

## 알팔파의 예취 후 재생시 저장질소의 재이동과 목부 삼출액의 분석

金 太 桓 · Boucaud Jean\*

(경상대학교 농과대학 축산진흥연구소, \*Caen대학교 응용생물학연구소)

### Remobilization of Nitrogen Reserves and Analysis of Xylem Exudate during Regrowth of Alfalfa (*Medicago sativa*)

Kim, Tae-Hwan and Boucaud Jean\*

(Department of Livestock Prod., Gyeongsang National University, Korea and

\*Lab. of Plant Physiology and Biochemistry, I.R.B.A., Univ. of Caen,

14032 Caen Cedex, France)

#### ABSTRACT

Experiments with non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Europe) plants grown in hydroponic culture, were carried out to estimate the remobilization of nitrogen (N) reserves and to investigate the transported forms of reduced soluble-N in xylem during regrowth following shoot removal. Endogenous N remobilization were estimated by  $^{15}\text{N}$  labelling and amino acids in xylem sap were analysed. The  $^{15}\text{N}$  contents of regrowing leaves and stems increased as a result of remobilization of N reserves mainly from root system. Regrowing leaves were a stronger sink than regrowing stems, with about two-thirds of remobilized  $^{15}\text{N}$  being recovered in leaves. Endogenous N in lateral roots accounted for about 46% of the total N reserves used for regrowth, while tap roots accounted for 23%. About 72% of total endogenous N remobilized to regrowing shoot, occurred during the first 10 days of regrowth. The outflow of reduced soluble-N (mainly amino acids) was greater than that of protein-N, while the latter was the largest storage pool in tap root and lateral roots. It is suggested that amino acids-N was the most readily available form of N reserves. Asparagine, which represented about 75% of amino acids-N in xylem sap, was the main transported form of reduced N. Its relative contents, during the first 10 days of regrowth, decreased from 75% to 59%. This decline was accompanied by compensatory increase in the relative contents of aspartate and glutamine.

#### 서 론

몇 종의 작물에 한정되어 보고되었지만 식물체내의 저장질소의 내부적 순환은 일반화되어 있는 생리적 현상으로 받아들여 진다 (Cooper *et al.*, 1986; Jescke *et al.*, 1985; Larsson *et al.*, 1991; Simpson *et al.*, 1982). 특히 알팔파와 같은 다년생 사료작물의 경우 예취-재생의 순환과정을 거치게 됨으로 예취 후 재생기의 식물체내의 질소의 내부적 순환에 대한 생리와 물질대사에 대한 이해는 작물관리와

이용을 효율화시킬 것이다.

예취 후 대사생리적 반응에 대한 많은 연구들은 탄소 대사와 공중질소고정에 중점적으로 이루어져 왔다. *Medicago sativa* (Vance *et al.*, 1979; Cralle and Heichel, 1981; Groat and Vance 1981; Macdowall, 1983; Ta *et al.*, 1990) 와 *Trifolium repense* (Gordon and Kessler, 1990) 와 같은 콩과작물의 경우, 광합성조직의 예취는 nitrogenase 활력을 급격히 유발시키며, 초기 재생기 동안 예취 후 잔여기관 (뿌리와 그루터기) 내의 비구조성 탄수화물을 감소시킨다

(Smith and Silva, 1969; Constable *et al.*, 1977; Rapport and Travis, 1984). 저장탄수화물은 일반적으로 3가지 경로(뿌리 성장, 잎과 줄기의 호흡 및 재생기관으로의 전이)로 이용되어지는데, *Medicago sativa*에 대한  $^{14}\text{C}$  labelling에 의한 연구에서 재생초기 2주 후 뿌리내에 저장된 탄수화물의 재생부위로의 전이에 대한 직접적 증거를 제시하였다(Caldwell *et al.*, 1984; Dufour *et al.*, 1987). 최근 Ta 등(1990)은  $^{15}\text{N}$ 과  $^{14}\text{C}$ 의 이 중 labelling에 의해 재생초기 2주 동안 뿌리 조직내 저장질소와 탄수화물의 각각 25%와 12%가 지상부위로 전이되었음을 평가하면서, 이들 저장유기물의 재이동은 재생초기가 중요하다고 하였다. 한편,  $^{15}\text{N}$ 에 의한 지상부위의 재생에 이용된 저장질소의 재이동을 양적 평가한 바 있으며(Ourry *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1983), 최근 Kim 등(1991)은 지상부위의 예취는 저장질소에 대한 식물체내 sink-source 관계를 변화시키며, 재생초기 동안 source 기관으로부터 유기질소의 이동이 촉진된다고 하였다. 대부분의 고등식물들은 뿌리로부터 지상부위로 유기질소를 주로 amide나 ureides 형태로 운반한다(See reviews by Pate, 1980; 1989). 이동되어지는 유기질소의 주요형태는 대개 식물의 종에 따라 특색화를 보이며, xylem sap의 아미노산 조성 및 함량은 질소의 공급형태 및 수준에 의해 영향을 받는 것으로 사료된다. Allen과 Smith(1986)은 xylem sap의 asparagine: glutamine 비율은 무기질소의 공급형태에 따라 변화한다고 하였고, Kirkman과 Mifflin(1979) 및 Kosnitschek-schinell(1985)은 질소비료의 시비 수준에 의해 영향을 받는다고 하였다. Bigot 등(1991)은 *Lolium perenne*의 예취에 의해 변화된 질소에 대한 source-sink 관계는 재생 중 xylem sap내의 asparagine: glutamine 비율의 변화와 밀접한 관계가 있다고 했다. 한편, 콩과작물에서도 질소공급원(People *et al.*, 1987), 혹은 근류균의 활성효율(Rosendahl and Jacobsen, 1987)에 따른 아미노산 조성 및 함량의 변화에 대해 보고된 바 있으나, 예취 후 재생이 진행됨에 따른 저장질소의 재이동에 대한 양적 평가와 저장 및 이동형태에 대한 생화학적 분석에 대한 정보가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 근류균을 형성하지 않은 알팔파의 재생시 잔여기관내 저장되어 있던 총질소 및 질소화합물의 이동을  $^{15}\text{N}$  labelling에 의해 양적 평가하고, xylem sap의 아미노산 조성 및 함량을 분석하여 xylem을 통한 유기질소의 이동형태를 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**재배 및 실험설계.** 알팔파 종자(*Medicago sativa* L. cv. Europe)를 sand bench에서 받아서, 3엽기에 달한 묘묘를 9 L들이 pot당 15주씩 이식하여 수경재배하였다.

사용된 영양용액의 조성 및 농도는 Kim 등(1991)에 따랐으며, pH를 안정화시키기 위해서 2 mM의  $\text{CaCO}_3$ 를 매 영양용액 교환시(5일 간격) 첨가해 주었다. Glass house는 주/야간, 온도(23/18°C) 그리고 광주기(16/8 h)를 전 시험기간 중 균일하게 조절해주었고, 형광 phyton 튜브에 의해  $150 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 자연광을 보충해 주었다.

개화 초기에 달했을 때 주근으로부터 6 cm 높이에서 1차 예취를 실시하고 1차 재생 14일째부터 1 mM의  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  ( $^{15}\text{N}$  excess=12.57%)를 10일간 labelling하였다. 예취구의 경우 2차 예취를 실시하고 예취일을 재생 0일로 하고, 재생 후 6, 10, 14 그리고 24일에 각각 수확하였고 비예취구(대조구) 예취를 하지 않고 예취일을 기준 0 및 24일에 각각 수확하였다. 수확된 식물들은 주로 지근·그루터기에 잔재된 잎과 줄기 그리고 재생된 잎과 줄기의 6개 부위로 분리하여, 60°C에서 48시간 건조·분쇄하여 시료를 준비한 후 차후 분석을 위해  $\text{CaCl}_2$  존재하의 진공상태에 보관하였다.

**화학적분 및 동위원소 분석.** Total N의 측정에는 200 mg의 시료를 salicylic acid에 의해 nitrate를 환원시킨 후 (Eastin, 1978), Kjeldahl mineralization시키고, Conway dish에서 18 h 동안 microdiffusion 후에 수기된  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 Nessler 용액(Sigma, Ammonia color reagent)과 반응시킨 후 UV spectrophotometer를 사용, 410 nm에서 ammonium 함량을 측정하였다.

질소화합물의 추출은 200 mg의 시료를 Pace 등(1982)의 방법에 따라 증류수-ethanol-chloroform의 혼합용액을 사용하여 추출 분리하였다. 분리된 ethanol 액상을 농축 후 Dowex 50 H<sup>+</sup> column을 통과시켜 Yoneyama 등(1978)의 방법에 따라 질산態 질소와 아미노산態 질소로 분리시켰다.

Chloroform 액상은 ethanol 비가용성 N과 합하여 단백질態 질소분석에 사용되었다. 분리된 각 질소화합물을 농축한 후 Kjeldahl procedure에 의해 mineralization시킨 후 total N 분석과정에 의해 측정하였다. UV spectrophotometer 측정 후 남은  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액에  $\text{CuO}$ 를 첨가 550°C에서 Dumas 반응에 의해 분자성의 질소로 환원시켜서(Guiraud and Fardeau, 1980), emission spectrometer(Sopra. Gsi. FRANCE)에서  $^{15}\text{N}$ 의 excess를 측정하였다.

**N flows의 계산 방법.** 재생기간 dt 중 외관상 질소함량의 변화(dN/dt)는 질소의 유입과 유출간의 차이로서 결정할 수 있다.

$$dN/dt = N_{inflow} - N_{outflow} = N_{t+dt} - N_t \quad (1)$$

여기에서  $N_t$ 와  $N_{t+dt}$ 는 각각 재생일 t와 t+dt에서의 질소함량을 각각 나타낸다.

재생기간 dt 동안 영양용액으로부터 유입된 질소함량( $N_{inflow}$ )은  $^{14}\text{N}$ 의 유입에 따른  $^{15}\text{N}$ 의 회석에 의해 계산할 수

있다.

$$N_{\text{inflow}} = N_{t+dt}(1 - E_{t+dt}/E_t) \quad (2)$$

여기에서  $E_t$ 와  $E_{t+dt}$ 는 각각 재생일  $t$ 와  $t+dt$ 에서 측정된  $^{15}\text{N}$  excess를 나타낸다.

재생기간  $dt$  동안 질소의 재이동에 해당하는 저장기관으로부터 유출된 질소합량( $N_{\text{outflow}}$ )은 방정식 (1)로부터 유도되어질 수 있다.

$$N_{\text{outflow}} = N_t - N_{t+dt} + N_{\text{inflow}} \quad (3)$$

방정식 (2)를 대입하여 다시 정리하면

$$N_{\text{outflow}} = (N_t \cdot E_t - N_{t+dt} \cdot E_{t+dt})/E_t \quad (4)$$

여기에서( $N_t \cdot E_t - N_{t+dt} \cdot E_{t+dt}$ )는 재생기간  $dt$  동안 변화된  $^{15}\text{N}$  함량에 해당한다.

**Xylem sap 채취와 아미노산 분석.** Xylem sap의 채취는 지근상단부를 절단 후 진공펌프를 연결 흡입에 의해 일출 3시간 후에 시작하여 sap의 유출 정도에 따라 2~3 시간 동안 30분 간격으로 채취하였다. 절단면으로부터 오염을 배제하기 위해 유출되는 초기 몇 방울의 sap은 버리고, 채취된 sap는 청량하고,  $-20^\circ\text{C}$  동결 보관하였다. 본 시험에 앞서 채취방법에 대한 예비시험 결과는 i) 3시간 동안 30분 간격으로 연속적으로 채취된 시료들 간에 ii) 진공펌프에 의한 흡입에 의해 채취된 시료와 줄기절단 후 유출되는 sap으로부터 얻은 시료간에 아미노산 조성과 함량에 있어 유의적인 차이가 없음을 보여주었다. 따라서 분석에 필요한 충분한 양의 sap을 확보치 못했을 때 진공펌프 흡입에 의해 3시간까지 채취가능하다고 사료된다.

동결보관된 sap 삼출물을 상온에서 해빙시킨 후  $0.45 \mu\text{M}$  Acrodisc 필터(Gelman Science)에 의해 여과해서 얻은 aliquots( $250 \sim 5000 \mu\text{L}$ )를  $\text{H}^+$  Dowex 50 column을 통과시키고  $7.5 \text{ mL}$ 의 HPLC급 물로서 평균다음  $7.5 \text{ mL}$ 의  $6.0 \text{ M}$   $\text{NH}_4\text{OH}$ 로서 아미노산을 elusion시켰다. 얻어진 eluate를 동결 건조시킨 후  $2 \text{ mL}$ 의 물로서 용해시킨 후  $100 \mu\text{L}$ 의 aliquots를 derivation buffer  $300 \mu\text{L}$ (acetonitrile, pyridine, triethylamine; 10/5/2; v/v/v)와 혼합한 후 phenylisothiocyanate( $20 \mu\text{L}$ )로서 derivation하였다. 준비된 시료를 동결 건조시켜 보관 혹은 Lefevre 등(1989)의 방법에 따라 HPLC에 의해 분석하였다.

### 결 과

예취전 10일간  $^{15}\text{N}$  labelling에 의해 잔여기관(뿌리와 그루터기)에 축적된  $^{15}\text{N}$ 의 예취 후 재생기간 중 재이동을 Fig. 1에서 나타내었다. 예취일의 잔여기관내 총  $^{15}\text{N}$  함량은  $870 \mu\text{g N} \cdot \text{plant}^{-1}$ 이었는데, 재생기간 중 식물체내 총  $^{15}\text{N}$

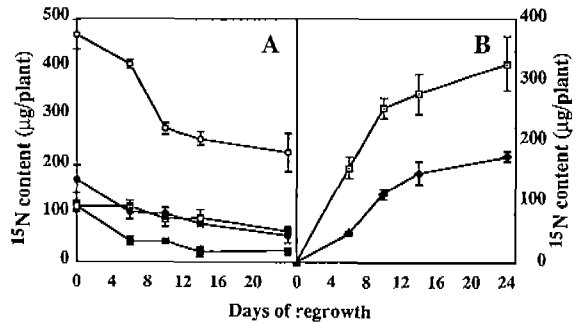


Fig. 1. Changes in amounts of  $^{15}\text{N}$  excess over 24 days of regrowth in total remaining tissue (A): lateral roots (○); tap root (●); stems (□) and leaves (■) of crown; and in (B): regrowing stems (◆) and leaves (◐). Each value is the mean  $\pm$  S.E. for  $n=3$ .

함량의 평균은  $876 \pm 40 \mu\text{g}$ 으로,  $^{15}\text{N}$ 의 손실이 없었음을 보여주었다. 재생 24일 동안  $^{15}\text{N}$  함량은 모든 잔여기관에서 유의적으로 감소하였는데, 각 잔여기관간에 비교할 때 재생 24일간  $^{15}\text{N}$  함량의 변화는 뿌리(지근과 주근)가 그루터기에서 보다 높았다. 이 기간 중  $^{15}\text{N}$  함량의 주요 감소는 주근(68%)과 지근(52%)에서 뚜렷하여, 저장질소의 공급기관으로서 중요성을 보여주었다(Fig. 1A). 예취 후 잔여기관내의  $^{15}\text{N}$ 의 감소량은 재생기관(일과 줄기)으로 전이된  $^{15}\text{N}$  함량에 해당되었다. 총 재이동된  $^{15}\text{N}$ 의 2/3 정도가 잎으로, 나머지가 줄기로 분포되어 잎이 줄기보다 저장질소에 대한 수용력(sink strength)이 높다는 것을 보여주었다. 한편, 재생초기 10일 동안 일과 줄기내의  $^{15}\text{N}$  함량이 급격히 증가하다가 이후부터 완만한 증가폭을 보였다. 이러한 결과는 내인성질소(저장질소)의 지상부위로의 전이는 재생초기 10일 동안 특히 활발하게 일어난다는 것을 알 수 있다(Fig. 1B).

재생 24일 동안 재생기관(일+줄기)내 축적된 총 질소 함량과 재생기관 중 각 기관내의  $^{15}\text{N}$  함량에 기준하여 재료 및 방법에서 나타낸 유입 및 유출된 질소합량에 의해 평가한 각 저장기관으로부터 전이된 질소합량과 무기질 질소의 흡수력을 Fig. 2에 나타내었다. 재생 24일 동안 재생기관으로 전이된 총 저장질소의 69%가 뿌리조직(주근, 23%; 지근, 46%)으로부터 공급되었다(data not shown). 초기 10일 동안 저장질소의 총 전이량은 일당  $7.5 \text{ mg N} \cdot \text{plant}^{-1}$ 이었는데, 이는 같은 기간 동안 흡수된 총 무기질 질소 함량( $2.5 \text{ mg N} \cdot \text{plant}^{-1}$ )보다 3배 이상 높은 질소공급량에 해당된다. 저장질소의 전이가 재생초기 10일 동안 일과 줄기의 재생을 위한 주요 질소공급원이었다. 한편, 재생 10일 이후 무기질 질소의 흡수에 의한 질소공급이 급격히 증가하여 재생 24일에 일과 줄기에 축적된 총 질소합량의 68%가 무기질 질소의 흡수에 의해 공급되었다.

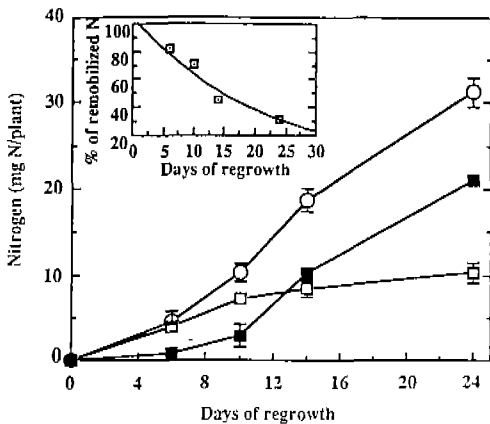


Fig. 2. Total nitrogen increment (○) in regrowing shoots derived from mineral nitrogen (■) or from remobilization (□) by the remaining organs over 24 days of regrowth. Inset give the amount of remobilized nitrogen to regrowing shoots as a proportion of total nitrogen content. Each value is the mean±S.E. for n=9.

Fig. 2의 삽입 그래프는 재생 24일 동안 재생기관내 축적된 총 질소함량에 대한 전이된 저장질소 함량의 백분율을 나타낸 것이다. 재생초기 6일 동안 재생 중인 잎과 줄기내 축적된 총 질소함량의 약 81%가 저장질소의 전이에 의한 것이고, 재생이 진행됨에 따라 저장질소의 전이가 감소하여 재생 24일에는 총 질소함량의 30%를 공급하였다.

재생 24일 동안 재생기관의 건물량과 총 질소함량의 상관관계와 각 질소공급원의 이용성도를 Fig. 3에 나타내었다. 지상부위의 재생수량이 개체당 0.4g 이하(약 재생 10일째)인 초기 재생기간 동안 저장질소가 지상부위의 재생에 필요한 질소의 주요 공급원이 되었는데 예취 후 감

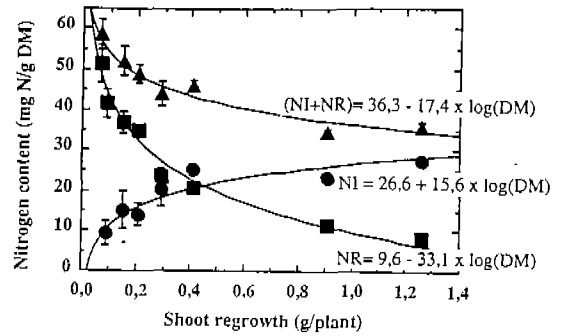


Fig. 3. Relationship between dry matter and total nitrogen accumulated (NI+NR: ▲) derived from mineral nitrogen (NI: ●) or remobilization (NR: ■) in regrowing shoots. The correlation coefficients for all drawn curves were always higher than 0.97. Each value is the mean±S.E. for n=9.

소된 무기질 질소의 흡수력에 기인된 낮은 외인성 질소의 잎과 줄기로의 전이는 예취 후 잔여기관내에 저장되어 있던 질소의 전이에 의해 보상되어졌다. 지상부위의 재생수량이 개체당 0.4g 이상부터는 무기질 질소의 전이가 잎과 줄기의 재생에 주요한 공급원이 되었다. 무기질 질소와 저장질소의 전이의 합인 재생기관내의 총질소함량은 재생수량이 증가함에 따라 건물 1g당 60 mg N에서 40 mg N 이하로 감소하여, 재생이 진행됨에 따라 잎/줄기 비율의 감소에 의한 질소회색 현상을 보였다.

저장질소의 이동량이 높은 초기재생 10일 동안, 총 저장질소의 약 2/3를 공급하는 주근과 지근내의 건물 1g당 가용성 환원질소(amino-amide태 질소) 및 단백질태 질소의 함량 및 <sup>15</sup>N 함량을 Table 1에 나타내었다. 재생초기 10일 동안 주근과 지근내의 단백질태 및 가용성 환원질소의 함

Table 1. Changes of the apparent and real mobilized size of N-fractions (Protein-N, SR-N: soluble reduced nitrogen) in tap roots and lateral roots during the first 10 days of regrowth, following removal of shoots. Each value is the mean±S.E. for n=9

Nitrogenous fractions	Days of regrowth (days)	N (μg N·plant <sup>-1</sup> )	Apparent (%)	<sup>15</sup> N (μg N·plant <sup>-1</sup> )	Real (%)
Tap root					
protein-N	0	2293±25.2		76.4±9.6	
	10	1651±148.1	28.0±2.8	50.0±8.8	35.1±2.9
SR-N	0	844±117.8		40.0±8.0	
	10	4511±61.9	46.6±6.4	17.1±3.6	57.2±4.4
Lateral roots					
protein-N	0	6016±802.7		226.5±21.0	
	10	4394±292.8	26.9±1.6	168.7±28.3	25.5±2.5
SR-N	0	1521±395.7		67.4±16.0	
	10	1024±124.0	32.7±4.9	31.2±4.3	53.7±2.9

Table 2. Relative amino acid composition (molar %) in xylem sap of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants fed  $NH_4NO_3$ . Exudates were collected from 3 plants at early flowering stage. The results represent either the average of duplicate analysis or the means  $\pm$  S.E. (n=3)

Composition	% of total amino acids (molar basis)
Asparagine	74.6 $\pm$ 1.44
Glutamine	8.6 $\pm$ 1.10
Asparatate	2.8 $\pm$ 0.48
Glutamate	1.3 $\pm$ 0.27
Glycine	0.8 $\pm$ 0.02
Histidine	0.3 $\pm$ 0.05
Proline	2.6 $\pm$ 0.46
Serine	2.7 $\pm$ 0.43
Threonine	1.5 $\pm$ 0.49
Alanine	2.8 $\pm$ 0.66
Valine	1.9 $\pm$ 0.45

량이 유의적으로 감소하였는데, 주근의 경우 N 함량의 자이에 의한 단백질태와 아미노산태 질소의 외관상 이동은 각각 28.0%와 46.6%이었고, 동위원소  $^{15}N$  함량의 차이에 의한 실질적 이동은 각각 35.1%와 57.2%이었다. 지근에서도 재생초기 10일간, 외관상 및 실제적 이동에 있어 주근에서와 비슷한 비율로 단백질태와 아미노산태 질소의 이동을 보였다(Table 1). 주근과 지근에서 공히 아미노산태 질소 함량의 외관상 및 실제적 이동이 단백질태 질소보다 훨씬 높았으나, 예취일(0일)의 단백질태 질소의 함량은 주근과 지근에서 건물 1g당 각각 14.33과 23.77 mg N으로 아미노산태 함량(5.33과 5.87 mg N)에 비해 2.7과 4.1배 높았다. 이러한 결과들은 단백질태 질소가 주요 저장질소의 형태이나, 아미노산태 질소형태의 이동이 우선적으로 일어난다는 것을 보여준다.

예취일(0일)에 채취한 xylem sap의 아미노산 조성 및 함량을 Table 2에 나타내었다. Asparagine이 총 아미노산 함량의 74.6%로서 xylem을 통한 환원질소의 주요 이동형태임을 보여주었고, Glutamine이 8.6%였고, 그의 아미노산들은 총아미노산 함량의 3%를 넘지 못했다.

Fig. 4는 재생이 진행됨에 따른 xylem sap내 주요 아미노산 함량의 변화를 나타낸 그래프이다. 재생초기 10일 동안 asparagine의 상대적 함량은 74.6%에서 59%로 감소하였으며, 이 시기 동안 asparagine의 감소는 asparatate, glutamine, glutamate, proline 및 alanine 등의 아미노산의 증가를 동반하였다. 재생 14일째부터 xylem sap내 asparagine의 재충진을 보였는데, 14일째 그 함량은 초기수준(0일)의 약 73%의 수준이었다.

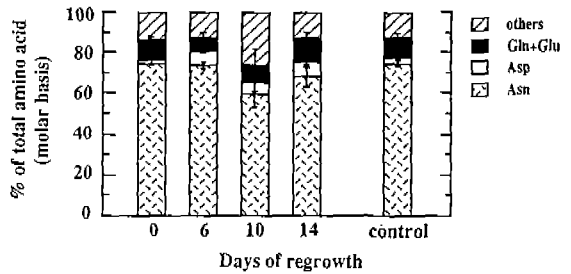


Fig. 4. Changes in relative molar composition (molar %) of amides and amino acids in xylem sap of non-nodulated *Medicago sativa* L. during regrowth. Values for control plant (uncut) are shifted on the right of the scheme and refer to data obtained for the 10th day. Each value is the mean  $\pm$  S.E. for n=3. "Others" is for: glycine, histidine, proline, serine, threonine, alanine and valine.

고찰

예취 전 잔여기간내에 축적된  $^{15}N$ 의 함량은 재생이 진행됨에 따라 지속적으로 감소하여 재생 24일차의  $^{15}N$  함량은 예취일(0일)의 약 50%로 감소한 반면, 상대적으로 재생기간내의  $^{15}N$  함량은 증가하였다. 저장질소로부터 잎과 줄기로  $^{15}N$ 의 전이는 재생초기 10일 동안 가장 높았다(Fig. 1).

재생초기 10일 동안 재생부위로 전이된 총 저장질소의 함량은 재생 11일부터 24일까지 전이된 함량보다 약 3.6배 높아 재생초기의 저장질소의 높은 이용을 확인할 수 있었으며, 무기질 질소의 흡수량은 재생초기 10일 동안 낮은 수준(일당 250  $\mu g$ )이었다가 이후 높은 증가를 보여 재생 중인 잎과 줄기에 대한 주요 질소공급원이 되었다(Fig. 2).

이러한 결과들은 재생초기에 예취 후 잔여기관내 저장 질소가 잎과 뿌리의 재생을 재개하는데 요구되는 질소의 주요 공급원이 된다는 것을 보여준다. 뿌리나 그루터기에 저장되어있던 질소의 재생시 재이동에 대한  $^{15}N$  labelling에 의한 본실험의 결과는 *Bromus mollis*, *Trifolium subterraneum*(Phillips et al., 1983) *Lolium perenne*(Ourry et al., 1988;1990) 및 *Medicago sativa*(Kim et al., 1991) 등의 사료작물에서 보고된 결과들을 잘 확인해 준다.

지상부위의 예취는 저장질소에 대한 각 기관의 source-sink 관계를 변화시키며(Kim et al., 1991) 저장질소의 재이동을 촉진시킨다(Kim et al., 1993b). 한편, 지상부위의 광합성 조직의 예취는 무기질 질소의 흡수(Jaris and Macduff, 1989; Ourry et al., 1990)나 공중질소고정력(Vance et al., 1979; Davidson et al., 1990; Gordon et al., 1990, Kim et al., 1993a)을 현저히 감소시키는데, 이러한 무기질

질소의 흡수활력과 질소고정력의 감소는 nitrate reductase (Boucaud and Bigot, 1989) 또는 nitrogenase (Vance *et al.*, 1979; Cralle and Heichel, 1981; Macdowall, 1983) 같은 관련된 효소활력의 저하와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. Gordon과 Kessler(1990)는 예취 후 *Trifolium repense*의 뿌리내 sucrose와 carboxylic acid 대사와 관련된 효소들의 활력이 모두 억제되었다고 하였으며, 재생초기 2주일 동안 이들 활력을 지지하기 위한 광합성 산물이 재생되는 광합성 조직으로부터 충분히 공급할 만큼 재생이 진행되지 못한다고 했다.

뿌리내 저장질소의 주요형태는 단백질태와 아미노산태 질소이며 재생초기 10일 동안 각각 약 39%와 59%의  $^{15}\text{N}$ 이 함량이 감소되었다. 단백질태 질소가 저장형태로서의 양적인 우위를 보이나, 이 기간 중 이동율은 아미노산태 질소가 높았다(Table 1). Ourry(1989a) 등은 *Lolium perenne*에서 예취 후 뿌리와 그루터기내의 질소의 이동이 증가하였으며, 주요 질소화합물 중 아미노산태 및 단백질태 질소의 감소가 뚜렷하였다고 하였다. Constable 등(1977), Hendershot와 Volenec(1992) 등도 *Medicago sativa*의 주요 저장질소형태는 단백질태라고 보고한 바 있다. Ourry 등(1989b) *Lolium perenne*의 초기재생 4일 동안 뿌리 및 그루터기에서의 단백질태 질소가 감소한 반면, 잎에서 증가한다고 보고하였고, Bradley와 Volenec(1992)은 *Medicago sativa*의 재생 28일 동안 63%의 단백질함량의 감소를 보고하였다. Gordon과 Kessler(1990)는 예취 후 일주일 동안 endopeptidase 활력이 증가했다고 하였다. 본 시험의 결과와 이들 결과들은 예취 후 저장기관에서 단백질 분해가 촉진되고, 지상부위 재생에 이용된다는 것을 보여준다.

Xylem을 통한 환원질소의 주요 이동형태는 asparagine이며, 재생초기 10일간 asparagine의 함량은 21%로 감소를 했다가 14일째는 초기수준(예취일)의 88%까지 회복하였다(Table 2와 Fig. 4). 재생초기 10일간 xylem sap의 아미노산 함량은 예취일의 약 25% 수준으로 감소하였는데(Kim *et al.*, 1993b), 이는 예취 후 감소된 무기질 질소 흡수에 의해 가용성 이동량이 절대적 감소와 xylem내의 환원질소의 총진이 감소되었기 때문으로 사료된다.

Asparagine의 상대적 함량이 초기 10일 동안 감소가 xylem내 아미노산 총진량 또는 질소원의 공급형태( $\text{N}_2$ , 무기질 질소, 내인성질소)에 의한 것인지 본 시험의 결과만으로는 확실치 못하며, 재생 중인 알팔파의 xylem sap의 아미노산 조성에 대한 정보는 매우 미흡하다. 한편, 재생 24일 동안 재생이 진행됨에 따라 xylem sap내 아미노산 구성은 asparagine의 상대적 함량이 유의적으로 감소하였는데, 재생초기 10일 동안 초기수준에서 약 16%까지 감소하였으며, glutamine과 asparatate의 상대적 함량의 보상적 증가를 보였다.

본 시험의 결과들은 예취 후 잔여기관내 저장질소가 재생을 재개하는데 있어 주요 질소공급원으로 예취 후 초기 재생기간 동안 재생 중인 잎과 줄기내의 질소 축적은 내인성 질소의 동화산물에 의존하다가, 재생이 진행됨에 따라 외인성질소(mineral N과 공중질소 고정에 의한  $\text{N}_2$ )의 동화산물의 이용이 점점 높아짐을 보여준다. asparagine이 예취 후 재생기간 중 주요 공급질소의 형태와 관계없이 xylem을 통한 환원성 유기질소의 주요 이동형태이며, 예취에 의해 유래된 source/sink 관계의 변천은 xylem sap을 통한 아미노산 이동함량의 일시적 감소(예취 후 초기 10일 동안)와 아미노산 구성비율을 변화시키는 것으로 사료된다.

## 적 요

예취 후 재생시 저장질소의 재이동과 재생기관으로의 전이를 양적 평가하고 xylem을 통한 환원유기질소의 이동형태를 규명하기 위해 알팔파(*Medicago sativa* L. cv. Europe)를 수경재배하였다. 근류균을 형성하지 않은 알팔파에 예취 전  $^{15}\text{N}$  labelling을 실시하여 재생기간 중 각 기관내 분포된  $^{15}\text{N}$ 의 excess를 분석하고 xylem sap을 채취하여 아미노산의 조성 및 함량을 분석하였다.

예취 후 잔여기관내의  $^{15}\text{N}$  함량은 재생이 진행됨에 따라 유의적으로 감소하였고, 감소된  $^{15}\text{N}$ 은 질소의 전이에 의해 새로 재생되는 잎과 줄기에서 발견되었다. 저장기관으로부터 전이된  $^{15}\text{N}$ 의 약 2/3가 잎으로, 나머지가 줄기로 분포되어 잎이 줄기보다 저장질소에 대한 수용력(sink strength)이 높았다. 예취 후 재생초기 10일 동안 잎과 줄기의 재생에 이용된 무기질 질소의 함량은 낮은 반면, 이 기간 동안 총 저장질소의 약 72%가 잎과 줄기로 전이되었다. 재생이 진행됨에 따라 무기질 질소의 이용율은 점차 증가하였다.

재생초기 10일 동안 뿌리조직(주근과 지근)의 아미노산태 및 단백질태 질소함량은 유의적으로 감소하였다. 주근과 지근에서 공히 단백질태 질소함량이 아미노산태 질소함량보다 높았으나, 재생 10일 동안 전이된 비율은 아미노산태가 월등히 높았다. 이는 저장질소는 아미노산태로 우선적으로 이동하여 재생에 이용된다는 것을 보여준다. Asparagine이 xylem sap내 총 아미노산의 75%로서 환원태 유기질소의 주요 이동형태였다. 재생 10일 동안 asparagine의 상대적 함량은 59%까지 감소하였는데, 이러한 감소는 asparatate와 glutamine의 상대적 함량의 보상적 증가를 동반하였다.

## 참 고 문 헌

- Ricinus communis*: its effect on plant growth and the chemical composition of the whole plant, xylem and phloem saps. *J. Exp. Bot.* **37**: 1599-1610.
- Bigot, J., J. Lefevre and J. Boucaud. 1991. Changes in the amide and amino acid composition of xylem exudate from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) during regrowth after defoliation. *Plant Soil.* **136**: 59-64.
- Boucaud, J. and J. Bigot. 1989. Changes in the activities of nitrogen assimilation enzymes of *Lolium perenne* L. during regrowth after cutting. *Plant Soil.* **114**: 121-125.
- Bradley, S.R., J.J. Volenec. 1992. Metabolism of vegetative storage protein in alfalfa taproots. *Plant Physiol.* **99** (supp.): 96 (569).
- Caldwell, C.D., D.S. Fensom, L. Bordeleau, R.G. Thompson, R. Drouin and R. Didsbury. 1984. Translocation of <sup>15</sup>N and <sup>14</sup>C between nodulated roots and leaves in alfalfa seedlings. *J. Exp. Bot.* **35**: 431-443.
- Constable, G.A., K.P. Sheridan and A.C. Gleeson. 1977. Effects of sequential defoliation on luzerne (*Medicago sativa* L.). *Aust. J. Agric. Res.* **28**: 769-776.
- Cooper, D. and D.T. Clarkson, M.G. Johnson, J.N. Whiteway and B.C. Loughman. 1986. Cycling of amino-nitrogen between shoot and roots in wheat seedlings. *Plant Soil.* **91**: 319-322.
- Cralle, H.T. and G.H. Heichel. 1981. Nitrogen fixation and vegetative regrowth of alfalfa and birdfoot trefoil after successive harvests or floral debutting. *Plant Physiol.* **67**: 98-905.
- Davidson, I.A., R.A. Culvenor and R.J. Simpson. 1990. Effect of previous defoliation regime and mineral nitrogen on regrowth in white clover swards: photosynthesis, respiration, nitrogenase activity and growth. *Ann. Bot.* **65**: 665-677.
- Dufour, L., M. Faucher and G. Lemaire. 1989. Etudes des transferts d'assimilats entre tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.) par l'utilisation du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. *Agronomie* **9**: 377-382.
- Eastin, E.F. 1978. Total nitrogen determination for plant material containing nitrate. *Analy. Bioche.* **85**: 591-594.
- Gordon, A.J. and W. Kessler. 1990. Defoliation induced stress in nodules of white clover. *J. Exp. Bot.* **41**: 1255-1262.
- Groat, R.G. and C.P. Vance. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Physiol.* **67**: 1198-1203.
- Guiraud, G. and J.C. Fardeau. 1980. Détermination isotopique par spectrométrie optique de composés faiblement enrichis en azote 15. *Analysis* **8**: 148-152.
- Jarvis, S.C. and J.H. Macduff. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. *J. Exp. Bot.* **40**: 965-975.
- Jeschke, W.D., C.A. Atkins and J.S. Pate. 1985. Ion circulation via phloem and xylem between roots and shoot of nodulated white lupin. *J. Plant Physiol.* **177**: 319-330.
- Kim, T.H., A. Ourry, J. Boucaud and G. Lemaire. 1991. Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L.) following removal of shoots. *Aust. J. Plant Physiol.* **18**: 593-602.
- Kim, T.H., A. Ourry, J. Boucaud and G. Lemaire. 1993a. Partitioning of nitrogen derived from N<sub>2</sub> fixation and reserves in nodulated *Medicago sativa* L. during regrowth. *J. Exp. Bot.* **44**: 555-562.
- Kim, T.H., J. Bigot, A. Ourry and J. Boucaud. 1993b. Amino acid content in xylem sap of regrowing alfalfa (*Medicago sativa* L.): Relations with N uptake, N<sub>2</sub> fixation and N remobilization. *Plant Soil.* **149**: 167-174.
- Kirkman, M.A. and B.J. Mifflin. 1979. The nitrate content and amino acid composition of the xylem fluid of spring wheat throughout the growing season. *J. Sci. Food Agric.* **30**: 653-660.
- Larsson, C.M., M. Larsson, J.V. Purves and D.T. Clarkson. 1991. Translocation and cycling through roots of recently absorbed nitrogen and sulphur in wheat (*Triticum aestivum*) during vegetative and generative growth. *Physiol. Plant.* **82**: 345-352.
- Lefevre, J., J. Bigot and J. Boucaud. 1989. Composition en acides aminés libres des feuilles, des chaumes et des racines du ray-grass anglais. *C.R. Acad. Sci. Paris* **309**: 389-395.
- MacDowall, F.D.H. 1983. Kinetic of first-cutting regrowth of alfalfa plants and nitrogenase activity in a controlled environment with and without added nitrate. *Can. J. Bot.* **61**: 2405-2409.
- Ourry, A., J. Bigot and J. Boucaud. 1989a. Protein mobilization from stubble and roots and proteolytic activities during post-clipping re-growth of perennial ryegrass. *J. Plant Physiol.* **134**: 298-303.
- Ourry, A., J. Boucaud, J. Salette and M. Duyme. 1989b. Métabolisme de l'azote le ray-grass (*Lolium perenne* L.). Etude par marquage <sup>15</sup>N des remobilisation d'azote après une coupe. *Agronomie* **9**: 401-407.
- Pace, G.M., C.T. MacKown and R.J. Volk. 1982. Minimizing nitrate reduction during Kjeldahl digestion of plant tissue extracts and stem exudates. *Plant Physiol.* **69**: 32-36.
- Pate, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogen solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 313-340.
- Pate, J.S. 1989. Synthesis, transport and utilization of products of symbiotic fixation. In, Recent advances in phytochemistry, J.E. Poulton, Romeo, J.T. and E.E. Conn. (ed.). Vol. 23, Plenum Press, New York. pp. 66-115.
- Peoples, M.B., M.N. Sudin and D.F. Herridge. 1987. Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nit-

- rate fed amide exporting legumes. *J. Exp. Bot.* **38**: 567-579.
- Phillips, D.A., D.M. Center and M.B. Jones. 1983. Nitrogen turnover and assimilation during regrowth in *Trifolium subterraneum* L. and *Bromus mollis* L. *Plant Physiol.* **71**: 472-476.
- Rapport, H. and R.L. Travis. 1984. Alfalfa root growth, cambial activity and carbohydrate dynamics during the regrowth cycle. *Crop Sci.* **24**: 899-903.
- Rosendahl, L. and I. Jacobson. 1987. *Rhizobium* strain effects on pea: The relation between nitrogen accumulation, phosphoenolpyruvate carboxylase activity in nodules and asparagine in root bleeding sap. *Physiol. Plant.* **71**: 281-286.
- Rosnijschek-schimmel, I. The influence of nitrogen nutrition on the accumulation of free amino acids of root tissue of *Urtica dioica* and their apical transport in xylem sap. *Plant Cell Physiol.* **26**: 215-219.
- Simpson, R.J., H. Lambers and M.J. Dalling. 1982. Translocation of nitrogen in a vegetative wheat plant. *Physiol. Plant.* **65**: 11-17.
- Smith, D. and J.P. Silva. 1969. Use of carbohydrate and nitrogen root reserves in the regrowth of alfalfa from greenhouse experiments under light and dark conditions. *Crop Sci.* **9**: 464-467.
- Ta, T.C., F.D.H. MacDowall and M.A. Faris. 1990. Utilization of carbon and nitrogen reserves of alfalfa roots in supporting N<sub>2</sub>-fixation and shoot regrowth. *Plant Soil* **127**: 231-236.
- Vance, C.P., G.H. Heichel, D.K. Barnes, J.W. Bryan and L.E. Johnson. 1979. Nitrogen fixation, nodule development and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiol.* **64**: 1-8.
- Yoneyama, T. and C. Sano. 1978. Nitrogen nutrition and growth of the rice plant. II. Considerations concerning the dynamics of nitrogen in rice seedling. *Soil Sci. Plant Nutr.* **24**: 191-198.

(1993. 9. 8 接受)