

싸리(*Lespedeza bicolor* Turcz.)의 공생 질소고정활성과 생육환경요인의 변화

宋承達·金芳鎰

(경북대학교 자연과학대학 생물학과)

Changes of Nitrogen-Fixation Activity and Environmental Factors of Growth in *Lespedeza bicolor* Turcz

Song, Seung-Dal and Bang-II Kim

(Department of Biology, Kyungbook National University, Taegu)

ABSTRACT

The nitrogen fixation activity and environmental factors of *Lespedeza bicolor* Turcz, forming annual root nodules by symbiotic *Rhizobium* sp. were analyzed in the field conditions during the growing period. Seasonal changes of N_2 -fixation activity showed the maximum value of $120 \mu M C_2H_4 \cdot nodule \text{ g fw}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ during the active growing period (June) and varied significantly depending on the growth phase and environmental factors. The maximum activities were attained at the conditions of pH 7, 30°C of temperature, 18 Kpa of oxygen partial pressure and inhibited by water stress and nitrogen sources. The habitat soil was weak acidic and poor in nitrogen, phosphorus and organic matter contents. The leaf area ratios and chlorophyll contents were ranged from 442 to 483 $cm^2 \cdot g \text{ dw}^{-1}$ and from 33 to 38 $\mu g \text{ chl} \cdot cm^{-2}$. Nitrogen contents in each organ showed the maximum of 46, 19 and 11 $mg \cdot g \text{ dw}^{-1}$, respectively for leaf, root and stem in the early period. The highest phosphorus contents were 4.2, 1.2 and 0.6 $mg \cdot g \text{ dw}^{-1}$, respectively for leaf, root and stem in early growing period. The allocation ratios of nitrogen quantity showed 60% for leaves and 73% for roots during the active and late growth period, and 22% for stems in average. The allocation ratios of phosphorus quantity showed 58% for leaves during the most productive period, 70% for roots in the pre-growth stage and 26% for stems in average.

서론

생물적질소고정은 *nif* 유전자에 의해 nitrogenase reductase와 nitrogenase 효소를 형성하여 대기중의 질소가스를 암모니아로 고정하는 것이다. 이들은 모두 원핵생물에 속하는 것으로서 호기성 및 혐기성 세균, 광합성세균, 남세균 등이 있으며, 생태계내에서 자유생활하는 것과 다른 고등식물과 공생하는 것이 있다. 특히 콩과식물에서는 공생균인 *Rhizobium* sp. 등에 의해 근류를 형성하여 효율적인 질소고정과 숙주의 광합성이 함께 촉진되는 기능에 의해 착박한

토양환경에서도 생산성이 높다(Beaty *et al.*, 1987; Postgate, 1982; Sprent, 1979; Subba-Rao, 1980).

한편 콩과식물에 대한 *Rhizobium* sp. 균의 접종과 근류 형성 및 질소고정활성에 대한 가용성의 무기질소화합물인 NO_3^- 와 NH_4^+ 의 저해효과는 많은 연구자에 의해 검토되어 왔다(Evans *et al.*, 1973; Hatfield *et al.*, 1974; Semu and Hume, 1979; Streeter, 1979, 1985). 또한 빛, 수분함수량, 산소농도, 온도, pH 등의 환경요인이 수종의 콩과의 작물의 질소고정활성에 미치는 영향에 대해서 많은 보고가 있다(Cassman *et al.*, 1980; Grove and Malajezuk, 1987; Pandey *et al.*, 1984; Rainbird *et al.*, 1983; Sinclair and Weisz 1985). 그리고 질소고정활성의 일주기변화가 식물종에 따라

본 연구는 1991년도 학술진흥재단의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

양상이 다른 사실도 알려지고 있다(Hansen *et al.*, 1987; Weisz and Sinclair, 1988).

초지 및 산야지의 중요 구성종인 싸리나무속(*Lespedeza*)은 사지에 널리 분포하는 낙엽관목으로 내건성 및 내화성이 크고 산화지의 2차 천이의 초기단계에서 대표적 우점종이다. Song과 Monsi(1974)는 싸리의 인공군락의 건물량과 질소량에 관한 연구에서 성장과정과 생산구조의 변화를 3년간 분석하여 건물과 질소의 현존량과 동화량에 있어서 포화군락이 형성되는 것을 밝혔으며 근류의 형성이 지하부의 질소축적량의 변화와 지상부의 에취처리에 따른 광합성 생산물의 공급량의 변화에 의해 영향을 받는 것을 밝혔다. 그러나 질소고정량에 대해서는 군락생장에 따른 총질소량의 변화에 의해 간접적으로 분석하였다. 본 연구에서는 싸리의 생육기간중 근류의 질소고정활성의 계절적 변화 및 환경요인의 조절에 따른 변화를 정량적으로 분석하며 식물체의 각 기관의 질소, 인함량 및 염록소함량과 염면적비 그리고 근권환경요인 등의 계절적변화를 분석하였다.

재료 및 방법

대구직할시의 동남부에 소재하는 형재봉(표고 190 m, E 128°39'30", N 35°51'30") 서쪽 사면에 소나무가 혼생하는 싸리(*Lespedeza bicolor* Turcz.) 군집을 조사구로 정하였다. 생육기간중 매 2주 간격으로 높이가 100-150 cm 정도되는 싸리를 임의 3반복으로 지상부와 지하부를 각 기관별로 채취하였다.

싸리 근류는 활성의 손실을 방지하기 위해 채집 후 즉시 10 ml의 vial에 넣고 아세트산을 vial 부피의 10%로 주입하여 현지의 온도에서 1시간 동안 배양시킨 후 시간별로 주사기로 0.5 ml를 채취하여 실험실에 옮긴 다음 Porapak R column을 이용한 Shimadzu GC 8 APF 가스크로마토그래프로 환원된 에틸렌양을 정량하고 시간당 단위생량에 대해 활성을 분석하였다(Evans *et al.*, 1973; Wych and Rains, 1978).

환경요인에 따른 근류의 질소고정활성에 미치는 영향은 실험실에서 10 ml vial에 근류를 일정량씩 넣은 후: (1) pH 3-9로 조절된 buffer 용액을 0.5 ml씩 넣어 처리한 것, (2) 온도 범위 5-40°C로 항온처리한 것, (3) 산소농도 0-20 Kpa이 되도록 manifold에서 처리한 것, (4) 토양의 대견량함수량을 3-24% 범위로 처리한 것, (5) NO₃⁻와 NH₄⁺를 각각 1, 3 mM로 처리한 것에 대하여 각각 아세트산 환원법으로 변화를 비교 분석하였다.

식물체는 잎, 줄기 및 뿌리의 기관별로 분리하여 생체량을 측정하고, 80°C에 72시간 동안 건조시켜 분말로 하여 각종 분석에 사용하였다. 염록소함량의 측정은 일정량의

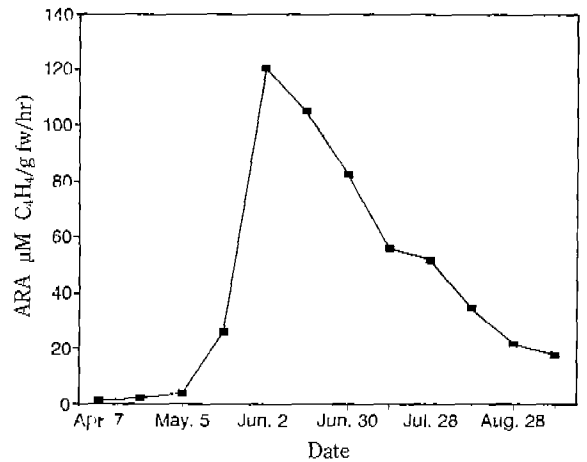


Fig. 1. Seasonal changes of acetylene reduction activity (ARA) in the root nodules of *Lespedeza bicolor*.

잎을 DMSO법(Hiscox and Israelstam, 1979)을 이용하여 60°C에서 24시간 추출하여 Spectrophotometer로 측정하여 Arnon의 방법(Arnon, 1949)으로 정량하였다. 염면적은 엽장과 엽폭을 측정하여 비중법으로 측정하였다. 근권의 토양은 풍전토 20 g에 대해 2.5배의 증류수로 현탁하여 pH를 측정하고 나머지는 건조한 후 분쇄하여 각종 분석에 사용하였다.

각 기관의 총질소함량은 개량된 micro-Kjeldahl법(Song and Monsi, 1974)으로 측정하였다. 총인의 함량은 550°C 전기로에서 6시간 처리하여 최분량을 측정할 후, Vanado molybdo phosphoric acid법(Franson, 1976)으로 발색하여 A₄₆₀에서 정량하였다. 토양의 경우는 Ascorbic acid법(Greenberg *et al.*, 1985)으로 발색하여 A₅₈₀에서 정량하였다. 토양의 NO₂⁻-N과 NH₄⁺-N의 함량은 각각 Gries Romijn법(Greenberg *et al.*, 1985)과 Nessler법(Nichols and Foote, 1931)으로 발색시켜 A₅₃₄와 A₄₃₀에서 정량하였다. 모든 시료의 분석은 3반복으로 측정하여 평균치를 사용하였다.

결과 및 고찰

싸리 근류의 질소고정활성의 계절변화. 싸리군락에서 생육기간중 근류활성의 계절변화는 Fig. 1과 같다. 생육초기(4월)에서 5월 중순까지는 근류의 형성발달이 활발하지 못하였고, 낮은 질소고정활성을 보였으나 잎의 생장이 왕성한 6월초에서 6월 중순에는 최대의 아세트산 환원활성인 120 μM C₂H₄·g fw⁻¹·hr⁻¹에 달하였으며, 이는 다른 콩과 식물의 질소고정활성과 유사한 값이었다(Turner and Gibson, 1980; Libardi *et al.*, 1982). 성장후기에는 근류의 활

Table 1. Effects of temperature, pH, oxygen, water and nitrogen gradients on the acetylene reduction activity (ARA) of the root nodules of *Lespedeza bicolor* (Unit: $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g fw}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)

		Temperature (°C)									
		5	10	15	20	25	30	35	40		
A	R A	6	32	67	92	105	125	68	2		
		pH									
		3	4	5	6	7	8	9			
A	R A	7	44	60	102	125	75	24			
		Oxygen (Kpa)									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
A	R A	1	2	4	6	8	16	30	102	122	115
		Water content (%)									
		3	6	9	12	15	18	21	24		
A	R A	5	18	53	96	120	115	103	96		
		NO ₃ ⁻ (mM)				NH ₄ ⁺ (mM)					
Control		1		3		1		3			
A	R A	100		15		4		112		40	

성이 점차 감소하였고, 근류의 형태도 분해되는 현상이 있었다. 피음지에서는 근류의 형성이 2주 정도 지연되었다. 싸리의 근류는 1년생으로서 생육기가 지나면 모두 소실되고 생육후기에 제 2의 높은 활성을 나타내는 아카시나무와 오리나무 등의 다년생 근류와는 달랐다(Högborg, 1982; Hong and Song, 1990).

싸리 근류의 질소고정활성과 환경요인. 온도구배에 따른 근류활성은 온도범위 5-40°C에서 비교적 넓은 활성의 적응을 보였으며, 최적온도는 30°C였다(Table 1). 그러나

25°C 이하의 저온과 35°C 이상의 고온에서는 활성이 크게 저해되었고, 5°C 이하와 40°C 이상에서는 완전히 소실되었다. Rainbird 등(1983)은 Cowpea의 질소고정율이 15-38°C 범위에서 거의 활성의 변화가 없었다고 하였고, Hong과 Song(1990)은 아카시나무의 질소고정율이 25°C에서 최대 활성이 나타남을 보고하였으며, 식물종의 생육특성에 따라 온도특성이 다른 것으로 생각된다.

pH에 따른 근류의 활성변화는 pH 7의 중성에서 최대치를 보였으며, pH 3에서 9까지의 범위에서 산성 또는 알칼리성 환경처리에 의해 급격한 저해를 나타내었다(Table 1). 토양의 pH는 식물체의 성장과 질소고정활성에 영향을 주는 것으로 알려지고 있으며, 한편 알팔파에서는 pH 6 이하의 산성이나 8 이상의 알칼리성에서 *Rhizobium* 균의 흡착이 저해되고 뿌리에서 유리되어 근류형성이 저해된다고 알려지고 있다(Caetano-Anolles, *et al.*, 1989).

산소구배가 근류의 질소고정활성에 미치는 영향은 혐기 상태 및 10 Kpa O₂ 이하의 미호기적 조건에서 활성이 크게 저해되었고, 14 Kpa O₂ 이상에서 급격히 활성이 증가하여 18 Kpa O₂에서 최대치를 나타내었다(Table 1). 그러나 산소결핍에 의한 활성억제는 가역적인 것으로서 King 등(1988)은 활성이 소실된 근류에 산소를 공급하였을 때 4-8시간 후에는 회복되었다고 하였다. 한편 질소고정효소의 활성은 산소에 대해서 감수성이 크고 산소에 의해 활성을 잃게 되나, 근류에서는 Leghemoglobin과 전자전달 효소계에 의한 산소방어기구를 통하여 nitrogenase의 환원상태를 효율적으로 보존하므로서 완전 호기상태에서 에너지 공급과 환원력을 최대로 이용하여 최적의 질소고정활성을 유지하는 것이다(Hartmann *et al.*, 1985). 한편 뿌리에 대한 산소의 공급은 지상부의 상태에 따라 영향을 받게 되며, 야생의 알팔파 근류에서는 지상부의 제거에 의해 산소공급이 50% 감소를 보였다(Denison, *et al.*, 1992).

근류의 활성에 대한 토양수분조건의 영향은 9% 이하(1.5 Mpa)의 수분 stress에서 활성이 현저히 저해되었다(Table

Table 2. Soil characteristics of *Lespedeza bicolor* community

Items	Apr.		May		Jun.		Jul.		Aug.		Sep.	
	7	21	5	19	2	16	30	14	28	12	28	
pH	4.8	4.6	4.6	3.9	4.6	4.3	4.6	5.0	4.6	4.5	4.6	4.5
Temp.(°C)	9	10	12	15	18	19	20	22	24	27	23	24
W.C.(%)	19	14	13	14	18	20	18	21	17	9	14	15
O.M.(%)	6	6	9	7	8	6	7	8	7	10	9	8
PO ₄ ($\mu\text{g P} \cdot \text{g dw}^{-1}$)	2.0	15.0	1.8	2.5	2.1	2.4	2.5	25.0	1.1	0.4	1.3	1.1
NO ₂ ⁻ ($\text{ng N} \cdot \text{g dw}^{-1}$)	0.16	0.06	0.06	1.81	0.02	0.06	0.02	0.05	0.03	0.12	0.23	0.02
NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g N} \cdot \text{g dw}^{-1}$)	14	15	13	14	8	12	16	19	18	11	12	8
T.N.($\text{mg N} \cdot \text{g dw}^{-1}$)	1.7	1.5	1.2	1.1	1.7	2.5	2.8	2.9	1.5	2.2	1.9	2.1

Table 3. Seasonal changes of leaf area ratio and chlorophyll content of *Lespedeza bicolor* community

	Jun.		Jul.		Aug.		
	30	14	28	12	28		
LAR (cm ² ·g dw ⁻¹)	442	444	448	474	483		
	Jun.		Jul.		Aug.		Sep.
	16	30	14	28	12	28	12
Chl. (µg Chl·cm ⁻²)	37	35	33	34	38	33	36

1). Pandey 등(1984)은 토양수분의 결핍은 콩류의 광합성에 대한 저해작용 보다 질소고정활성에서 더 민감한 저해가 있다고 하였다. 질소원처리에 의한 활성의 변화에서는 NO₃⁻ 처리에 의한 저해작용이 NH₄⁺에 비해 현저하였으며 (Table 1), 목본류의 콩과식물에 있어서 근류활성이 1 mM

이하의 암모니아 처리에 의해 촉진된다는 Grove와 Malajezuk(1987)의 보고와 일치하였다.

근권토양환경의 분석. 씨리의 생육기간중의 토양환경의 특성은 Table 2와 같다. 씨리 생육지의 토양은 암반이 노출되고 토층이 5-10 cm 정도의 박층토이고 남적색으로서 생육기간중 pH 3.9-5.0 범위의 산성토양이었다. 토양의 함수량(WC)은 5월 초와 8월 중순의 건조기에 최소치(9-13%)로서 수분 stress의 영향이 있었으며, 강우량이 많은 6월-7월에는 18-21%로서 최적상태였다. 토양온도(10 cm 깊이)는 4월 초의 9°C로부터 8월 중순의 최고온도인 27°C 사이에 분포하였다. 토양유기물(OM)의 함량은 생육초기(4월)에는 최소치 6%였으나, 8월말의 생육후기에는 10%로 증가하였다. NO₂⁻-N와 NH₄⁺-N의 함량은 생육기간중 각각 0.02-1.81 ng·g dw⁻¹와 8-19 µg·g dw⁻¹의 범위에서 변화할 보였다. 총질소의 함량은 1.1-2.9 mg N·g dw⁻¹의 범위에서 변화를 보였다. 총 인의 함량은 기간중 0.4-25.0 µg P·g dw⁻¹의 범위에서 주기적인 큰 변이를 보였다.

씨리의 기관별 성분분석. 씨리의 엽면적비의 변화는

Table 4. Seasonal changes of water, nitrogen, phosphorus, ash contents and the allocation ratios of N, P and DW in each organ of *Lespedeza bicolor*

Items	Apr.		May		Jun.		Jul.		Aug.		Sep.		
	7	21	5	19	2	16	30	14	28	12	28	12	
W.C. (%)	Leaves	—	340	230	210	205	195	240	242	226	184	178	166
	Stems	82	85	94	98	95	97	100	104	98	92	87	84
	Roots	115	95	102	120	106	136	132	114	184	140	98	93
N mg·g ⁻¹	Leaves	—	46	38	29	27	30	28	26	24	23	26	27
	Stems	8	9	11	10	6	7	6	7	8	9	8	9
	Roots	19	14	12	10	8	9	10	8	12	10	13	11
P mg·g ⁻¹	Leaves	—	4.2	3.0	1.5	1.6	1.2	1.4	1.4	1.3	1.2	1.0	0.9
	Stems	0.2	0.4	0.6	0.5	0.3	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4	0.3	0.3
	Roots	1.2	0.6	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	0.4	0.7	0.9	0.8	0.6
Ash (%)	Leaves	—	5.0	4.7	3.8	3.5	4.3	5.0	4.9	5.2	5.3	6.2	6.0
	Stems	1.7	2.0	2.3	2.5	2.2	2.3	1.8	1.9	2.7	2.9	2.4	2.6
	Roots	4.2	3.5	3.8	3.4	3.9	4.0	5.1	6.7	6.4	4.9	4.9	8.1
Allocation ratios													
DM (%)	Leaves	0	3	4	23	23	27	29	25	32	29	27	—
	Stems	55	30	40	32	55	49	33	31	46	49	29	—
	Roots	45	67	54	45	22	24	38	44	22	22	44	—
N (%)	Leaves	0	10	15	46	57	60	56	54	60	58	45	—
	Stems	32	17	41	21	24	21	13	13	20	28	17	—
	Roots	68	73	44	33	19	19	31	33	20	14	38	—
P (%)	Leaves	0	22	30	35	55	50	55	58	56	43	40	—
	Stems	30	18	30	42	28	31	22	17	26	30	17	—
	Roots	70	60	40	23	17	19	23	25	18	27	43	—

442-483 $\text{cm}^2 \cdot \text{g dw}^{-1}$ 로서 비교적 큰 값이었다(Table 3), 이는 소나무에 의한 피음 때문인 것으로 생각된다(Song and Monsi, 1974). 잎의 엽록소 함량은 33-38 $\text{g chl} \cdot \text{cm}^{-2}$ 의 범위에서 변화를 보였다(Table 3).

싸리의 잎의 함수량은 생육초기의 34%에서 생육후기에는 166%로 감소하였다(Table 4). 생육기간중 뿌리에서는 93-184%, 줄기에서는 82-104% 범위에서 변화하였다. 특히 생육중기 이후의 이들 값은 같은 근집내에 있는 아까시나무에 비해 반 정도의 값이었다(Hong and Song, 1990).

싸리의 잎의 총질소함량은 신엽이 나오는 생육초기에 최고치 4.6%에서 점차 감소하여 후기에는 2.3%로 변화하였다. 줄기에서는 생육기간중 0.6-1.1% 범위의 낮은 함량 이었고, 뿌리에서는 생육후기기에 1.9%의 최고치를 보였으나, 생육기간중 지상부에 전류되어 0.8%로 감소하였다(Table 4). 같은 콩과의 아까시나무의 각 기관의 총질소함량은 싸리에 비해 1.5배 정도 높고, 질소이용률의 종특성을 볼수 있다(Hong and Song, 1990). 잎의 총인함량은 생육초기(4월)에 0.42%의 최고치에서 생육후기에 0.09%로 변화하였고, 뿌리는 생육초기에는 0.12%에서 점차 감소하여 0.04%로 변화하였으며, 줄기는 0.06-0.03%의 범위에서 변화를 보였다. 싸리의 각 기관별 회분량의 계절 변화(Table 4)는 아까시나무(7-9%)에 비해 반 정도의 낮은 값이었다(Hong and Song, 1990). 잎과 뿌리에서는 생육초기에는 3.5%였으나, 점차 증가하여 생육후기에는 6.6% 이었다. 줄기에서는 1.7-2.9%, 뿌리에서는 생육초기의 3.4%에서 후기에 6.7%로 증가하였다.

생육기간중 잎에 전류되는 물질의 분배율을 보면 건물량은 최대성장기에 32%, 질소(N)는 60%, 인(P)은 58%로서 광합성 기관에 질소와 인의 축적현상을 보였다. 줄기에서는 건물량, 질소 및 인의 평균분배율이 각각 42, 22 및 26% 이었다. 뿌리에서는 건물량 67%, 질소 73%, 인 70%의 최고치를 보였고, 특히 생육후기기에 질소와 인의 축적을 보였다(Table 4).

적 요

형제봉 서쪽 사면에 소나무와 혼생하는 싸리군집의 생육기간중 공생근류의 질소고정활성의 계절변화와 환경요인의 특성을 분석하였다. 근류는 1년생으로서 그 활성은 최대성장기인 6월중에 최대치 120 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{nodule g fw}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 이었고, 생육후기에는 활성이 소실되었다. 질소고정활성에 대한 최적의 pH, 온도 및 산소농도는 각각 중성, 30°C 및 18 Kpa O_2 의 호기상태였으며, 토양수분의 stress는 1.5 Mpa에서 56%의 활성감소를 보였으며, NO_3^- 와 NH_4^+ 1 mM 처리는 각각 85%와 12%의 활성저해를 보였다. 토양환경은 약산성으로 질소, 인 및 유기물함량이 빈약하였고

잎의 엽면적과 엽록소함량은 각각 440-483 $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 와 33-32 $\mu\text{g chl} \cdot \text{g}^{-1}$ 이었다. 잎, 뿌리 및 줄기의 질소함량은 각각 46, 19 및 11 $\text{mg N} \cdot \text{g dw}^{-1}$, 인은 4.2, 1.2 및 0.6 $\text{mg} \cdot \text{g dw}^{-1}$ 이었고, 각 기관별 질소와 인의 분배율은 잎에서 60, 59%, 뿌리에 73, 70% 그리고 줄기에 22, 26%이었다.

참 고 문 헌

- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Beatty, E.R., K.H. Tan, R.A. McCreery and J.D. Powell. 1987. Yield and N content of closely clipped bahiagrass as affected by N treatment. *Agron. J.* **72**: 56-60.
- Caetano-Anolles, G., A. Lagares and G.H. Favelukes. 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa root: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil.* **117**: 67-74.
- Cassman, K.G., A.S. Whitney and K.R. Stockinger. 1980. Root growth and dry matter distribution of soybean as affected by phosphorus stress, nodulation and nitrogen source. *Crop Sci.* **20**: 239-244.
- Denison, R.F., S. Hunt and D.B. Layzell. 1992. Nitrogenase activity, nodule respiration and O_2 permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil. *Plant Physiol.* **98**: 894-900.
- 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. *Agron. J.* **65**: 429-433.
- Franson, M.A. 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed., American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 476-478.
- Grove, T.S. and N. Malajezuk. 1987. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by forest legumes: Sensitivity to pre-harvest and assay condition. *New Phytol.* **106**: 115-127.
- Greenberg, A.E., R.R. Trussell and L.S. Clesceri. 1985. Standard methods, 16th American Public Health Association. pp. 404-450.
- Hansen, A.P., J.S. Pate and C.A. Atkins. 1987. Relationships between acetylene reduction activity, H_2 evolution and N_2 fixation in nodules of *Acacia* spp. experimental background to assaying fixation by acetylene reduction under field condition. *J. Exp. Bot.* **38**: 1-12.
- Hartmann, A., H. Fu, S.D. Song and R.H. Burris. 1985. Comparison of nitrogenase regulations in *Azospirillum brasilense*, *Altipoferum* and *A.amazonense*. In: *Azospirillum* III, K. Klingmüller (ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 116-126.
- Hatfield, J.L., D.B. Egli, J.E. Leggett and D.E. Peaslee. 1974. Effect of applied nitrogen on the nodulation and early

- growth of soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Agron. J.* **66**: 112-114.
- Hiscox, J.D. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the examination of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* **57**: 1332-1334.
- Högberg, P. 1982. Nitrogen fixation by the woody legume *Leucaena leucocephala* in Tanzania. *Plant and Soil.* **66**: 21-28.
- 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.
- 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.
- Libardi, P.L., R.L. Victoria, K. Reichardt and A. Cervellini. 1982. Nitrogen cycling in ¹⁵N-fertilized bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crop. *Plant and Soil.* **67**: 193-208.
- Nichols, M.S. and M.E. Foote. 1931. Distillation of free ammonia from buffered solutions. *Lnd. Eng. Chem. Anal. Ed.* **3**: 311.
- Pandey, R.K., W.A.T. Herrera, A.N. Villegas and J.W. Pendleton. 1984. Drought response of grain legumes under irrigation gradient: III. *Plant Growth.* *Agron. J.* **76**: 557-560.
- Postgate, J.R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press. 252 p.
- Rainbird, R.M., C.A. Atkins and J.S. Pate. 1983. Diurnal variation in the functioning of cowpea nodule. *Plant Physiol.* **72**: 308-312.
- Semu, E. and D.J. Hume. 1979. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N₂ fixation and yield of soybeans in Ontario. *Can. J. Plant Sci.* **59**: 1129-1137.
- Sinclair, T.R. and P.R. Weisz. 1985. Response to soil temperature of dinitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. *Agron. J.* **77**: 685-688.
- 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.* **11**: 283-332.
- Sprent, J.I. 1979. The biology of nitrogen-fixing organisms, McGraw-Hill Book Co. London, 196 p.
- Streeter, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* **63**: 478-480.
- Streeter, J.G. 1985. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. *Plant Physiol.* **77**: 321-328.
- Subba Rao, N.S. 1980. Recent advance in biological nitrogen fixation, Edward Arnold, London. 486 p.
- Turner, G.L. and A.H. Gibson. 1980. Measurement of nitrogen fixation indirect means. In, Methods for evaluating biological nitrogen fixation, F.J. Bergersen (ed.), John Wiley and Sons, Brisbane. pp. 111-138.
- Weisz, P.R. and T.R. Sinclair. 1988. Soybean nodule gas permeability, nitrogen fixation and diurnal cycles in soil temperature. *Plant and Soil.* **109**: 227-234.
- Wych, D.R. and D.W. Rains. 1978. Simultaneous measurement of nitrogen fixation estimated by acetylene-ethylene assay and nitrate absorption by soybeans. *Plant Physiol.* **62**: 443-448.

(1992. 8. 3 接受)