

털비름(*Amaranthus retroflexus*), 명아주(*Chenopodium album* var. *centrorubrum*) 및 콩(*Glycine max*)의 질산환원효소 활성의 측정을 위한 Plastochron index

박 봉 규 · 김 중 희*

(이화여자대학교 생물학과 · 경남대학교 생물학과*)

An Application of a Plastochron Index for Nitrate Reductase Activity in *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* var. *centrorubrum* and *Glycine max*

Park, Bong-Kyu and Joung-Hee Kim*

(Dept. of Biology, College of Natural Science, Ewha Womans University,

Dept. of Biology, College of Natural Science, Kyung Nam University*)

ABSTRACT

Plastochron index was used as a measure for the nitrate reductase activity (NRA) in *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* var. *centrorubrum* and *Glycine max*. The material plants treated with $\text{NO}_3\text{-N}$ had higher NRA than those treated with $\text{NH}_4^+\text{-N}$. High NRA were found in young tissues which have low PI or LPI in both *A. retroflexus* and *C. album*. These results indicated that this enzyme decreased with increasing plastochron index of the extracted tissues. High level of NRA was detected in *Glycine max* leaves at PI 4.0. On the other hand, there were no significant differences for PI among $\text{NO}_3\text{-treated}$, $\text{NH}_4^+\text{-treated}$ and control in both stems and roots.

서 론

Erickson과 Micheline(1957)는 연속적으로 출현하는 두 잎의 형성에 소요되는 시간의 차이로서 plastochron을 정의하고, 이를 나타내기 위하여 plastochron index(PI)를 제안하였다. Micheline(1958)는 *Xanthium*잎에서 생중량, 건중량, 엽록소함량 및 호흡에 따르는 PI의 유용성을 보고하였으며, Lamoreaux *et al.*(1978)은 식물 성장에 대한 호르몬의 조절과 농작물의 생장 과정에 영향을 주는 여러 환경 요인의 효과에 PI를 이용한 결과, 유용하다고 보고하였다.

질산환원효소 활성(nitrate reductase activity, NRA)은 환경변화에 따라 변하므로(Beevers and Hageman, 1969; Leyshon *et al.*, 1980; Nicholas *et al.*, 1976), Oaks *et al.*(1972)은 이 효소를 "luxury enzyme"이라고 불렀고, Shaner *et al.*(1976, a,b)과 Nilsen *et al.*(1981)은 NRA가 식물의 수분상태에 민감하며 수분포텐셜이 낮을 때 저해받는다고 보고하였다.

Winter *et al.*(1982)은 *Moricandia arvensis*가 암모늄태 질소 처리군보다 질산염태 질소 처리군에서 NRA가 높았고, 그 중에서도 어린 잎에서 가장 높았음을 보고하였으며, Ruffy *et al.*(1983)은 동일 양의 질산염 또는 질산염+암모늄염이 공급된 식물은 암모늄태 질소만 공급된 것보다 생장이 더 우세함을 밝혔다. 특히, Crafts-Brandner *et al.*(1982)은 15 mM의 KNO₃에서 성장한 강남콩 식물에서 NRA가 가장 높음을 보고하였다.

NRA의 감소는 식물의 연령 증가에 따라 빨라진다는 보고들이 있다(Radin, 1974; Oaks *et al.*, 1972; Gebauer *et al.*, 1984). 즉 가장 높은 NRA는 어린 잎에서 관찰되고, 성숙한 것에서 감소하여 노화의 초기에 최소 수준에 이른다(Streit and Feller, 1983). 한편, Smith *et al.*(1983)에 의하면, NRA는 생태학적 연구에 적용시킬 수 있는 효소로서, 그 활성의 차이가 자연 천이의 연구에 유용함을 밝혔다.

본 연구에서는 털비름(*Amaranthus retroflexus*), 명아주(*Chenopodium album* var. *centrorubrum*) 및 콩(*Glycine max*)을 재료로 질소원에 대한 질산태와 아질산태 질소의 흡수 차이가 NRA에 미치는 효과를 PI와 LPI(leaf plastochron index)를 적용하여 연구하였다.

재료 및 방법

털비름과 명아주의 종자는 각각 발아 최적온도인 35°C와 23°C의 항온기에서 발아시켜, 자엽의 출현시부터 실험실의 growth chamber에서 길렀고, 이들 유식물들을 NRA 분석을 위하여 vermiculite를 채운 플라스틱 화분에 이식하였다.

한편, 콩 종자는 직접 vermiculite를 채운 화분에 뿌렸고, 1주일 후에 출현한 자엽과 잎을 NRA 분석을 위하여 사용하였다.

NRA에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위하여 질산태 질소(10mM KNO₃), 암모늄태 질소(10mM (NH₄)₂SO₄) 및 대조군(증류수)으로 구분하여 처리하였다. 영양용액으로는 질소원이 제외된 Hoagland 용액을 사용하였으며, 흙이 젖어 있을 정도로 매일 증류수 약 100ml를 공급하였다.

시료는 NRA 측정을 위한 조직의 상대적 연령이 같도록 하기 위하여 McCauley 등(1984 a, b)의 방법에 따라 PI가 거의 비슷한 개체를 선별하여 사용하였다. 야외에서의 시료채취도 위와 같은 방법에 준하였다.

털비름과 명아주는 LPI의 0을 기준으로하여 음의 값은 어린 잎으로, 양의 값은 성숙한 잎으로 구분하여 분석하였다. 이것은 털비름이나 명아주의 한 장의 잎으로는 NRA를 추정하기 위한 분석 시료로서는 크기가 너무 작아 LPI에 따른 NRA 분석이 불가능하였기 때문이다.

콩은 정확한 LPI에 따라, 각 기관의 NRA를 분석하였다. 시료 채집시의 조도는 평균 15,000lux였으며, 항상 오전 10:00에서 11:00시 사이의 일정한 시간에 채집하였다.

채취한 시료는 증류수로 씻은 후, 1g당 3~5ml의 tris buffer(pH 8.8) 용액으로 추출하였다. 추출액은 두 점의 가제로 여과시킨 후, 그 0.4ml를 0.5M tricine(pH 7.5) 0.2ml, 0.2M KNO₃ 0.1ml, 2mM NADH 0.1ml, H₂O 0.2ml의 혼합액에 넣어 30°C의 암실에서 60분간 반응시켰다. 그 후 0.5M Zn-acetate 0.1ml와 PMS(46mg/l) 0.1ml를 넣어 NRA의 반응을 정지시켰다. 10분간 방치후, 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하고, 그 상등액 1ml에 1% sulfanilamide 1ml와 0.02% NED 1ml를 섞어 15분 후, spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

KNO₂를 표준 용액으로 사용하여, 형성된 아질산염을 $\mu\text{mole/g.f.w.}$ 로 계산하였다. 이때 모든 실험은 효소의 변화를 최소한으로 줄이기 위하여 4°C 이하에서 신속하게 진행하였다.

한편, PI와 LPI의 값들은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$PI = n + (\ln L_n - \ln LR) / (\ln L_n - \ln L_{n+1})$$

여기서 PI : plastochron index, n : 기부로부터 센 잎의 번호

L_n : n번째 잎의 길이, L_{n+1} : n+1번째 잎의 길이

LR : reference length

reference length는 기하급수적 성장과정인 초기성장 단계에서 얻을 수 있으며, 털비름과 명아주의 reference length는 10mm를 사용하였으며, 콩은 40mm로 사용하였다.

$$LPI_i = PI - i.$$

여기서 LPI : leaf plastochron index, i : 문제가 되는 잎의 기부로부터 센 잎의 번호

결 과

Table 1은 제어된 실험실과 야외 조건에서 기른 명아주 잎에서 측정된 NRA의 결과이다. 실험실과 야외 조건 모두에서, 음의 LPI를 갖는 잎은 NRA가 높았으며 야외군이나 실험실의 암모늄 처리군보다 실험실의 질산염 처리군 식물에서 더 높았다.

Table 1. Nitrate reductase activity ($\mu\text{mole/g.f.w.}$) of leaves in *C. album* grown in growth chamber and field condition. When sampling, the differences of the leaves expressed as the reference length. Each data is mean of four replicates of each treatment assayed. -; negative LPI, +; positive LPI

Sampling date	Growth chamber						Field	
	NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺		Control		-	+
	-	+	-	+	-	+		
May 14	9.75	6.40	8.94	5.90	8.43	5.95	8.03	7.97
May 17	6.61	5.39	4.83	3.16	7.47	5.29	8.53	11.58
May 20	9.40	5.13	2.50	2.39	7.57	5.13	9.40	9.50
May 22	9.90	5.90	4.88	3.26	8.38	5.90	8.63	12.08

Table 2. Nitrate reductase activity ($\mu\text{mole/g.f.w.}$) of leaves in *A. retroflexus*. When sampling, the differences of the leaves were expressed as reference length. Each data is the mean of four replicates of each treatment assayed. -; negative LPI, +; positive LPI

Sampling date	NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺		Control	
	-	+	-	+	-	+
June 1	17.56	17.4	11.58	11.2	15.53	8.18
June 5	14.98	14.47	12.59	12.13	10.46	7.21
June 10	20.61	15.94	12.49	5.39	13.10	7.42

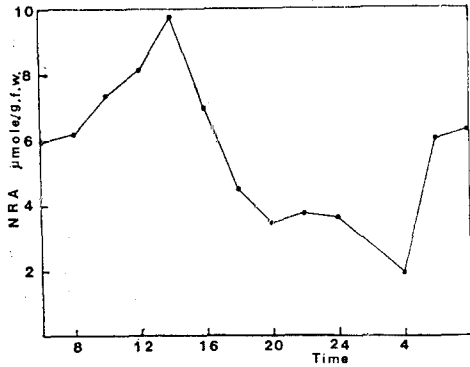


Fig. 1. Diurnal variation of NRA in soybean seedlings.

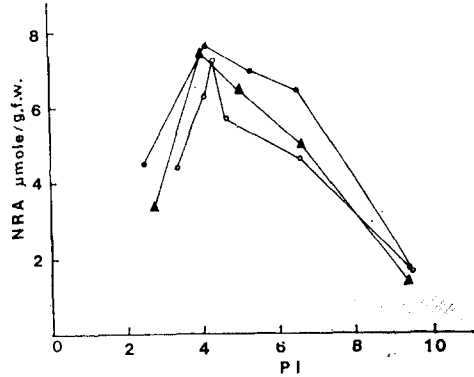


Fig. 2. The relationships between NRA and Plastochron index (PI) for soybean leaves treated with NO_3^- (●), NH_4^+ (○) and control (▲).

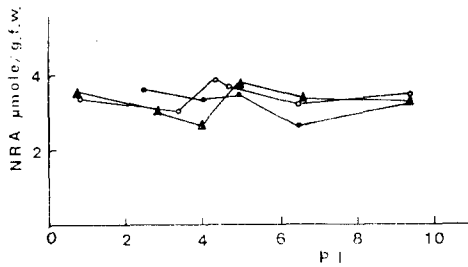


Fig. 3. The relationships between NRA and plastochron index (PI) for soybean stems treated with NO_3^- (●), NH_4^+ (○) and control (▲).

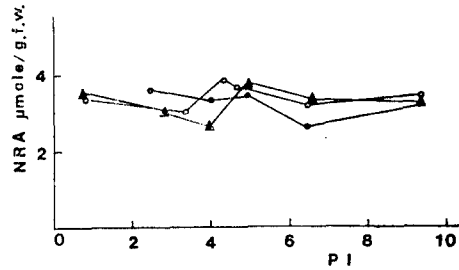


Fig. 4. The relationships between NRA and plastochron index (PI) for soybean roots treated with NO_3^- (●), NH_4^+ (○) and control (▲).

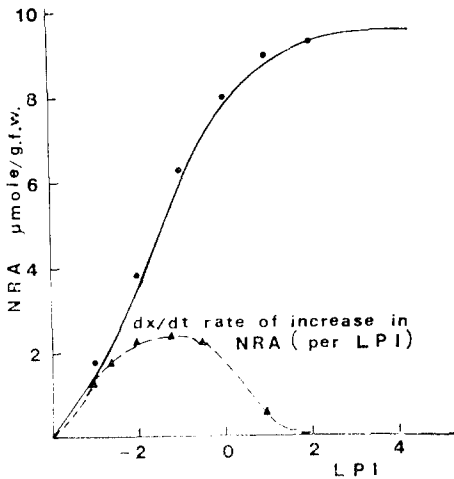


Fig. 5. Average nitrate reductase activity (solidline) and instantaneous rate of increase in the activity to LPI soybean leaves treated with NO_3^- . The maximum rate of activity appears at LPI -1.5.

털비름도 명아주와 마찬가지로, 음의 LPI를 갖는 잎은, 높은 NRA를 나타냈을 뿐 아니라, 질산염 처리군이 대조군이나 암모니움군보다 높았다(Table 2). 특히, 6월 10일의 LPI는 모든 처리군에서 음과 양의 값을 갖는 잎 사이에 NRA의 차가 크게 나타났다. Fig. 1은 콩 유식물의 PI 4.0을 갖는 제 1 삼엽(first triolate leaf)의 NRA의 일변화를 표시하였다. NRA는 최고 값이 14:00시에, 최소값이 4:00시에 나타나는 일변화를 보여주었다.

콩 잎의 PI에 따른 각 처리군의 NRA의 변화를 Fig. 2에 표시하였다. PI 4.0에서 NRA는 가장 높고 PI가 그보다 크거나 작으면 감소하였다. 질산염 처리군이 다른 군보다 NRA는 높았고, PI 9.5 이상에서 NRA는 측정하기 어려웠다.

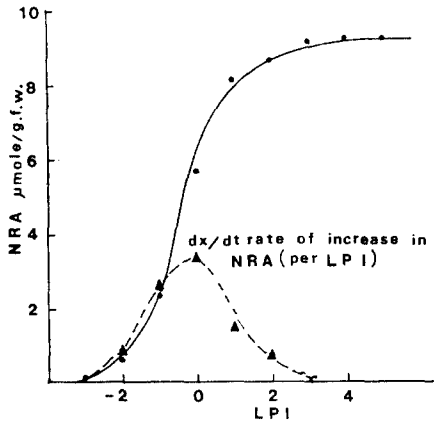


Fig. 6. Average nitrate reductase activity (solid line) and instantaneous rate of increase in the activity to LPI soybean leaves treated with NH_4^+ . The maximum rate of activity appears at LPI 0.

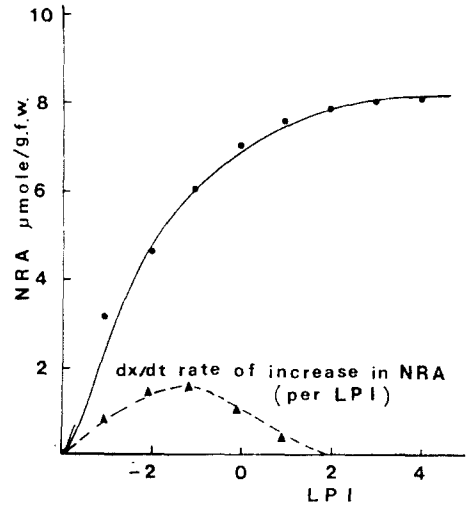


Fig. 7. Average nitrate reductase activity (solid line) and instantaneous rate of increase in the activity to LPI soybean leaves treated with control. The maximum rate of activity appears at LPI -1.0.

Fig. 3과 4는 각각 PI의 변화에 따른 콩 줄기와 뿌리의 NRA를 도시한 것이다. 줄기와 뿌리의 NRA는 PI에 따른 차이나 각 처리군 사이의 차이가 없었다.

Fig. 5는 질산염 처리를 한 콩의 LPI에 따른 NRA의 변화이다. NRA는 LPI의 증가에 따라 Logistic 곡선을 나타냈으며, NRA/LPI의 순간증가율(instantaneous rate of increase) 곡선에서 판정할 LPI -1.5에서 그 활성이 최고로 나타났다.

Fig. 6과 7은 각각 콩 잎의 암모니움 처리군과 대조군의 LPI 변화에 따른 NRA 변화와 단위 LPI 변화에 대한 NRA의 증가 속도이다. 암모니움 처리군 또는 대조군에 있어서 NRA의 최고의 활성은 각각 LPI 0과 LPI -1.0에서 나타났다.

논 의

생리적 특성을 측정하는 PI의 유용성은 NRA 분석 결과로 증명되었다. 식물의 연령에 따른 NRA에 대한 보고(Radin *et al.*, 1978; Streit and Feller, 1983; Oaks *et al.*, 1972)는 대부분 다양한 성장 단계 사이의 정확한 연령 차이의 측정없이 분석되었지만, 어린 조직에서, 높은 NRA를 나타내고 있었다. 이 같은 보고들은 본 연구의 결과와 일치하였다.

털비름, 명아주 및 콩 식물에서의 NRA 측정 결과, 낮은 PI 또는 LPI에서 높은 NRA가 나타나는 것이 확인되었다. 위의 결과는 낮은 PI가 조직의 연령이 낮음을 의미한다.

특히, Table 1에서, 야외의 명아주의 NRA는 실험실내의 질산염 처리군의 어린 잎의 것 만큼 높은 값을 가졌다. 이 결과는 야외의 식물 잎이 강한 햇빛을 받아 NRA가 높아진 것으로 사료된다. 왜냐하면 실험실내의 조도는 야외의 1/3이었기 때문이다. 이러한 사실은 콩의 NRA 일 변화가 14:00시에 최고에 도달하는 사실도 뒷받침하고 있다. 이 결과는 방사에 의해 NRA가 높아진다는 Nicholas *et al.*(1976)과 Reed and Hageman(1980)의 결과와 일치된다.

한편, 털비름에서 6월 10일의 음·양의 LPI 잎 사이의 NRA 차가 가장 컸는데, 그 이유는 성숙한 잎의 NRA가 현저히 낮아지기 때문이며, 개체가 성숙함에 따라 양의 LPI를 갖는 잎이 많아지기 때문이다.

본 연구의 결과 명아주는 plastochron 12 정도에서 첫 번째 마디에서 측지가 나오기 시작하였으며, 측지에서 출현한 어린 잎과 주지에서 어린 잎사이의 NRA 차는 측지가 높았다. ($10.16 > 7.21 \mu\text{mole/g.f.w.}$) 이 때는 개화기로서 PI 12.0 이상에서는 측지의 출현 이후로 주지의 성장이 멈추었기 때문이다.

또한 Fig. 2에서 PI 4.0의 콩 잎은 가장 높은 NRA를 갖는데, 이 것은 제 1 삼엽에서 가장 높은 NRA가 분석되었음을 제시한 Carelli *et al.*(1981)의 보고와 상반된다. 그리고 PI 9.5 이후의 콩 식물은 NRA가 급격히 저하되었는데, 이는 개화와 관련된 결과로 사료된다. 즉, 콩 식물은 PI 9.5에서 개화가 시작되었고, 잎에서는 그 생장이 멈추었기 때문이다. 일반적으로 NRA는 질산염 처리군에서 높게 나타났고(Macleod and Ormrod, 1985; Handa *et al.*, 1985; Leyshon *et al.*, 1980), 또 식물의 종이나 기관에 따라 다르다(Reed and Hageman, 1980). 옥수수나 강낭콩은 잎에서 (Shaner and Boyer, 1976; Mori and Sodek, 1983), *Rumex obtusifolius*는 lamia에서 (Melzer *et al.*, 1984) NRA가 높음이 보고되었다.

본 연구의 콩 식물에서는 잎의 NRA가 가장 높은 값을 나타냈다. Fig. 5, 6 및 7은 LPI에 따른 NRA를 조사한 결과, 질산염 처리군의 낮은 LPI에서 최고의 NRA가 나타났다. 이것은 결국 질산염에 의해 NRA가 보다 빨리 촉진된다는 보고와 일치된다. 그러므로, LPI가 식물의 생리적 연구에 응용될 수 있음을 암시한다.

적 요

털비름, 명아주 및 콩에서 PI (또는 LPI)의 유용성이 NRA 측정 결과 증명되었다. 털비름, 명아주 및 콩에서의 NRA 측정은 모두 질산염 처리군에서 높은 값을 나타냈다. 또 reference length를 기준으로 음의 LPI 잎이 양의 LPI 잎에 비해 NRA가 높았다. 콩 잎의 NRA는 PI 4.0에서 가장 높았고, 줄기와 뿌리에서의 NRA는 PI에 따른 변화가 없었다. 이상의 결과로부터 PI와 LPI는 생리적 성장 단계에 영향을 미치는 여러 환경변이의 효과 연구에 적용될 수 있음이 증명되었다.

인 용 문 헌

- Beevers, L. and R. H. Hageman. (1969). Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **20** : 495~522.
- Carelli, M. L. and A. C. Magalhaes. (1981). Development of nitrate reductase activity in green tissues of soybean seedlings (*Glycine max* Merr.). *Z. Pflanzen Physiol. Bd.*, **104** : 17~24.
- Crafts-Brander, S.J. and J. E. Harper. (1982). Nitrate reduction by roots of soybean seedlings (*Glycine max* Merr.). *Plant Physiol.*, **69** : 1298~1303.
- Erickson, R. O. and F. J. Michelini. (1957). The plastochron index. *Amer. J. Bot.*, **44** : 297~305.
- Gebauer, G., A. Melzer and H. Rehder. (1984). Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. I. Differences in organs and diurnal changes. *Oecologia*, **63** : 136~142.
- Handa, S., D. M. Huber, H. L. Warren and C. Y. Tsai. (1985). Nitrogen nutrition and N-assimilation in Maize seedlings. *Can. J. Plant Sci.*, **65** : 87~93.

- Lamoreaux, R. J., R. C. William and K. M. Brown. (1978). The plastochron index : A review after two decades of use. *Amer. J. Bot.*, **65** : 586~593.
- Leyshon, A. J., C.A. Campbell and F. G. Warder. (1980). Comparison of the effect of NO_3 and $\text{NH}_4\text{-N}$ on growth, yield and yield components of Manitou spring wheat and conquest barley. *Can. J. Plant Sci.*, **60** : 1063~1070.
- Macleod, K. C. and D. P. Ormrod. (1985). Response of white bean to ammonium of nitrate nutrition at three temperatures. *Can. J. Plant Sci.*, **65** : 201~205.
- McCauley, M. and J. Croxdale. (1984, a). Establishment of a plastochron index for *Dianthus chinensis* L. *Amer. J. Bot.*, **71** : 1373~1381.
- McCauley, M. and J. Croxdale. (1984, b). The relationship between the plastochron index and the structure of the apical meristem of *Dianthus chinensis* L. *Amer. J. Bot.*, **71** : 1382~1390.
- Melzer, A., G. Gebauer and H. Rehder. (1984). Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. II. Response to nitrate starvation and nitrogen fertilization. *Oecologia*, **63** : 380~385.
- Michelni, F. J. (1958). The plastochron index in developmental studies of *Xanthium italicum* Moretti. *Amer. J. Bot.*, **45** : 525~533.
- Mori, T. E. S. and L. Sodek. (1983). Nitrogen economy of a single fruiting node of soybean. *Z. Pflanzen Physiol. Bd. 111. s.*, 29~38.
- Nicholas, J. C., J. E. Harper and R. H. Hageman. (1976). Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* Merr.) I. Effects of light and temperature. *Plant Physiol.*, **58** : 731~735.
- Nilsen, E. T. and W. H. Muller. (1981). The influence of low plant water potential on the growth and nitrogen metabolism of the native California shrub *Lotus scoparius* (Nutt in T & G) Otteley. *Amer. J. Bot.*, **68** : 402~407.
- Oaks, A., W. Wallace and D. Stevrens. (1972). Synthesis and turnover of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, **50** : 649~654.
- Radin, J. W. (1974). Distribution and development of nitrate reductase activity in germination cotton seedlings. *Plant Physiol.*, **53** : 458~463.
- Reed, A. J. and R. H. Hageman. (1980). Relationship between nitrate uptake, flux and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.*, **66** : 1179~1183.
- Ruffy, T. W. JR., C. D. Raper, JR. and W. A. Fackson. (1983). Growth and nitrogen assimilation of soybeans in response to ammonium and nitrate nutrition. *Bot. Gaz.*, **114** : 466~470.
- Shaner, D. L. and J. S. Boyer. (1976, a). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation of nitrate flux. *Plant Physiol.*, **58** : 499~504.
- Shaner, D. L. and J. S. Boyer. (1976, b). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Plant Physiol.*, **58** : 505~509.
- Smith, J. L. and E. L. Rice. (1983). Differences in nitrate reductase activity between species of different stages in old succession. *Oecologia*, **57** : 43~48.
- Streit, Luc and Urs Feller. (1983). Nitrogen-metabolizing enzymes from bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.): Stability *in vitro* and susceptibility to proteolysis. *Z. Pflanzen Physiol. Bd. 111. S.*, 19~27.
- Winter, K. H. Usuda, M. Tsuzuki, M. Schmitt and G. E. Edward. (1982). Influence of nitrate and ammonia on photosynthetic characteristics and leaf anatomy of *Moricandia arvensis*. *Plant Physiol.*, **70** : 616~625.