

보리수나무의 질소고정활성에 대한 환경요인의 영향

송승달 · 이경진 · 박태규 · 안정선* · 김준호*

경북대학교 자연과학대학 생물학과, *서울대학교 자연과학대학 생물학과

Effects of Environmental Factors on the Nitrogen Fixation Activity in *Elaeagnus umbellata*

Song, Seung-Dal, Kyung-Jin Lee, Tae-Gyu Park, Chung-Sun An* and Joon-Ho Kim*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul.

ABSTRACT

The seasonal changes of symbiotic nitrogen-fixation activity and environmental factors of autumn olive plant (*Elaeagnus umbellata* Thunb.), which is an important constituent species of temperate vegetation and a non-leguminous root nodule plant interacting with *Frankia* sp., were quantitatively analyzed in the natural vegetations during the growing period. The acetylene reduction activity of perennial root nodules of autumn olive plant initiated with new leaf growth in mid April and showed two peaks of 133 and 145 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{gfw}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ in early June and mid September. The nitrogenase activity decreased to 10~30% during hot dry summer from mid June to the end of August, and disappeared during the dormant period of winter. The optimum conditions for nitrogen fixation was 30°C, pH 7 and 16kpa of oxygen partial pressure in the rhizosphere. The diurnal change showed the maximum activity in the mid-day and the minimum in the mid-night. The average contents of total nitrogen in each organ changed in the ranges of 42.5~40.1, 40.2~36.3, 30.3~28.6 and 18.4~16.2 mgN gdw^{-1} for nodule, leaf, root and stem, respectively. The soil conditions of rhizosphere were weak acidic, and seasonal variations of $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$ and water contents were in the ranges of 48.3~79.5ppm, 5.1~13.9 ppm, 4.4~9.9 μM and 14.5~39.4%, respectively.

Key words: Environmental factors, Nitrogen fixation, *Elaeagnus umbellata*

서론

삼림생태계의 발달과 생산성의 향상은 기후환경요인의 변화와 더불어 식물생육의 중요한 제한요인으로 되고 있는 질소화합물의 공급원인 질소고정식물의 기여에 의해 크게 영향을 받는다.

이 논문은 1992년 한국과학재단의 목적기초연구비 지원에 의해 수행되었음.

온대지역에 속하는 우리나라 각지의 삼림생태계에 있어서의 중요한 질소고정체는 수 종의 콩과 식물 및 비콩과의 근류식물을 숙주식물로 하여 근류를 형성하는 *Rhizobium* sp.와 *Frankia* sp.에 의한 공생적 질소고정이다. 이들 삼림식생에 있어서 질소고정활성이 있는 대표적인 식물은 목본의 콩과식물인 자귀나무, 싸리 및 아까시나무와 비콩과의 교목인 오리나무와 관목의 보리수나무 등이 알려지고 있다(Castro *et al.* 1990, Zitzer and Dawson 1989).

최근 수 종 질소고정식물의 성장과 활성에 대한 정량적 분석과 빛, 온도, pH, 토양수분, 산소, 질소 및 인 등의 환경영향의 분석에 대해서 많은 노력이 이루어지고 있다(Song *et al.* 1987, Huss-Danell *et al.* 1989, Hong and Song 1990, Kim and Song 1992). 지상부의 잎에서 생성되는 광합성산물은 질소고정체에 필요한 에너지를 공급하여 근류의 활성을 촉진하며(Pizelle 1984), 활성의 최적온도는 온대와 아열대지역에서 각각 20~25°C와 35°C인 것으로 보고되었다(Huss-Danell *et al.* 1987, Hensley and Carpenter 1979). 토양수분의 과잉상태나 건조 stress는 근류형성과 질소고정활성을 저해하며(Sundström and Huss-Danell 1987), 산소공급의 제한은 근류균의 호흡활성을 저해하여 질소고정활성을 감소시키는 것으로 알려지고 있다(Weisz *et al.* 1985, Guerin *et al.* 1990). 또한 근류에서는 산소저해에 대한 방어기구가 있어 호기적인 산소분압에서 최적활성을 가지며(Winship and Tjepkema 1985), 질소화합물(NO_3^- , NH_4^+)의 공급은 근류의 활성과 효소활성을 억제하는 것으로 보고되고 있다(Kohls and Baker 1989, Troelstra *et al.* 1987, Mackay *et al.* 1987).

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)는 우리나라 각지의 산지생태계에 널리 분포하는 관목의 비콩과의 질소고정식물이며, 질소원이 부족하여 생육환경이 불량한 초지 및 산지생태계에서 선구식물종으로서 생산성과 유기물 축적을 촉진하고 식생환경의 개선에 중요한 역할을 하고 있다. 본 연구에서는 자연식생의 보리수나무를 대상으로 하여 생육기간 중 식물근권의 각종 환경변화와 질소고정활성의 계절적 변화 및 식물체 각 기관별 질소함량의 변화를 분석하고, 질소고정효소의 활성조절요인이 되는 온도, pH, 산소, 함수량 및 질소원의 영향과 토양조건 및 식물체의 성장상태의 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

보리수나무의 채집지

대구직할시 근교에 위치하고 있는 산성산(북위 35° 48', 동경 128° 37', 표고 550 m)의 정상에서 북동방향으로 고도 약 200~400 m 지점에 소나무 및 오리나무 등과 함께 혼생하는 보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)에 대해 생육기간중 주기적으로 측정하였다. 보리수나무의 평균 수고와 흉고직경은 각각 1.7~2.4m 와 2.4~3.5cm 였으며, 토양은 척박하고 불안정한 사질 토양으로 구성되어 있었다.

질소고정활성의 측정

보리수나무의 근권에 대해 각 계절별로 매 2주 간격으로 시료를 채집하고, 근류의 활성은 아세틸렌 환원법(acetylene reduction activity, ARA)에 의해 측정하였다. 근류는 질소고정활성에 영향을 미치지 않도록 뿌리에 부착된 채로 채취하여 근권토양과 함께 실험실로 운반하여 즉시 다음과 같이 처리하여 활성의 변화를 측정하였다. 일정량의 근류(0.1~0.3gfw)를 10ml vial에 넣고 25°C에서 30분간 전처리한 후 Burris병에 의해 CaC_2 와 buffer용액의 반응에서 생성된 아세틸렌(C_2H_2) 가스를 vial 부피의 10%로 주입하여 일정조건에서 일정시간 배양하고, 주사기

로 0.5ml의 가스 sample을 뽑아서 Porapak R column(182cm × 0.32cm)을 이용한 Shimadzu GC 8 APF gas chromatograph(FID)에서 환원된 에틸렌(C₂H₄)량을 정량하여 시간당 단위 근류량에 대한 질소고정활성으로 계산하였다(Hardy *et al.* 1973). 환경요인에 따른 근류의 질소고정활성에 미치는 영향은 온도(5~40℃), 산도(pH 3~9), 산소농도(0~20 kpa) 및 질소원(NO₃⁻, NH₄⁺)의 농도와 일주기 등의 처리에 따른 변화를 측정하였다.

식물체 및 토양의 성분분석

생육기간중 매 2주 간격으로 보리수나무의 각 기관 및 토양에 대해 생량을 측정하고, 70℃의 건조기에서 3일간 건조시킨 후 건량을 측정하여 함수량을 계산하였다. 총질소량은 micro-Kjeldahl의 개량방법에 의해 측정치의 범위가 1~2mgN·gdw⁻¹이 되도록 식물체는 건량 50~150mg을 사용하고, 토양시료는 풍건하여 0.2mm의 체로 쳐서 건량 300~500mg에 대해 분석하였다(Song and Monsi 1974). 잎의 엽록소함량은 DMSO(dimethyl sulfonate)법으로 70℃에서 4 시간 추출하여 A₆₄₅와 A₆₆₃의 흡광도를 측정하여 Arnon식에 의해 산출하였다(Arnon 1949, Hiscox and Israelstam 1979). 토양의 인함량은 Ascorbic acid법으로 발색시켜 Hitach U-2000의 UV-Vis spectrophotometer에서 A880의 흡광도에 의해 정량하였다(Franson 1985). 토양의 pH는 2.5배의 증류수로 현탁하여 glass electrode에 의해 측정하였으며, 암모니아태와 질산태 질소의 측정은 각각 Nesslerization 법에 의한 A430의 흡광도와 UV 법에 의한 A220 과 A275의 흡광도의 차이로서 정량하였다(Franson 1985). 이상의 모든 시료의 분석은 3회이상 반복하여 그 평균치를 구하였다.

결과 및 고찰

질소고정활성의 계절적 변화

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)의 생육환경으로서 월별 평균기온, 강수량 및 일조시간의 분포는 대구측후소의 자료에 의한 것으로서 Fig. 1과 같다.

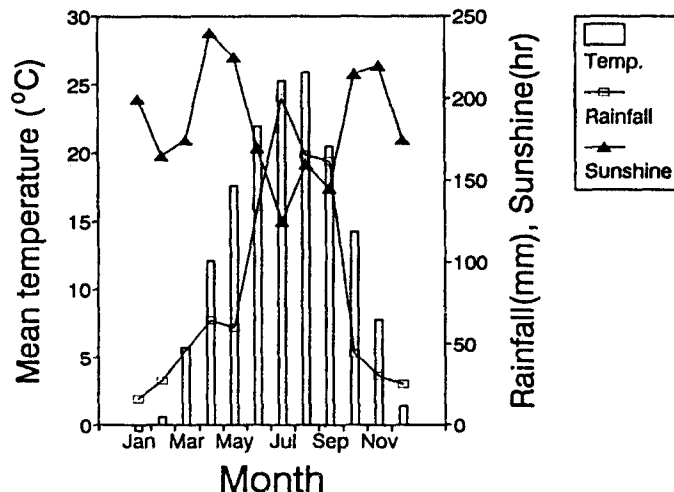


Fig. 1. Meteorological data (mean temperature, rainfall and sunshine hours per month) in Taegu area.

월평균기온은 1월에 최저온도인 -1.6°C 에서 8월에 최고온도인 25.9°C 의 범위였고, 강수량은 7월에 최대치 200.2mm 와 1월에 최소치 15.8mm 였으며, 월간 일조시간은 $125\sim 240$ 시간의 범위에서 여름의 우기(7월)와 봄의 건조기(4월)에 각각 최저와 최고치를 보였다.

토양환경은 생육기간중 깊이 10cm 의 지온이 $9\sim 25^{\circ}\text{C}$ 의 범위로서 8월에 최고온도를 보였고, pH는 $4.6\sim 6.0$ 의 범위로서 생육초기에는 약간 산성이었다. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 와 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 의 함량은 각각 $5.1\sim 13.9\text{ppm}$ 과 $48.3\sim 79.6\text{ppm}$ 의 범위로서 생육초기에 최고치를 나타내었고, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 함량은 $4.4\sim 9.9\mu\text{M}$ 의 범위로서 생육후기에 높았으며, 토양함수량은 $14.5\sim 39.4\%$ 의 범위로서 생육후기에 감소하였다(Fig. 2).

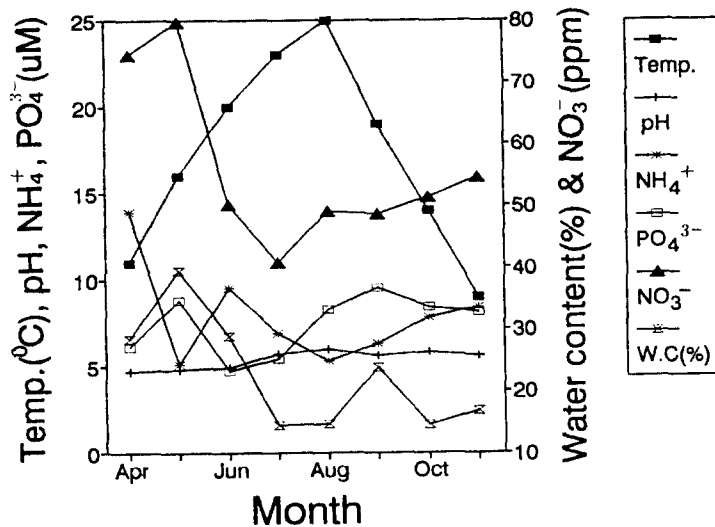


Fig. 2. Changes of soil environmental factors of *E. umbellata* rhizosphere.

보리수나무의 근류는 다년생으로서 *Frankia* sp.에 의해 간상의 구조가 형성된 후 반복적인 분지에 의해 산호 모양을 하고, 색깔은 보통 암갈색 또는 황갈색이며, 지름은 최대 5cm 이상의 대형 근류가 관찰되었으나, 대형 근류는 어린 것에 비해 비활성의 변이가 크므로 지름 1cm 이하의 근류를 활성측정용 시료로 하였고, 생육기간중의 비활성을 분석한 계절변화는 Fig. 3과 같다.

야생의 근류는 신엽이 발달하는 4월부터 질소고정활성이 출현하여 6월 초순에 극대치인 $133.5\mu\text{M C}_2\text{H}_4\text{ gdw}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 보였고, 7~8월에는 $20\sim 40\mu\text{M C}_2\text{H}_4\text{ gdw}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 로 감소하였으며, 9월 중순의 가을에 제2의 극대치인 $145\mu\text{M C}_2\text{H}_4\text{ gdw}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 에 이르렀고, 동계의 생육휴지기에는 활성이 없었다. 이는 7~8월의 강수량 증가(Fig. 2)에 의해 토양에서 유리되는 질소가 뿌리에 흡수됨에 따라 근류의 활성이 억제되는 것으로 생각할 수 있다. 그리고 이러한 활성의 패턴은 오리나무의 근류에서도 관찰되었으며, 겨울과 한 여름동안의 활성저해는 각각 저온과 수분 stress에 의한 영향으로 생각된다. 한편 보리수나무 근류의 최대활성은 지금까지 보고된 콩과식물의 아까시나무 및 비콩과식물의 오리나무와 같은 목본류의 근류에 비하여 높은 비활성이었다(Hong and Song 1990, Zitzer and Dawson 1989).

다년생 근류로서 생육 휴지기에 활성이 소실되는 것과 온도의 영향을 비교하기 위하여 1992년

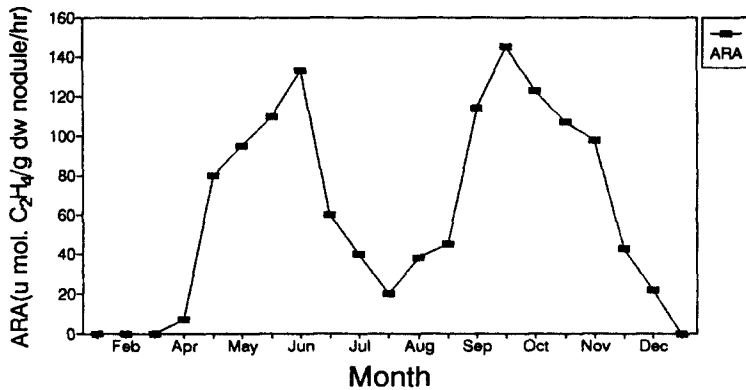


Fig. 3. Seasonal changes of nitrogenase activities (ARA) in the nodules of *Elaeagnus umbellata* (mol. C₂H₄ · gdw nodule⁻¹ · hr⁻¹).

1월말과 3월초에 야생의 식물체를 pot에 옮겨 20℃의 실험실에서 배양한 결과, 질소고정활성은 1월말에 옮긴 근류에서는 배양 10일째에 8.1 μM C₂H₄ · gfw⁻¹ · hr⁻¹를 보였으나, 3월초에 옮긴 근류에서는 배양 6일째에 14.1 μM C₂H₄ · gfw⁻¹ · hr⁻¹로서 1월의 근류에 비해 온도적응이 빠르고 2배정도의 높은 비활성을 보였다.

또한 보리수나무의 유묘를 야외와 생장실에 옮겨 3일간 적응시킨 후 3시간 간격으로 측정할 질소고정활성의 일변화는 주간에 광합성기능에 의해 촉진되어 12시경에 최대치(50.0~39.7 μM C₂H₄ · gdw⁻¹ · hr⁻¹)로 되며, 야간에는 감소하여 24시에 최소치(9.5~7.2 μM C₂H₄ · gdw⁻¹ · hr⁻¹)로 되었다(Table 1).

Table 1. Diurnal changes of nitrogenase activity of *Elaeagnus umbellata* nodules (μM C₂H₄ · gfw⁻¹ · hr⁻¹)

Hours		6:00	9:00	12:00	15:00	18:00	21:00	24:00
ARA	Field	12.2	42.3	50.0	38.4	18.0	13.2	9.5
	Green house	5.0	28.5	39.7	32.7	25.6	14.8	7.2

질소고정 활성에 대한 환경요인의 영향

1) 온 도

생육지의 토양온도가 14℃, 18℃ 및 22℃에서 생장하고 있는 보리수나무의 근류를 채취하여 각각 10℃에서 40℃까지 5℃ 간격으로 처리하여 보리수나무 근류의 질소고정 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같이 최적온도는 30~35℃였으나, 25℃이하와 35℃이상에서는 급격히 활성이 억제되었다. 생육지의 온도가 낮을수록 저온에서 근류의 상대활성이 크게 저하되어, 14, 18 및 22℃처리구는 30℃의 활성에 대하여 20℃에서 각각 10, 15 및 50%였고, 25℃에서는 각각 33, 55 및 82%로 되었으나, 고온인 35℃와 40℃에서는 각각 160, 87 및 54% 와 42, 25 및 24%로서 저온에서 생육한 개체가 높은 활성을 보였다. 이와 관련하여 Rainbird(1983)는 초본인 카우피의 근류가 15~30℃의 온도범위에서 활성이 일정하다고 보고하였으며, Hong과 Song(1990) 그리

Table 2. Effect of habitat temperatures on the relative nitrogenase activity (%) of *Elaeagnus umbellata* nodules

Temperature(°C)	10	15	20	25	30	35	40
14°C	—	—	10	33	100	160	42
ARA(%)	—	5	15	55	100	87	25
22°C	4	28	50	82	100	54	24

고 Kim과 Song(1992)은 목본의 콩과식물인 아까시나무 및 싸리의 근류의 최적온도가 각각 25°C와 30°C라고 보고하였으며, 보리수나무의 최적온도는 싸리의 것과 유사하였다.

2) pH

근류활성의 최적 pH는 중성(pH 7)이었으며, pH 5와 9에서의 상대활성은 각각 48%와 19%로 감소하였고, 산성과 알칼리성에서 급격한 저해를 보였다(Table 3). Caetano-Anolles 등(1989)은 알팔파의 뿌리에서 중성일 때 근류균의 흡착이 일어나고 pH 6이하에서는 근류균이 뿌리에서 유리된다고 하였으며, 보리수나무의 생육지의 토양 pH가 4.7~6.0인 것은 뿌리에 대한 *Frankia* sp.의 흡착과 근류형성을 및 활성이 저해되었을 것으로 생각된다.

3) 산 소

보리수나무의 근류는 대부분이 호기적인 지표부근의 근권에 분포하였다. 산소분압(0~20kpa)에 따른 근류활성의 변화는 Table 3에서와 같이 혐기상태에서는 활성이 소실되었으나, 산소분압이 증가할수록 활성이 증가하여 8kpa에서 40%의 활성을 보였으며, 16kpa이상에서는 포화치에 달하였다. 이러한 산소결핍에 의한 활성의 저해는 가역적인 것으로서 King 등(1988)은 산소공급에 의해 4~8시간후에 활성이 회복된다고 하였다. 질소고정효소는 산소에 대단히 민감하여 근류가 손상을 입으면 곧 활성을 잃게 되는 것으로 알려져 있으며(Hartmann *et al.* 1985), 근류에서는 효율적인 산소방어기구인 vesicle에 의해 질소고정효소의 환원상태를 보호함으로써 호기상태에 의한 대사에너지의 공급을 통해 환원활성을 유지하게 되는 것이다.

4) 토양수분과 질소원

근류 활성에 대한 토양수분조건의 영향은 함수량이 위조점이 되는 10%(1.5Mpa)일 때 최대 포장용수량(25%)에 비해 55%의 활성을 보였고, 5%와 30%의 함수량에서는 각각 18%와 92%로서 수분 stress에 의해 현저한 활성의 저해를 보였다(Table 3). 질소원의 처리에 의한 질소고정활성의 변화는 Table 3에서와 같이 NO_3^- 1mM과 3mM처리에서 각각 대조구에 비해 80%와 95%의 현저한 활성저해를 나타내었으나, NH_4^+ 1mM과 3mM의 처리에서는 각각 10%의 촉진과 55%의 저해를 보였다.

식물체의 생육특성

보리수나무 유묘의 각 기관별 생체량, 엽록소함량, 질소함량 및 함수량의 계절변화는 Table 4와 같다. 잎, 줄기, 뿌리 및 근류의 생체량의 변화는 각각 9월 중순까지 증가를 보인 후 생장은 정지하였으나, 특히 잎은 다른 식물보다 늦게까지 낙엽되지 않고 11월 하순에도 녹색의 잎을 유지하고 있었다. 생육기간중 엽록소함량은 1.39~2.78 mgChl · gfw⁻¹의 범위에서 7월에 최고치를 보였으며, 질소함량은 근류, 잎, 뿌리 및 줄기의 순위로 높고 그 평균치가 각각 42.5~40.1, 40.2~36.3, 30.3~28.6 및 18.4~16.2 mgN · gdw⁻¹의 범위에서 변화하였다. 특히 보리수나무는

Table 3. Effect of pH, oxygen gradients, water content and nitrogen sources of soil environment on the relative nitrogenase activity(%) of *Elaeagnus umbellata* nodules

	pH					
	4	5	6	7	8	9
A R A (%)	32	48	82	100	65	19
	Oxygen(kpa)					
	0	4	8	12	16	20
A R A (%)	0	20	40	60	100	100
	Water content (%)					
	5	10	15	20	25	30
A R A (%)	18	55	112	110	100	92
	NO ₃ ⁻ (mM)			NH ₄ ⁺ (mM)		
	0	1	3	0	1	3
A R A (%)	100	20	5	100	110	45

Table 4. Changes of fresh weight biomass, chlorophyll, total nitrogen and water contents of each organ of *Elaeagnus umbellata*

Items	Apr. 15	May 15	Jun. 14	Jul. 15	Aug. 14	Sep. 14	Oct. 15	Nov. 14
Fresh weight biomass (g · plant ⁻¹)								
Leaf	1.16	2.21	4.03	4.62	5.06	6.26	5.85	5.12
Stem	2.30	3.20	3.75	4.02	5.05	5.20	5.33	5.44
Root	2.90	3.75	4.52	5.15	6.13	7.03	7.65	7.94
Nodule	0.12	0.15	0.18	0.21	0.32	0.36	0.39	0.43
Chlorophyll(mg · g ⁻¹)								
	1.74	1.88	2.07	2.65	2.14	2.11	1.87	1.72
Total nitrogen (mgN · gdw ⁻¹)								
Leaf	40.2	39.5	38.8	37.9	37.5	37.1	38.5	36.1
Stem	17.6	17.0	17.3	17.1	16.8	16.2	17.2	18.4
Root	30.3	29.6	29.4	28.8	29.3	28.6	29.4	30.1
Nodule	42.5	41.7	41.3	41.1	40.6	40.1	41.4	42.1
Water content (% on dw basis)								
Leaf	197	365	282	253	250	199	168	133
Stem	82	87	91	154	107	110	102	92
Root	120	141	195	113	104	123	116	128
Nodule	205	218	231	235	202	184	178	171

생육기와 생육휴지기에 근류 및 뿌리의 질소함량에 큰 변이가 없었고, 오리나무의 근류와 뿌리에 비하여 두배 이상의 함량을 유지하였다(Song and Monsi 1974).

일반적으로 근류를 형성하는 식물에서 근류의 총질소함량은 콩과식물인 싸리와 대두에서 각각 6.8~4.2%와 7.0~5.4%를 나타내었고(Song and Monsi 1974, Song *et al.* 1987), 비콩과의 근류식물인 소키나무(*Myrica gale*)와 물오리나무(*Alnus incana*)에서는 각각 2.4 ± 0.3%와 4.2

± 3.3%로서 낮은 함량이었다(Schwintzer and Tjepkema 1983). 함수량은 잎, 줄기, 뿌리 및 근류에서 각각 365~133, 154~81, 195~102 및 235~172%의 범위에서 생육후기에 감소하는 변화를 보였다.

적 요

우리나라 각지의 산림생태계에서 중요한 식생구성종이며 비공과의 근류형성 식물인 보리수나무의 자연식생에 대하여 생육기간중 질소고정 활성의 계절변화와 식물체 및 근권 환경의 변화를 정량적으로 분석하였다. 근류는 다년생으로서 지상부의 생장이 시작하는 4월중에 활성이 나타나서 6월 초순과 9월 중순에 각각 133 및 145 $\mu\text{M} \cdot \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{gfw}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 극대치를 보였고, 고온다우기인 6월 중순에서 8월말 사이에는 10~30%의 활성저해를 보였으며 생육휴지기인 겨울에는 활성이 없었다. 최적활성의 환경조건은 온도 30°C, pH 7 및 산소농도 16kpa였으며, 정오경에 최고치와 자정경에 최저치로 되는 일변화를 보였다. 식물체의 총질소함량은 근류, 잎, 뿌리 및 줄기의 순위로 높았고, 평균치가 42.5~40.1, 40.2~36.3, 30.3~28.6 및 18.4~16.2 mgN gdw^{-1} 의 범위였다. 근권토양의 환경은 약한 산성이었으며, NO_3^- , NH_4^+ 및 PO_4^{3-} 의 농도 및 함수량은 각각 48.3~79.6ppm, 5.1~13.9ppm 및 4.4~9.9 μM 및 14.5~39.4%의 범위에서 계절변화를 보였다.

인용문헌

- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- Caetano-Anolles, G., A. Lagares and G. Favelukes. 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa root. Dependence on divalent cations and pH. Plant and Soil 117:67-74.
- Castro, B.D., F.Y. Aranda and M.F. Schmitz. 1990. Acetylene reducing activity and nitrogen inputs in a bluff of *Elaeagnus angustifolia* L. Org. Sist. 5:85-90
- Franson, M.A.H. 1985. Standard methods for the examination of water and waste water. APHA 16th ed. pp.379-450.
- Guerin, V., J.C. Trinchant and J. Rigaud. 1990. Nitrogen fixation (C_2H_4 reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. Plant Physiol. 92:595-601.
- Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, E.K. Jackson and R.C. Burns. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5:47-81.
- Hartman, A., H. Fu, S.D. Song and R.H. Burris. 1985. Comparison of nitrogenase regulations in *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* and *A. amazonense*. In *Azospirillum* III (Klingmuller ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp.116-128.
- Hensley, D.L. and P.L. Carpenter. 1979. The effect of temperature on N_2 fixation (C_2H_2 reduction) by nodules of legumes and actinomycete nodulated woody species. Bot. Gaz. 140:558-564.

- Hiscox, J.D. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Hong, S.J. and S.D. Song. 1990. Symbiotic nitrogen fixation activity and environmental factors of *Robinia pseudoacacia* L. *Kor. J. Ecol.* 13:93-100.
- Huss-Danell, K., P.O. Lunquist and A. Ekblad. 1989. Growth and acetylene reduction activity by intact plants of *Alnus incana* under field conditions. *Plant and Soil* 118:61-73.
- Huss-Danell, K., L.J. Winship and A.S. Hahlin. 1987. Loss and recovery of nitrogenase in *Alnus incana* nodules exposed to low oxygen and low temperature. *Physiol. Plantarum* 70:355-360.
- Kim, B.I. and S.D. Song. 1992. Changes of nitrogen fixation activity and environmental factors of growth in *Lespedeza bicolor* Turcz. *Kor. J. Bot.* 35:317-322.
- King, B.J., S. Hunt, G.E. Weagle, K.B. Walsh, R.H. Pottier, D.T. Cavin and D.B. Layzell. 1988. Regulation of O₂ concentration in soybean nodules observed by *in situ* spectroscopic measurement of leghemoglobin oxygenation. *Plant Physiol.* 87:296-299.
- Kohls, S.J. and D.D. Baker. 1989. Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. *Plant and Soil* 118: 171-179.
- Mackay, J., L. Simon and M. Lalonde. 1987. Effect of substrate nitrogen on the performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* clones inoculated with Sp⁺ and Sp⁺ *Frankia* strains. *Plant and Soil* 103:21-31.
- Pizelle, G. 1984. Seasonal variations of the sexual reproductive growth and nitrogenase activity (C₂H₂) in mature *Alnus glutinosa*. *Plant and Soil* 78: 181-188.
- Rainbird, R.M., C.A. Atkins and J.S. Pate. 1983. Diurnal variation in the functioning of cowpea nodule. *Plant Physiol.* 72:308-312.
- Schwintzer, C.R. and J.D. Tjepkema. 1983. Seasonal pattern of energy use, respiration and nitrogenase activity in root nodules of *Myrica gale*. *Can. J. Bot.* 61:2937-2942.
- Song, S.D. and M. Monsi. 1974. Studies on the nitrogen and dry-matter economy of a *Lespedeza bicolor* var. *japonica* community. *Journ. Fac. Sci. Univ. Tokyo III.* 11:283-332.
- Song, S.D., S.J. Kim and Y.S. Choo. 1987. Effects of nitrate gradients on growth and nitrogen economy of soybean plant. *Korean J. Ecol.* 10:175-185.
- Sundström, K.R. and K. Huss-Danell. 1987. Effects of water stress on nitrogenase activity in *Alnus incana*. *Physiol. Plantarum* 70:342-348.
- Troelstra, S.R., T. Blacquièrre, R. Wagenaar and C. Van Dijk. 1987. Ionic balance, proton efflux, nitrate reductase activity and growth of *Hippophae rhamnoides* L. spp. *rhamnoides* as influenced by combined-N nutrition or N₂ fixation. *Plant and Soil* 103:169-183.
- Weisz, P.R., R.F. Denison and T.R. Sinclair. 1985. Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. *Plant Physiol.* 78:525-530.
- Winship, L.J. and J.D. Tjepkema. 1985. Nitrogen fixation and respiration by root nodules of *Alnus rubra* Bong. : Effects of temperature and oxygen concentration. *Plant and Soil*

87:91-107.

Zitzer, S.F. and J.O. Dawson, 1989. Seasonal changes in nodular nitrogenase activity of *Alnus glutinosa* and *Elaeagnus angustifolia*. *Tree Physiol.* 5: 185-194.

(1993년 4월 28일 접수)