

Ureide 분석

윤종탁[†] · 김옥한

작물과학원

I. 서 언

Xylem sap과 식물체 추출물에 포함된 ureide-N의 relative abundance와 생물학적 질소고정량은 상관관계가 매우 높다고 보고되고 있다. ureide를 생성하는 두과에서 생물학적 질소고정량을 측정하기 위한 xylem sap의 이용은 질소를 고정하는 식물체의 ureide 화합물(allantoin and allantoic acid)과 토양질소를 이용하는 식물체의 nitrate와 α -amino-N의 변이와 관계가 있다. 한발조건하에서 콩 엽병의 ureides 증가는 콩의 질소 고정에 대한 한발 저항성과 부의 상관성이 있으며, 한발에 의한 ureide catabolism의 감소와 관련이 깊다고 하여 두과식물의 한발 저항성 관련 연구에 엽병의 ureide 함량 분석이 이용되고 있는 실정이다. 그리고, 질소고정과 관계가 있는 ureide의 이용은 soybean, pigeonpea, mungbean, common bean을 포함하는 열대 두과 등이며, chickpea, lentil, pea, fababean, lupin, groundnut 같은 두류에서는 이용되지 않고 있다.

Ureide 분석방법은 여러 가지 유리한 점이 있는데, xylem sap과 식물체 부위의 hot water 추출물의 collection이 비교적 간단하다는 것이다. xylem sap에서 N solute(ureides, α -amino-N, nitrate)의 분석은 test tube에서 발색법으로 행해지며, 고가의 장비가 필요없이 많은 재료를 매일 분석할 수 있다. 그러나 이 분석방법은 질소고정을 측정함에 있어 time-intergrated 하기보다는 point-of-time이라는 점이 단점이 될 수 있다.

본 장에서는 생물학적으로 고정된 질소를 분석하는 여러방법들 중에서 비용이 적게 들면서도, 많은 재료를 비교적 간단한 방법으로 분석할 수 있는 Ureide법에 대해 살펴보도록 하겠다.

II. 분석방법

1. Method of ureide-N analysis in xylem sap

1) Xylem sap 채취

(1) 시료채취 조건

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6854 (E-mail) jongtag@rda.go.kr

날씨가 화창하고 토양수분이 충분한 조건과 증산작용이 정상인 상태의 식물체면 좋다.

(2) 도구 및 장치

micro tube(5-10 ml), 흡습지, 절단가위, Ice box, Timer, 탈지면, 주사기

(3) 시료채취 방법

micro tube에 탈지면 0.1 g 정도를 넣어 무게를 재고, 비닐bag에 담아서 포장으로 이동한다. 식물체의 절단은 자엽과 초엽사이의 줄기를 전정가위 등을 이용하여 행하고, 탈지면이 삽입된 micro tube를 절단된 stem에 끼워넣고 xylem sap의 추출 상태에 따라서 10-15분 정도를 채취한후 ice box에 담아 이동한다. 수거된 micro tube는 무게를 잰 후 주사기를 이용하여 탈지면에서 xylem sap을 분리한 후 분석 시료로 사용한다.

2) Ureide-N 분석법

(1) 도구 및 장치

UV-spectrophotometer, 10 ml test tube, rack, ice bath, boltex, boiling water bath, micro pipette 등이 있다.

(2) 시약

(가) 용액 A(100 ml) :

Phenylhydrazinium Chloride 0.165 g + DW 50 ml + 0.65 N HCL 50 ml

(나) 용액 B(125 ml) :

Potassium Hexacyanoferrate III 0.418 g + DW 25 ml + 10 N HCL 100 ml

(다) Allantoin, 3차 증류수

(3) 분석방법

(가) 10 ml의 test tube에 50 μ l의 xylem sap과 3 ml 0.083 N NaOH를 첨가한 후 8 분간 끓는 물에서 끓인다.

(나) 1 ml의 solution A를 첨가한 후 2분간 끓는 물에서 끓인다.

(다) 15분간 얼음물에서 식힌후 2.5 ml의 solution B를 첨가하여 발색시킨다.

(라) 30분간 얼음물에서 식힌후 520 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정한다.

(마) 검량선의 작성

① 증류수에 allantoin 632.4 mg을 녹여 1 L로 만들면 4 mM의 Allantoin 표준용액이 된다.

② 4 mM의 Allantoin 표준용액을 희석하여 2, 1, 0.5 mM를 각각 조제한다.

③ 희석된 표준용액을 50 μ l를 이용하여 흡광도와 표준용액 농도의 검량선을 작성한다.

2. Method of ureide-N analysis in plant part

1) 도구 및 장치

Centrifuge, microfuge tube, UV-spectrophotometer, test tube, rack, ice bath, boltex, boiling water bath, micro pipette 등이 있다.

2) 시약조제

- (1) 0.5 N NaOH : NaOH 2 g/DW 100 ml
- (2) 0.65 N HCl : 65 mL 1 N HCl/DW 100 ml
- (3) Phenyl hydrazine hydrochloride 0.33% W/V : 165 mg/DW 50 ml
- (4) Potassium Ferricyanoide 1.67% W/V : 1.67 g/DW 100 ml
- (5) Allantoin, concentrated HCl, 3차 증류수

3. 분석방법

- (1) 분석할 식물체 부위를 80°C에서 건조한후 1-2 mm로 분쇄한 후 시료로 이용하며, 30-35 mg을 microfuge tube에 넣고, 0.2 M NaOH를 1 ml를 넣는다.
- (2) Boiling water bath에 30분 끓인후 9180×g에서 10분간 원심분리한다.
- (3) standard는 2 ml를 test tube에 옮기고, sample은 2 ml를 상등액에서 취해 test tube에 옮기고 증류수를 넣어 5 ml를 만든다.
- (4) 0.5 N NaOH 1 ml를 넣고, 8분간 끓인다.
- (5) 0.65 N HCl 1 ml와 0.33% phenyl hydrochloride 1 ml를 넣는다.
- (6) test tube를 voltex로 충분히 교반한 후 water bath에서 2분간 끓인다.
- (7) Ice bath에 10분간 방치한 후 HCl 4 ml를 넣고 -10°C로 10분간 냉각시킨다.
- (8) Potassium Ferricyanide 1 ml를 넣고 test tube를 voltex로 교반해 준다.
- (9) 15분간 발색시킨후 30분 이내에 분광광도계로 520 nm에서 흡광도를 측정한다.
- (10) 검량선의 작성
 - ① 증류수에 allantoin 158.1 mg을 녹여 1 L로 만들면 1 mM의 Allantoin 표준용액이 된다.
 - ② 1 mM의 Allantoin 표준용액을 희석하여 0.2, 0.1, 0.01, 0.001 mM를 각각 조제한다.
 - ③ 희석된 표준용액을 를 이용하여 흡광도와 표준용액 농도의 검량선을 작성한다.

III. 분석결과

Table 1. The changes of xylem sap rate in several soybeans (野原 努, 2003).

Variety	Xylem sap rate (g/h)		
	Full bloom stage	Full pod stage	Full seed stage
En1282	15.3	5.2	9.0
Enery	15.0	2.6	9.9
Sakukei4	9.2	4.0	5.5

Table 2. The analysis of xylem sap component in several soybeans at full bloom stage (野原 努, 2003).

Variety	Xylem sap component (mg/h)			
	Ureide	Amino acid	Nitrate	NO ₃
En1282	221	1126	3363	96
Eney	586	1174	2474	108
Sakuhei4	4477	681	1684	60

Table 3. Concentration of ureide-N, α -amino-N and nitrate-N in the xylem bleeding sap collected from soybean plants Satoshi Shimamura et al., 2002).

Treatment	Concentration of xylem sap (μ mol/ml)		
	Ureide-N	α -amino-N	Nitrate-N
Control	8.43	3.40	0.20
Flooding	20.86	6.96	0.24

Table 4. Nodulation, relative ureide-N in xylem sap, grain yields of a cereal crop sown immediately after soybean harvest of normally-nodulating and supernodulating genotypes, relative commercial cultivar (Song et al., 1995).

Genotype	Nodulation no	Relative ureide-N	Grain yield	Yield of subsequent cereal crop
Manark	n.d.	120	120	102
Bragg	107	n.d.	96	91
Nts1116	245	121	96	131
777-36	n.d.	119	102	n.d.
Nts1007	338	113	84	121
T89238	n.d.	115	101	n.d.
Centaur	100	100	100	100

Table 5. Grain yield and relative ureide-N in xylem sap of intermediate (PS47) and extreme (PS55) supernodulating genotypes and cv. Manak (Zhao et al., 1998).

Genotype	Grain yield (t/ha)		Xylem relative ureide-N (%)	
	0 N	200 N	0 N	200 N
Manak	3.70	4.02	41	26
PS47	3.62	4.35	45	40
PS55	2.11	3.61	66	57

Table 6. Ranges of values for the parameters relative ureides on the 489 genotypes of soybean (Betts et al., 1987).

Variable	NO ₃ ⁻ treatment	Range	Range for 90% of genotypes
Xylem relative ureide (%)	0	55-90	81-96
	2.5 mM	2-76	7-58
Shoot axis relative ureides (%)	0	27-100	89-100
	2.5 mM	0.2-99	4-45
Root relative ureides (%)	0	7-99	72-97
	2.5 mM	1-87	3-39

Table 7. Relative transpiration, acetylen reduction and petiole ureide concentration response to water-deficit treatments, averaged over sampling times (De silva et al., 1996).

Treatment	Relative transpiration (%)	Acetylene reduction (μmol/gdw/h)	Petiole ureides (μmol/gdw)
Control	100	189	41
Mild stress	47	125	90
Moderate stress	31	84	85
Severe stress	15	14	116

Table 8. Interaction of CO₂ levels and water treatments on ureide concentration in soybean plants (Serraj et al., 1998).

Plant part	Ureide concentration (μmol/gDW)			
	360 μmol/molCO ₂		720 μmol/molCO ₂	
	Well watered	Drought stress	Well watered	Drought stress
Nodule	6.7	24.8	3.5	27.3
Root	2.2	8.9	2.1	9.8
Shoot	4.7	11.0	2.7	5.9

참고문헌

1. Betts, J. H. and D. F. Herridge. 1987. Isolation of soybean lines capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. *Crop. Sci.* 27 : 1156-1161.
2. De silva, M., L. C. Purcell, and C. A. King. 1996. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Sci.* 36 : 611-616.
3. 北條良夫, 石冢潤爾. 1985. 最新作物生理實驗法. 農業技術協會.

4. 野原 努. 2003. 窒素代謝からみたダイズ多収化要因の解明. 筑波大學大学院 生命環境科學研究科 生物圏資源科學專攻 修士學位論文.
5. Serraj, R., T. R. Sinclair, and L. H. Allen. 1998. Soybean nodulation and N₂ fixation response to drought under carbon dioxide enrichment. *Plant, Cell and Environment*. 21 : 491-500.
6. Shimamura, S., T. Mochizuki, Y. Nada, and M. Fukuyama. 2002. Secondary arenychma formation and its relation to nitrogen fixation in root nodules of soybean plants grown under flooded conditions. *Plant Production Sci.* 5(4) : 294-300.
7. Song, L., B. J. Carroll, P. M. Gresshoff, and D. F. Herridge. 1995. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for yield, N₂ fixation and benefit to subsequent crops, *Soil Biol. Biochem.* 26.
8. Young, E. G. and C. F. Conway. 1942. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142 : 839-853.
9. Zhao, L., L. Song, F. P. C. Blamey, S. Fukai, and B. J. Carroll. 1998. Yield and N₂ fixation of backcrossed supernodulating soybean mutants. In: *Proceedings of the Ninth Australian Agronomy Conference*. Wagga, 375-378.

Analysis of Ureide

Jong-Tag Youn[†] and Wook-Han Kim

*RDA, NICS, Dept. of Crop Technology Application Division, Suwon 209, Korea
+82-31-290-6854, jongtag@rda.go.kr*