

# 보리수나무 幼植物의 生長과 窒素固定 活性에 대한 環境要因의 影響

宋 承 達\* · 朴 泰 圭 · 安 正 善<sup>1</sup> · 金 俊 鎬<sup>1</sup>

慶北大學校 自然科學大學 生物學科, <sup>1</sup>서울大學校 自然科學大學 生物學科

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.) 유식물의 생육과정에서 근류 형성 및 질소고정 활성에 대한 중요 요인으로서 광도, 온도, 질소화합물, 수분 스트레스 등의 영향을 정량적으로 분석하였다. 유식물의 상대생장률과 T/R비는 각각 초기의 1.60%·d<sup>-1</sup>와 1.12에서 근류 형성이 촉진된 후기에는 3.75%·d<sup>-1</sup>와 2.31로 증가하였다. 질소고정의 비활성은 근류 형성 초기에 72.5 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>로서 최대치를 나타낸 후 점차 감소하였다. 상대조도 20-25, 10-15 및 4-6% 처리구의 질소고정 활성은 대조구에 대해 각각 41, 54 및 71%의 감소를 보였다. 근류를 15, 20, 25 및 30℃에서 배양할 때 활성은 각각 5.4, 24.7, 51.6 및 58.5 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>로 변화하였다. 저온(15℃)의 전처리 후 30℃로 옮겼을 때 근류 활성(66.5 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)은 고온(35℃) 전처리에 비해 촉진되었다. 근류의 활성은 산소분압에 비례하여 16 kPa 이상에서 포화되었고, 근류를 뿌리에서 떼어내거나 절단하면 92%와 43%로 활성이 억제되었다. pH 5.5, 6.5 및 8.0에서 생육된 초기 근류의 상대활성은 각각 89, 100 및 40%였으며, 1 및 3 mM의 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N과 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N에서 생육된 초기 근류는 각각 6, 1%와 68, 50%의 상대활성을 보였다. 수분 공급량 20, 50 및 100 mL에 의한 근류의 형성과 비활성은 각각 35, 120 및 8 mg·plant<sup>-1</sup>와 33.6, 58.4 및 8.4 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였다. 식물체에 수분공급을 중단하였을 때 5일 후에 일시 위조가 나타났으며, 식물체의 함수량 및 증산량은 각각 90 및 53% 감소되었으나, 근류 활성은 완전히 소실되었다.

주요어: 보리수나무, 유식물 생장, 질소고정 활성, 환경요인

방선균 *Frankia* sp.에 의해 공생기관인 근류를 형성하여 질소고정능을 갖는 비공과근류식물은 전세계에 200여종이 분포하고 있으며, 척박한 각종 생태계에 있어서 콩과식물과 더불어 생산성과 식생천이의 촉진에 크게 기여하고 있다(Sprent, 1979; Stowers, 1987). 방선균근식물의 근류는 다년생으로 오리나무속의 *Alnus glutinosa*에서는 8년생의 근류가 보고되고, 근류의 수는 6-7년생 *Hippophae* sp.에서 평방미터당 30-281개로 다양하다(Bond and Wheeler, 1980). 근류의 질소고정 활성은 다양한 요인에 의해 변화하고, *Hippophae* sp.에서는 120일된 근류에서 60일된 것의 1/4로 감소되며, 숙주식물의 광합성 산물은 근류의 에너지원이 되고(Dawson and Gordon, 1979; Huss-Danell and Sellstedt, 1983; Pizelle, 1984), 엽면적의 증가는 근류 형성 및 활성과 높은 상관성을 가지는 것으로 보고되었다(Song and Monsi, 1974).

근류에 있어서 환경요인인 온도와 광주기, 산소, 질소화합물에 의한 활성 조절의 영향에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며, 소귀나무속의 *Myrica gale*과 오리나무속의 *Alnus* spp.에서는 일사량과 온도조건이 유리한 여름 동안에 급격한 활성의 감소를 보이는 것이 신초생장의 정지(Wheeler *et al.*, 1981,

1986; Schwintzer, 1983), 또는 체내 광합성 산물의 분배에 대한 경쟁 때문이라고 하였다(Pizelle, 1984). 근류 활성의 최적 온도는 *A. glutinosa*, *M. gale* 및 *H. rhamnoides* 등 온대의 방선균근식물에서 20-25℃이며, 아열대성인 *Casuarina* sp.에서는 35℃ 이상으로 보고되었다(Bond and Mackintosh, 1975; Waughman, 1977; Hensley and Carpenter, 1979; Winship and Tjepkema, 1985; Huss-Danell *et al.*, 1987). 근권의 수분과잉이나 일시적인 건조에 의한 근류의 형성과 질소고정 활성의 저해 작용은 기공 폐쇄와 광합성의 저해에 대한 영향보다 크며(Schwintzer and Lancelle, 1983; Schwintzer, 1985; Sundström and Huss-Danell, 1987). 이는 근류에서 산소공급의 제한에 따르는 호흡활성의 저해에 기인하는 것으로 밝혀졌다(Weisz *et al.*, 1985; Guerin *et al.*, 1990). 질소고정효소는 *in vitro*에서 산소와 접촉하면 몇 분 이내에 활성을 잃게 되는 것으로 알려져 있으나, 통기성이 좋은 표토층에 많이 분포하는 근류에서는 구조적으로 질소고정 효소계에 대한 산소 방어기구가 있으므로 호기상태에서 최적의 높은 활성을 가진다(Huss-Danell *et al.*, 1987, 1989; Guerin *et al.*, 1990). 근권에 있어서 저농도의 질소화합물은 근류형성과 활성에 촉진효과를 갖지만(Mackay *et al.*, 1987; Troelstra *et al.*, 1987; Huss-Danell and Hahlin, 1988), 식물의 종과 수량(Kohls and Baker, 1989) 및 질산태-N 나

\*교신저자: Fax (053) 953-3066

© 한국식물학회 [서울] 1994

암모니아태-N 등 질소화합물의 종류에 따라 다른 반응이 보고되고 있다(Troelstra *et al.*, 1985).

우리나라의 비공과질소고정식물로서는 온대의 산지생태계에 많은 오리나무속, 보리수나무속 및 남부지역의 소귀나무속, 그리고 북쪽의 백두산 지역의 담자리꽃나무속과 같은 방선균 근식물이 있다. 이 중 보리수나무속에는 전국적으로 산지에 잘 적응하여 널리 분포하는 낙엽관목으로서 삼림의 주요 구성종이 되는 보리수나무가 있어서 산지생태계의 천이촉진에 크게 기여하고 있다. 또한 근류를 형성함으로써 질소원이 부족한 환경에서 식생천이를 촉진하며 같은 방선균근식물인 교목의 물오리나무와 콩과의 근류식물인 아까시나무, 싸리 및 자귀나무 등과 함께 산지생태계의 척박한 토양환경의 개선 및 생산성 향상에 기여하고 있다. Song 등(1993)은 보리수나무의 자연식생에 대해 생육기간중 근류 활성의 계절변화가 6월과 9월에 두 번 극대치를 나타내는 것을 보고하였으며, 최적 활성의 환경요인으로서 온도 30°C, pH 7, 산소분압 16 kPa 및 일변화의 특성을 밝혔다.

이 연구는 보리수나무의 실생유식물에 있어서 생장과정에 따른 근류 형성과 활성의 변화에 대한 중요 요인으로서 광, 온도, 수분스트레스, 질소화합물 등의 구배처리에 따른 활성의 정량적 변화와 특성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료식물과 환경요인의 처리

보리수나무(*Elaeagnus umbellata* Thunb.)의 종자는 1992년 10월에 성숙한 보리수나무에서 채종하여 풍건 저장한 것으로서 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 30분간 및 0.1% 승홍수에 10분간 처리하여 표면소독하고 충분히 수세한 후 GA<sub>3</sub> 500 ppm에 16시간 전처리하여 25°C 암소에서 4일간 발아시켜(발아율 55%) 뿌리가 1-2 cm되었을 때 pot(75×90 mm)에 5개체씩 이식하였다. 토양은 모래와 버미큘라이트를 1:1로 혼합하여 고압멸균하였다. 생장실의 광도와 광주기는 20,000 lux에 명 16시간과 암 8시간으로 하였으며, 온도와 상대습도는 각각 25±3°C와 70%로 유지하였다. 공생방선균인 *Frankia* sp.의 접종은 생장이 좋은 보리수나무의 근류를 채취하여 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 20분간 표면살균하고 파쇄여과액으로 유식물의 근권에 산포하였다. 접종액은 이식시와 이식 1주일 후에 각각 pot당 1 mL(0.05 g fr wt nodule·mL<sup>-1</sup>)씩 근권산포하였다. 배양액은 근류형성 및 식물체의 초기생장을 촉진하기 위해 2주간은 1/4 무질소 Hoagland 용액에 0.1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 첨가하여 공급하였다. 그리고 2주, 4주 및 8주 후에 각각 무질소 Hoagland의 1/4, 1/2 및 완전 용액으로 처리하였다. 식물의 생장과정에 따라 pH 6.5의 무

질소 Hoagland 배지에서의 생장을 대조구로 하여, pH 5.5, 및 8.0의 처리구와 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 1 mM과 3 mM 및 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 1 mM과 3 mM의 질소시비구에 대해 생육초기(20일 후)와 후기(40일 후)에 각각 생장과 각 기관별 분배율(F/C, T/R) 및 근류 형성과 활성을 측정하였다. 강수량에 따른 토양의 수분함량 변화와 보리수나무의 생육과 근류 형성 및 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 3일 간격으로 각각 20, 50 및 100 mL의 증류수 처리구를 설치하였다. 또한 1 mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>을 함유하는 Hoagland 용액으로 3개월간 생장시킨 후 배양액 공급을 중단하여 시간경과에 따른 증산량의 일변화와 근류 활성 및 각 기관별 수분함량의 변화를 측정하고, 정단 없이 시드는 일시위조점에서 수분 재공급에 따른 각 기관별 수분상태와 근류 활성의 회복과정을 측정하였다.

### 질소고정 활성의 측정

근류의 활성은 질소고정 효소에 의한 아세틸렌 환원력을 측정하는 방법(ARA)으로 분석하였다. 10 mL vial에 적당량의 근류(0.2-0.5 g fr wt)를 넣고 25°C에서 30분간 전처리한 후 아세틸렌(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) 가스를 1 mL 주입하여 일정시간 배양한 뒤에 주사기로 시료 0.5 mL를 채취하여 Porapak R column(182 cm×0.32 cm)을 이용한 gas chromatograph에서 수소불꽃이온화 검출기(FID)에 의해 환원된 에틸렌(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) 양을 정량하였다(Schollhorn and Burris, 1967; Evans *et al.*, 1973). 근류는 간상의 구조로서 수년 동안 생장하고 반복적으로 분지를 형성하여 산호모양의 형태로 되어 지름은 최대 5 cm까지 관찰되나 생장이 오래된 대형 근류는 어린 근류에 비해 비활성이 낮고 변이가 크므로 활성이 높은 지름 2 cm 이하의 근류를 시료로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 유식물의 생체량과 질소고정 활성의 변화

생장실에서 보리수나무의 종자 발아에 의한 유식물의 기관별 생장 변화와 근류 형성 및 질소고정 활성의 변화는 Table 1과 같다. 식물체의 현존량은 생육 4주째의 개체당 711 mg에서 14주째에 4199 mg로 증가하여 상대생장률(RGR, 1/W×dt/dW)이 초기의 1.60%·d<sup>-1</sup>에서 12주 후에 3.75%·d<sup>-1</sup>로 촉진되었다.

근류의 형성은 접종 8주 후에 관찰되어 엽면적의 확대 생장기에 급격히 증가되어 14주 후에는 개체당 83 mg이었다. 근류의 비활성은 생장 초기에 72.5 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>로서 최대치를 나타낸 후 점차 감소하였으나 개체당의 질소고정 활성(ARA)은 근류의 형성량에 비례하여 14주 후에는

**Table 1.** Changes of biomass of each organ, F/C, T/R ratios and nitrogenase activity (ARA) of nodules in *Elaeagnus umbellata* seedlings

Biomass and ARA	Week					
	4	6	8	10	12	14
Biomass (mg fr wt·plant <sup>-1</sup> )						
Leaf	255±22	312±30	426±36	605±52	1010±98	2210±250
Stem	124±12	175±14	234±28	310±30	480±42	725±72
Root	332±27	405±36	524±44	880±68	995±85	1264±110
Nodule	0	0	6±1	13±3	32±5	83±10
F/C	0.56	0.54	0.55	0.50	0.68	1.10
T/R	1.12	1.20	1.25	1.03	1.49	2.31
SPA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0	0	72.5±7.5	66.4±7.2	58.5±5.3	64.3±8.6
Total ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> plant <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0	0	0.73	3.32	3.93	6.43

**Table 2.** Diurnal changes and effect of light treatments on transpiration and ARA in *Elaeagnus umbellata* seedlings

Transpiration and ARA	Time of day						
	06:00	09:00	12:00	15:00	18:00	21:00	24:00
Transpiration (mL·plant <sup>-1</sup> )	1.20±0.15	1.83±0.20	2.02±0.21	2.45±0.27	1.45±0.16	0.55±0.08	0.31±0.02
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	7.2±1.3	45.6±4.5	52.3±5.7	58.6±6.3	38.7±3.5	25.2±2.6	16.6±2.1
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Control plot				Relative light intensity (%)		
					20-25	10-15	4-6
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	64.8±4.5				48.7±3.9	37.2±2.2	28.2±1.9

개체당 6.43 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·plant<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였다. 근류의 채취로부터 처리시간에 따른 활성 유지도는 대체로 약 4시간까지 일정한 활성이 유지되었고, 특히 높은 활성의 것은 2시간 후 에너지원의 이용이 제한됨으로써 점차 감소되었다. F/C 비는 초기에는 낮았으나 12주부터 잎의 대수기 생장에 의해 0.56에서 1.10으로 증가하였으며, T/R 비는 잎의 생장이 지연되는 초기에는 1.12로 낮았으나, 12주부터 잎의 대수생장과 더불어 2.31로 증가되었다.

## 광 도

보리수나무 유식물을 생장실(20,000 lux, 명 16시간, 암 8시간)에서 3일간 적응시킨 후 3시간 간격으로 측정된 질소고정 활성과 증산량의 일변화의 결과는 Table 2와 같다. 유식물의 근류 활성은 주간에 증가하여 오후 3시에 58.6 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>의 최대치를 보였고 야간에 감소하여 사

정에서 새벽 6시에 이르러 16.6에서 7.2 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>가 되었다. 증산량은 오후 3시와 자정에 각각 최대치와 최저치로서 2.45와 0.21 mL plant<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였다. 보리수나무 유식물을 온실환경의 대조구와 차광장치에 의해 20-25% 광도 처리구(I), 10-15% 광도처리구(II) 그리고 4-6% 광도처리구(III)에 1주일간 적응시켰을 때 근류 활성의 변화는 피음 정도가 불수록 감소되어 처리구 I과 II 및 III에서는 각각 48.7, 37.2 및 28.2 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>로서 대조구에 비해 41%와 54% 및 71%의 활성 감소를 보였다(Table 2).

## 온 도

보리수나무 유식물은 생장실의 배양온도를 다르게 했을 때 근류 활성에 미치는 영향과 측정온도에 따른 변화는 Table 3과 같이 저온에서 생육된 것은 고온에서 생육된 것보다 높은 활성을 보였다.

**Table 3.** Nitrogenase activity of *Elaeagnus umbellata* nodules grown on different temperature

Pretreatment temperature (°C)	ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) at different temperature (°C)					
	15	20	25	30	35	40
15	5.4 ± 0.6	21.3 ± 3.4	34.6 ± 3.2	64.5 ± 7.8	65.8 ± 8.5	29.6 ± 3.6
20	12.2 ± 1.4	24.7 ± 3.3	45.3 ± 4.2	61.3 ± 5.7	56.3 ± 5.6	27.2 ± 3.5
25	22.3 ± 2.6	34.2 ± 3.7	51.6 ± 5.0	59.2 ± 5.2	54.3 ± 6.2	18.6 ± 2.6
30	30.5 ± 3.2	41.6 ± 4.6	53.4 ± 5.2	58.5 ± 5.6	51.7 ± 6.0	10.5 ± 2.4

**Table 4.** Effect of oxygen, nodule size and physical impact on nitrogenase activity in *Elaeagnus umbellata* seedlings

Relative ARA (%)	O <sub>2</sub> concn (kPa)						Nodule size (cm)				Physical impact			
	0	4	8	12	16	20	1	2	3	4	Intact	Detached	Excised	Clushed
ARA (%)	0	35	55	76	100	100	100	100	80	54	100	92	43	0

유식물의 근류는 배양 온도의 상승에 따라 근류 활성이 증가하여 15, 20, 25 및 30°C 에서 각각 5.4, 24.7, 51.6 및 58.5  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 였으며, 이들 각 온도에서 전처리 후 15°C와 30°C에서의 근류 활성은 5.4, 12.2, 22.3, 30.5  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 와 64.5, 61.3, 59.2, 58.5  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 증가하였다. Winship과 Tjepkema(1983, 1985) 및 Huss-Danell 등(1987)이 지정한 바와 같이 저온에 의한 근류 활성의 저해는 온도 상승에 따라 빠르게 회복되나 고온에 의한 활성 저해는 비가역적으로 일어난다고 생각된다. 또한 Winship과 Tjepkema(1985)는 *A. rubra*에서 저온저해의 원인에 대해 온도 의존성 확산장벽에 의해 산소의 투과성이 억제되어 호흡이 떨어짐으로써 저해받는 것으로 보고하였으며, Huss-Danell 등(1987)은 *A. incana*에서 저온에 의한 호흡활성의 감소에 의해 주위의 산소를 소모시키지 못함으로써 활성이 저해되는 것으로 보고하였다.

## 산 소

보리수나무의 근류는 대부분 지표에 분포하는 근권에서 형성되어 호기적 조건을 충족함으로써 질소고정 효소계에 필요한 에너지 대사와 환원력의 공급을 받고 있다. 그리고 산소분압에 따른 근류 활성은 혐기상태에서 나타나지 않았고, 산소분압에 비례하여 16 kPa 이상에서 활성의 포화를 보였다(Table 4). 근류의 크기에 따라서는 지름 1-2 cm의 것은 최대 활성을 보였으나, 지름 3 및 4 cm의 큰 근류에서는 각각 20%와 46%의 활성 억제를 보였다. 일반적으로 질소고정 효소는 산소에 대단히 민감하여 근류가 손상을 입으면 곧 활성이 소실된다. 또한 근류의 물리적 상해에 의한 질소고정 활성의 저해는 뿌리에 부착된 근류를 대조구로 할 때 뿌리로부터 떼어낸 근류에서는 8%의 활성 감소를 보였고, 근류를 4조각으로 절단한 경우에는

급격히 활성이 억제(57%)되었으며, 근류를 파쇄한 경우에는 전혀 활성을 나타내지 않았다.

이는 Schwintzer와 Tjepkema(1983) 및 Kim(1992)에 의해 보고된 물리나무에 대한 결과와도 일치하였다. 이와 같이 근류가 물리적 손상을 입을 때 1차적으로 감소된 활성이 시간 경과에 대해 급격한 저하없이 유지되는 것은 구조적으로 구획화되어 산소에 의한 저해 부위가 근류의 상해면에 국한되기 때문인 것으로 생각된다.

## pH와 질소원

pH 및 화합태질소에 의한 보리수나무 유식물의 생장과 근류의 형성 및 질소고정 활성에 미치는 영향은 Hoagland 무질소배지(pH 6.5)에서 생장한 유식물을 대조구로 하여 각각 pH 5.5와 8.5의 무질소구와 pH 6.5의  $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$  1 mM과 3 mM 그리고  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{N}$  1 mM과 3 mM로 처리하여 20일째와 40일째에 식물 생장과 근류량 및 질소고정 활성을 비교 분석하였다(Table 5).

유식물의 초기생장(20일째)은  $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$  1 mM 처리구에서 5.2 g fr wt·plant<sup>-1</sup>로서 가장 높았고, 후기(40일째)에는  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{N}$  1 mM 처리구에서 13.22 g fr wt·plant<sup>-1</sup>로 가장 높은 생장량을 나타내었으며,  $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$  3 mM과  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{N}$  3 mM 처리구에서는 약간의 생장 저해 현상을 보였다. 근류의 형성은 40일째에 대조구의 468 mg fr wt·plant<sup>-1</sup>에 비해서  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{N}$  3 mM 및  $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$  1과 3 mM 처리구에서 각각 110, 196 및 40 mg fr wt·plant<sup>-1</sup>로서 크게 저해되었다. 근류의 비활성(SPA)은 생장초기(20일째)에는 pH 5.5, 6.5 및 8.0 처리구에 대해 각각 58.4, 65.5 및 26.1  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로서 알칼리성에서 저해를 보였으나, 40일째에는 각각 57.8, 53.4 및 52.7  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로서 유사한 값으로 되었다.  $\text{NH}_4$

Table 5. Effects of pH and nitrogen sources on growth and nitrogenase activity in *Elaeagnus umbellata* seedling

Stage	Treatment						
	Nitrogen free			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (pH 6.5)		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (pH 6.5)	
	pH 5.5	pH 6.5	pH 8.0	1 mM	3 mM	1 mM	3 mM
Above-ground plant growth (g fr wt)							
20 d	4.42±0.52	4.53±0.42	4.10±0.37	5.23±0.51	4.95±0.55	4.73±0.40	4.15±0.33
40 d	11.44±0.96	11.83±0.87	10.71±0.97	11.10±1.12	10.53±0.97	13.22±1.22	10.25±1.05
Nodules (mg·fr wt plant <sup>-1</sup> )							
20 d	83±11	127±14	105±11	114±13	30±5	124±14	63±7
40 d	244±22	468±48	322±31	196±20	40±6	276±24	110±13
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·plant <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )							
20 d	4.84	8.32	2.94	0.48	0.03	5.52	1.85
40 d	14.10	24.99	16.97	8.31	0.17	12.09	4.82
SPA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )							
20 d	58.4±7.2	65.5±8.4	26.1±4.3	4.2±0.5	1.0±0.1	44.5±5.2	29.4±3.1
40 d	57.8±6.8	53.4±5.5	52.7±5.4	42.4±4.6	4.2±0.6	43.8±5.1	37.5±4.2

Table 6. Effects of watering level on growth and nitrogenase activity in *Elaeagnus umbellata* seedlings

Biomass and ARA	Watering level (mL)			NaCl concn (M)		
	20	50	100	0.1	0.5	1.0
Plant Biomass (g fr wt·plant <sup>-1</sup> )						
Leaf	1.71±0.15	3.10±0.35	1.94±0.20	2.58±0.32	1.32±0.13	0.75±0.01
Stem	0.73±0.02	1.24±0.13	0.83±0.09	1.03±0.11	0.53±0.06	0.30±0.04
Root	0.93±0.01	1.33±0.15	1.25±0.14	1.12±0.11	0.57±0.07	0.33±0.05
Nodule (mg fr wt·plant <sup>-1</sup> )	35±4	120±11	8±2	102±12	52±8	15±2
Soil water content (%)	8.5±1.5	24.5±2.5	35.4±3.6	—	—	—
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )						
	33.6±7.6	58.4±8.3	18.4±1.5	48.2±6.5	24.5±3.2	3.2±0.4

<sup>15</sup>N 1과 3 mM 처리구에서의 근류 활성은 20일째에 각각 44.5와 29.4 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였으며, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 1과 3 mM 처리구에서는 활성이 거의 없었다. 이는 Troelstra 등(1985, 1987)이 *A. glutinosa*에서 보고한 결과와 일치하였다. 한편 Kohls와 Baker(1989)는 *A. glutinosa*에서 근류 형성의 수와 양이 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 1 mM 농도에서 현저하게 저해되는 것으로 보고하였으나, 보리수나무에서는 생장이 왕성한 시기에는 근류 형성 및 활성이 촉진되었다.

#### 수분 스트레스

보리수나무 유식물의 생육과정(16주)에서 근류 형성 및 활성에 미치는 강수량과 염농도의 영향은 Table 6과 같다. 수분 공급량 20, 50 및 100 mL 및 NaCl 농도 0.1, 0.5 및 1.0 M에 의한 유식물의 생장 변이는 각각 3.40, 5.79 및 4.02와 4.83, 2.47, 1.39 g fr wt·plant<sup>-1</sup>였으나, 근류의 형성은 각각 35, 120 및

8과 102, 52 및 15 mg fr wt·plant<sup>-1</sup>였고, 근류의 비활성은 각각 33.6, 58.4 및 18.4와 48.2, 24.5 및 3.2 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>였으며, 토양의 함수량은 각각 8.5, 24.5 및 35.4%로 변화하였다. Schwintzer(1985)는 peat 토양의 *Myrica gale*에서 과잉 수분에 의해 근류 형성과 활성 및 식물체의 생장이 저해되는 결과를 보고하였다. 한편, 식물체의 증산 작용은 광합성 활성에 직접적으로 영향을 미침으로써 에너지 대사와 환원력의 생성을 통해 근류의 질소고정 활성을 조절한다. 보리수나무 유식물에 수분 공급을 중단한 시점에서 일시위조가 나타날 때까지 각 식물체의 함수량과 증산량 및 근류 활성의 일변화를 측정하고, 일시위조점에서 물을 재공급하여 2시간 간격으로 각 기관별 함수량의 변화를 분석한 결과는 Table 7과 같다. 토양함수량(포장용수량, 23%)은 수분공급을 중단하여 1일과 2일 후에 각각 10.5와 8.6%로 감소하였고, 식물체의 함수량은 각각 78.0과 76.5%로 감소하였으나, 근류 활성과 증산량은 대조구에 대해 각각 82와 54% 및 94와 76%로 감소하였다. 4일째에는 토양과 식

**Table 7.** Changes in water content, transpiration and ARA during the water stress and after the supply of water in *Elaeagnus umbellata* seedlings

Transpiration and ARA	Control	h after water stress					h after water supply				
		24	48	72	96	120	1	3	5	7	9
Water content (%) on fr wt basis											
Soil	23.0	10.5	8.6	6.4	4.2	3.2	23.0	23.4	24.5	22.4	22.2
Leaf	78.6	78.0	76.5	75.8	73.7	71.0	77.6	77.5	78.2	77.5	77.3
Transpiration (mL·plant <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )											
(%)	38.5	36.2	29.4	24.6	22.2	20.5	2.9	3.2	3.3	3.2	3.2
100	100	94	76	64	57	53					
ARA (μM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·g fr wt nodule <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )											
(%)	62.4	51.3	33.8	16.2	10.1	0	0	0	0	0	0
100	100	82	54	26	16	0					

물체의 함수량 및 증산량과 근류 활성이 각각 4.2%, 73.7%, 22.2 mL·plant<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 및 10.1 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·g fr wt nodule<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>로 감소하였다. 5일째에 일시위조점에 도달했을 때의 토양과 식물체의 함수량 및 증산량은 각각 3.2%와 71.0% 및 20.5 mL·plant<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>였으나, 근류 활성은 나타나지 않았다. 일시위조점에서 재 급수에 의해 토양과 유식물의 함수량 및 증산량은 신속히 회복되어 1시간 뒤에 거의 원상태로 회복되었으나 근류의 활성은 9시간까지 회복되지 않았다.

이 결과에서 건조 스트레스에 의한 근류 활성의 억제는 근류에 대한 직접적인 영향으로서 광합성 활성의 저해보다 민감하였으며, 대두의 근류에서 건조 스트레스에 의한 활성의 저해가 잎의 수분퍼텐셜의 변화보다 민감하고 일시위조점에서 재 급수하였을 때 회복이 느리다는 보고(Patterson *et al.*, 1979) 및 물오리나무에 대한 연구결과(Kim, 1992)와 일치하였다. 그러나 일시위조점에서 대두의 근류 활성은 대조구의 25%를 유지한 것으로 보고되었으나(Patterson *et al.*, 1979), 보리수나무의 근류는 활성을 소실하였으며, 건조환경은 이 식물 생육과 생태적 분포에 중요한 제한요인으로 되고 있음을 알 수 있다.

## 사 사

이 논문은 1993년 한국과학재단의 목적기초연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 인 용 문 헌

- Bond, G. and A.H. Mackintosh. 1975. Diurnal changes in nitrogen fixation in the root nodules of *Casuarina*. *Proc. Roy. Soc. B.* **192**: 1-12.
- Bond, G. and C.T. Wheeler. 1980. Non-legume nodule systems. In *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. F. J. Bergersen (ed.). John Wiley & Sons.

- New York, pp. 185-211.
- Dawson, J.O. and J.C. Gordon. 1979. Photoassimilate supply and nitrogen fixation in *Alnus*. In *Symbiotic Nitrogen in the Management of Temperate Forests*. J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D. A. Perry (eds.). Forest Res. Lab. Oregon State Univ., Corvallis, pp. 187-195.
- Evans, H.J., K. Fishbeck and L.L. Boersma. 1973. Measurement of nitrogenase activity of intact legume symbionts *in situ* using the acetylene reduction assay. *Agrochim. J.* **65**: 429-433.
- Guerin, V., J.C. Trinchant and J. Rigaud. 1990. Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.* **92**: 595-601.
- Hensley, D.L. and P.L. Carpenter. 1979. The effect of temperature on N<sub>2</sub> fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by nodules of legumes and actinomycete nodulated woody species. *Bot. Gaz.* **140**: 558-564.
- Huss-Danell, K. and A.D. Hahlin. 1988. Nitrogenase activity decay and energy supply in *Frankia* after addition of ammonium to the host plant *Alnus incana*. *Physiol. Plant.* **74**: 745-751.
- 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 Soil* **118**: 61-73.
- Huss-Danell, K. and A. Sellstedt. 1983. Nitrogenase activity in response to restricted shoot growth in *Alnus incana*. *Can. J. Bot.* **61**: 2949-2955.
- 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. Plant.* **70**: 355-360.
- Kim, S.J. 1992. Symbiotic nitrogen fixation and regulation mechanisms of *Alnus hirsuta* Ruph. PhD Thesis. Kyungpook Natl. Univ., Taegu, 70 pp.
- Kohls, S.J. and D.D. Baker. 1989. Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. *Plant Soil* **118**: 171-179.
- Mackay, J., L. Simon and M. Lalonde. 1987. Effect of subst-

- rate nitrogen on the performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* clones inoculated with Sp<sup>+</sup> and Sp<sup>+</sup> *Frankia* strains. *Plant Soil* **103**: 21-31.
- Patterson, P., D.C. Raper and H.D. Gross. 1979. Growth and specific nodule activity of soybeans during application and recovery of a leaf moisture stress. *Plant Physiol.* **64**: 551-556.
- Pizelle, G. 1984. Seasonal variations of the sexual reproductive growth and nitrogenase activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) in mature *Alnus glutinosa*. *Plant Soil* **78**: 181-188.
- Schollhorn, R. and R.H. Burris. 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 213-216.
- Schwintzer, C.R. 1983. Primary productivity and nitrogen, carbon, and biomass distribution in a dense *Myrica gale* stand. *Can. J. Bot.* **61**: 2943-2948.
- Schwintzer, C.R. 1985. Effect of spring flooding on endophyte differentiation, nitrogenase activity, root growth and shoot growth in *Myrica gale*. *Plant Soil* **87**: 109-124.
- Schwintzer, C.R. and S.A. Lancelle. 1983. Effect of water-table depth on shoot growth, root growth, and nodulation of *Myrica gale* seedlings. *J. Ecol.* **71**: 489-501.
- 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., K.J. Lee, T.G. Park, C.S. An and J.H. Kim. 1993. Effects of environmental factors on the nitrogen fixation activity in *Elaeagnus umbellata*. *Kor. J. Ecol.* **16**: 159-168.
- Song, S.D. and M. Monsi. 1974. Studies on the nitrogen and dry matter economy of a *Lespedeza bicolor* var. *japonica* community. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo III* **11**: 283-332.
- Sprent, J.I. 1979. The Biology of Nitrogen-fixing Organisms. McGraw-Hill, London, pp. 114-127.
- Stowers, M.D. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of *Frankia*. In *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. G.H. Elkan (ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 29-53.
- Sundström, K.R. and K. Huss-Danell. 1987. Effects of water stress on nitrogenase activity in *Alnus incana*. *Physiol. Plant.* **70**: 342-348.
- Troelstra, S.R., T. Blacquièrè, 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 N<sub>2</sub> fixation. *Plant Soil* **103**: 169-183.
- Troelstra, S.R., K. Van Dijk and T. Blacquièrè. 1985. Effects of N source on proton excretion, ionic balance and growth of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner: Comparison of N<sub>2</sub> fixation with single and mixed source of NO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>. *Plant Soil* **84**: 361-385.
- Waughman, G.J. 1977. The effect of temperature on nitrogenase activity. *J. Exp. Bot.* **28**: 949-960.
- 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.
- Wheeler, C.T., J.E. Hooker, A. Crowe and A.M.M. Berrie. 1986. The improvement and utilization in forestry of nitrogen fixation by actinorhizal plants with special reference to *Alnus* in Scotland. *Plant Soil* **90**: 393-406.
- Wheeler, C.T., M.E. McLaughlin and P. Steele. 1981. A comparison of symbiotic nitrogen fixation in Scotland in *Alnus glutinosa* and *Alnus rubra*. *Plant Soil* **61**: 169-188.
- Winship, L.J. and J.D. Tjepkema. 1983. The role of diffusion in oxygen protection of nitrogenase in nodules of *Alnus rubra*. *Can. J. Bot.* **61**: 2930-2936.
- 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 Soil* **87**: 91-107.

(1994. 8. 3 接受)

---

## Effects of Environmental Factors on Growth and Nitrogen Fixation Activity of Autumn Olive (*Elaeagnus umbellata*) Seedlings

Song, Seung-Dal<sup>\*</sup>, Tae-Gyu Park, Chung Sun An<sup>1</sup> and Joon-Ho Kim<sup>1</sup>

*Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea; and*

*<sup>1</sup>Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

### ABSTRACT

Effects of environmental factors of light, temperature, nitrogen sources and water stress were analyzed quantitatively on the nodule formation and nitrogen fixation activity of autumn olive plant (*Elaeagnus umbellata* Thunb.) during the seedling growth. Seedlings showed the maximum nitrogenase activity of  $72.5 \mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in the early nodulation stage. The relative growth rate and T/R ratio changed from  $1.60\% \cdot \text{d}^{-1}$  and 1.12 in the earlier stage to  $3.75\% \cdot \text{d}^{-1}$  and 2.31 in the later stage, respectively. Light conditions of 20-25, 10-15 and 4-6% resulted in decreases of 41, 54 and 71% of the nitrogenase activity, respectively. Nodules incubated in 15, 20, 25 and  $30^\circ\text{C}$  showed the activities of 5.4, 24.7, 51.6 and  $58.5 \mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively. Pretreatment with low temperature ( $15^\circ\text{C}$ ) followed incubation at  $30^\circ\text{C}$  attained higher nitrogenase activity ( $66.5 \mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) than that with higher temperature ( $35^\circ\text{C}$ ). The oxygen pressure above 16 kPa is necessary for saturation of the nodule activity, but the activity was inhibited severely by physical impact such as the exision or isolation of nodules from the root. The relative activities of early nodules grown in pH 5.5, 6.5 and 8.0 were 89, 100 and 40% and those grown in 1 and 3 mM of  $\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_4$  were 6, 1 and 68, 50%, respectively. Watering levels of 20, 50 and 100 mL during the seedling growth resulted in 35, 120 and 8 mg of nodule formation and 33.6, 58.4 and  $8.4 \mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fr wt nodule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  of the nitrogenase activity, respectively. Water stress with 86% decrease of soil water content caused temporary wilting point of leaf and a complete disappearance of nitrogenase activity of nodules, though the water content and transpiration rate in plant were reduced to 90 and 53%, respectively.

**Keywords:** *Elaeagnus umbellata*, seedling growth, nitrogen fixation, environmental factor

---

\*Corresponding author: Fax +82-53-953-3066