응액에 첨가된 malonate는 nitrate 환원에 아무런 영향을 주지 못한다는 실험 결과에 근거하여 malate가 mitochondria 내에서 산화되어 발생하게 되는 NADH보다는 세포질 내에서 malate dehydrogenase에 의해 산화되면서 발생하는 NADH에 의존하여 nitrate가 환원된다고 주장하였다. 이에 반해 Naiks와 Nicholas(1981)는 malonate에 의해 mitochondria 내의 NAD-malic enzyme이 저해되어 결과적으로 nitrate 환원이 감소되거나 이러한 감소는 pyruvate를 malonate와 함께 첨가시켜줄 경우 상쇄된다는 발견에 근거하여 nitrate 환원에 필요한 환원력은 mitochondria 내의 Krebs cycle에 의존되고 있다고 보고 하였다.

위의 두 가지 설에 있어 큰 차이점은 malonate에 의해 NRA가 어떤 영향을 받는가 하는 점에 있다. malonate는 succinate dehydrogenase에 있어 succinate에 대한 경쟁적 저해제 일뿐 아니라 mitochondria 내의 NAD-malic enzyme을 저해하는 것으로 알려져 있다(Naiks and Nicholas, 1981). 벼 뿌리를 이용한 본 실험에서 malonate에 의한 영향은 하루중 실험을 행한 시간(Fig. 4), 반응을 계속시킨 시간(Figs. 5, 6, 7) 등의 요인에 의해 많은 차이가 있을 수 있다는 것을 보여 준다. 뿐만 아니라 Naiks와 Nicholas(1981)의 결과와는 반대로 반응 초기에 (2~5시간) malonate는 NRA를 증가시키는 것으로 나타났다(Figs. 5, 6, 7). 염류체가 없는 벼 뿌리는 Naiks와 Nicholas(1981)가 실험에 사용한 밀의 잎과는 달리 glycolysis가 활발히 일어나고 있기 때문에(Turner and Turner, 1980) mitochondria 내의 pyruvate 농도가 Krebs cycle의 제한 요인이 되기 힘들 것이다. 이러한 경우 malonate가 malate \rightarrow pyruvate + CO₂ + NADH의 과정을 저해해 준다면 mitochondria 내의 malate가 높은 농도로 유지되면서 Krebs cycle이 촉진될 수 있을 것이다(Wiskich, 1980). 그러나 식물 mitochondria 막에 대한 pyruvate의 투과율은 malate보다 매우 낮기 때문에(Day and Hanson, 1977) 이러한 malate로부터의 pyruvate 생산이 오랜 동안 저해되면 mitochondria 내의 pyruvate 농도가 제한 요인이 되어 Krebs cycle이 저해되고 결과적으로 NRA가 감소될 것이다. 실제로 glycolysis가 가장 활발하게 일어나고 있을 것으로 예상되는 N₂ gas가 공급된 혐기성 조건에서 배양된 벼 뿌리에서 malonate에 의한 *in vivo* NRA 증가가 가장 컸다(Fig. 1).

본 실험에서는 glycolysis나 Krebs cycle의 intermediate 뿐 아니라 NaHCO₃에 의해 공급된 CO₂가

nitrate 환원을 촉진시킴을 보여 주었다(Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). 식물의 뿌리에서 외부의 CO₂가 PEP carboxylase에 의해 고정되며 이 결과 malate가 축적된다는 보고들이 있다(Ting and Dugger, 1967; Poppet *et al.*, 1982). 뿌리에서의 carboxylation에 의한 malate 합성은 PEP + CO₂ \rightarrow oxaloacetate + NADH \rightarrow malate의 식에서 보이는 것처럼 NADH가 소모되는 반응이다. Woo와 Canvin(1980)의 주장처럼 nitrate 환원에 필요한 NADH가 세포질 내에서 malate dehydrogenase에 의해 공급되어야 한다면 carboxylation에 의한 malate 합성과 nitrate의 환원은 세포질 내의 NADH를 똑같이 요구하는 경쟁적인 반응이어야 한다. 그러나 본 실험에서는 NaHCO₃에 의한 carboxylation의 결과 nitrate 환원이 오히려 촉진되는 것으로 나타났다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 벼 뿌리에 있어서의 nitrate 환원은 malate가 mitochondria 내에서 Krebs cycle을 통해 산화되면서 만들어지는 환원력에 주로 의존되고 있다고 추정된다.

적 요

벼 뿌리에 있어서 nitrate 환원에 필요한 환원물질이 제공되는 경로를 추적하고자 하였다.

N₂ gas가 공급된 혐기성 배양액에서 자란 벼 뿌리는 O₂ gas가 공급된 배양액에서 자란 벼 뿌리와 비교하여 볼 때 *in vivo* nitrate reductase activity(NRA)가 낮은 것으로 나타났으나 malonate를 효소 반응액에 첨가시켜줄 경우 이러한 차이는 볼 수 없었다. malonate는 반응시작후 2~5시간 이내에는 *in vivo* NRA를 증가시키는 경향을 나타내었으나 그 이상 반응시간이 연장되면 *in vivo* NRA를 감소시켰다.

효소 반응액에 NaHCO₃를 첨가시켜 주었을 경우에는 NRA의 증가를 볼 수 있었다. 싹이 제거된 경우에는 NaHCO₃에 의한 *in vivo* NRA 증가가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 NaHCO₃에 의해 공급된 CO₂가 phosphoenol pyruvate carboxylase에 의하여 carboxylation되어 벼 뿌리 내의 malate 농도를 높여주게 된 결과 나타난 것으로 추정된다.

벼 뿌리에 있어서 nitrate 환원에 필요한 환원은 malate 산화에 의해 공급되며 이때 mitochondria 내에서의 malate 산화가 세포질 내에서의 malate 산화보다 nitrate 환원에 더 중요한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Alsam, M., R. C. Huffaker, D. W. Rains, and K. P. Rao, 1979. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.*, **63** : 1205~1209.
- Beevers, H., 1961. Respiratory metabolism in plants. Row, Peterson and Company, New York, 58pp.
- Bleevins, D. G., R. H. Lowe, and L. Staples, 1976. Nitrate reductase in barley roots under sterile, low oxygen condition. *Plant Physiol.*, **57** : 458~459.
- Bleevins, D. G., N. M. Barnett, and W. B. Frost, 1978. Role of potassium and malate in nitrate uptake and translocation by wheat seedlings. *Plant Physiol.*, **62** : 784~788.
- Day, D. A., and J. B. Hanson, 1977. Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. *Plant Physiol.*, **59** : 630~635.
- Deane-Drummond, C. E., and D. T. Clarkson, 1979. Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed *in vivo* in barley roots (*Hordeum vulgare* cv. Midas). *Plant Physiol.*, **64** : 660~662.
- Daen-Drummond, C. E., D. T. Clarkson, and C. B. Johnson, 1980. The effect of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity, assayed *in vivo* and *in vitro* in roots of *Hordeum vulgare*(Barley). *Planta.*, **48** : 455~461.
- Drew, M. C., and J. M. Lynch, 1980. Soil anaerobiosis microorganisms, and root function. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18** : 37~66.
- Hewitt, E. J., 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26** : 73~100.
- Klepper, J., D. Flesher, and R. H. Hageman, 1971. Generation of reduced nicotin amide adenin dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, **48** : 580~590.
- Lee, R. B., 1978. Inorganic nitrogen metabolism in barley roots under poorly aerated condition. *J. Exp. Bot.*, **29** : 693~708.
- Marwaha, R. S., and B. O. Juliano., 1976. Aspect of nitrogen metabolism in the rice seedling. *Plant Physiol.*, **57** : 923~927.
- Minottii, P. L., and W. A. Jakson, 1970. Nitrate reduction in the roots and shoots of wheat seedlings. *Planta.*, **95** : 36~44.
- Naiks, M. S., and D. J. D. Nicholas, 1981. Relation between CO₂ evolution and *insitu* reduction of nitrate in wheat leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, **8** : 515~524.
- Naiks, M. S., Y. P. Abrol, T. V. R. Nair, and C. S. Ramarao, 1982. Nitrate assimilation. Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochemistry.*, **21** : 495~504.
- Popp, M., C. B. Osmond, and R. E. Summons, 1982. Pathway of Malic acid synthesis in response to ion uptake in wheat and lupin roots; Evidence from fixation of ¹³C and ¹⁴C. *Plant Physiol.*, **69** : 1289~1292.
- Sawhney, S. K., M. S. Naiks, and D. J. D. Nicholas, 1978. Regulation of NADH supply for nitrate reduction in green plant via photosynthesis and mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47** : 619~624.
- Srivastava, H. S., 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry.*, **19** : 725~733.
- Suzuki, A., P. Gadal, and A. Oaks, 1981. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta.*, **151** : 457~461.
- Ting, I. P., and W. R. Dugger, Jr., 1967. CO₂ metabolism in corn roots. *Plant Physiol.*, **42** : 712~718.
- Turner, J. F., and D. H. Turner, 1980. The regulation of glycolysis and pentose phosphate pathway. In D. D. Davis, ed., *The Biochemistry of Plants*, v. 2, Academic Press, New York. pp.279~316.
- Wedding, R. T., M. K. Black, and D. Pap, 1976. Malate dehydrogenase and NAD malic enzyme in the oxidation of malate by sweet potato mitochondria. *Plant Physiol.*, **58** : 740~743.
- Wiskich, J. T., 1980. Control of the Krebs cycle. In D. D. Davis, ed., *The Biochemistry of Plants*, v. 2, Academic Press, New York. pp.243~278.
- Woo, K. C., and D. T. Canvin., 1980. The role of malate in nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.*, **58** : 517~521.
- Woo, K. C., M. Jokinen, and D. T. Canvin, 1980. Reduction of nitrate by dicarboxylate shuttle in a reconstituted system of supernatant and mitochondria from spinach leaves. *Plant Physiol.*, **65** : 433~436.
- Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cock, and K. A. Gomez., 1972. Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philipines. 53~57.

(1984年 5月 19日 接受)