

窒酸態 窒素 供給이 알팔파의 뿌리혹 形成 및 葉中 Nitrate Reductase활성에 미치는 影響

李錫河*, 黃石重**

Response of Nodulation and Leaf Nitrate Reductase Activity of Alfalfa to Exogeneous Nitrate Supply

Suk Ha Lee* and Suk Joong Hwang**

ABSTRACT : A full understanding of the interdependence of leaf nitrate(NO_3^-) metabolism and symbiotic nitrogen(N_2) fixation in legume crops is needed to help maximize the use of both N sources as well as to improve forage quality through the inhibition of leaf nitrate accumulation. The present work examines the effects of added nitrate, the level of which are 0, 2, 4, 8 and 12mM, on the nodule formation and leaf nitrate utilization and on the possibility of inducing nitrate-toxicity to livestock in two alfalfa varieties, "Vernal" of grazing type and "Victoria" of hay type. Higher level of exogeneous nitrate resulted in the increased above-ground dry weight. Nodulation was inhibited severely when more than 8mM NO_3^- was supplied to alfalfa plants, and leaf nitrate reductase reached a maximum at 4mM nitrate supply. The V_{max} of nitrate reductase in leaves of Vernal was similar to that of Victoria, whereas the K_m of Vernal was higher than that of Victoria. High accumulation of leaf nitrate, 4×10^{-5} g/g leaf fresh weight, was shown at 12mM nitrate supply, which was thought to be not enough to induce nitrate-toxicity to livestock.

Alfalfa(*Medicago sativa* L.)는 多年生 豆科 牧草로서 다른 목초보다 단위면적당 蛋白質 生産量이 높고, 칼슘과 비타민을 많이 함유하고 있으며, 생초, 건초, 사일리지 등으로 다양하게 이용되고, 家畜의 嗜好性 및 消化率이 양호하여 목초의 여왕이라고 불리워진다¹⁾. 특히 알팔파는 다른 두과 작물과 마찬가지로 土壤중 根瘤菌과의 공생관계로 형성된 뿌리혹에서 空中窒素를 고정하여 이용하기 때문에 질소 시비량이 적게 요구되는 목초이다.

목초의 뿌리로 부터 흡수된 질소는 대부분이 酸化된 窒素化合物의 형태인 NO_3^- 로서, 낮은 窒酸態 窒素 공급수준에서는 뿌리에서 同化되지만, 시비량의 증가로 질산태 질소 수준이 높아지면 뿌리에서 흡수된 질산태 질소 일부는 뿌리에서 동화되

고, 나머지는 엽으로 전류되어 原形質에 있는 Nitrate reductase(NR)에 의하여 NO_2^- 로 환원된다²⁾. 환원된 NO_2^- 는 몇단계의 과정을 거쳐 암모니아로 환원된 다음 光合成에 의한 에너지를 이용하여 아미노산으로 변환되는 것으로 알려져 있다³⁾. 이러한 질산태 질소 동화 반응이 각종 환경 요인에 의하여 제약을 받을 경우에는 식물체내에는 窒酸鹽이 축적되는데, 특히 질소시비의 과다 혹은 광합성을 억제하는 기상요인으로 일조시간 부족 및 저온에 의하여 식물체내의 질산염 축적은 촉진된다고 하였다^{4,13)}.

목초에 다량으로 축적된 질산염이 反芻動物에 섭취되면 胃에서의 환원 작용으로 아질산염으로 되고, 아질산염이 혈액에서는 hemoglobin을 酸化

* 作物試驗場(Crop Experiment Station, Suwon 441-100, Korea)

** 畜産試驗場(Livestock Experiment Station, Suwon 441-350, Korea) <93. 3. 31 接受>

시키며 酸素 운반이 불가능한 methemoglobin을 생성하여 呼吸障礙(methemoglobinemia)를 유발하게 되어 流産, Vitamin A 결핍, 乳生産量의 감소나 심할 경우에는 斃死하는 경우도 있다^{6,13)}. 일반적으로 사료 건물중에 질산태 질소가 0.208% 이상 함유되어 있을때 家畜 毒性을 가져 오는 것으로 알려져 있으나²⁾ 그 범위는 草種, 질산염의 종류, 가축의 섭취속도 등에 따라서 차이가 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾.

한편 토양중 질산태 질소가 두과작물의 뿌리혹 형성^{4,5,7,11,12)} 및 空中窒素 固定能力^{8,9,10)}을 저해하는 현상은 널리 보고되어 있어, 적정질소 시비에 의한 효율적인 생물학적 질소 고정능력을 유도하는 것이 바람직하다 하겠다. 본 연구의 목적은 0,2,4,8,12mM 의 다섯 수준으로 질산태 질소를 공급하였을 때 알팔과 엽중 窒酸態 窒素 還元能力과 NO₃⁻ 축적에 의한 목초 품질을 평가하고, 효율적인 뿌리혹 착생과 목초의 생산성 향상을 위한 질산태 질소 공급수준을 추정함에 있다.

材料 및 方法

공시된 알팔과 品種은 放牧型 “Victoria” 와 乾草型 “Vernal”로서, 공시종자는 播種前 5%(v/v) NaOCl에 10분간 침중하여 사용하였다. 알팔과의 뿌리혹 형성 및 엽중질산태 질소 환원 능력을 검토하기 위해 모래로 채워진 500ml 스티로폼 포트에 종자를 파종, 포트당 3 본식으로 하였으며, 根瘤菌은 K-1061로서 파종 다음날 균주 현탁액(10⁸/ml)을 만들어 포트당 10ml씩 接種 完了하였다. 試驗區는 2 품종, 질산태 질소 5 수준의 4반복 完全任意配置 要因實驗으로 하였다.

栽培液은 변형된 Hoagland's solution으로서, KNO₃와 Ca(NO₃)₂ 양을 조절하여 0,2,4,8,12mM 의 다섯수준으로 파종 2주후에 매주 2~3회 100ml 씩 공급하였으며, 파종 6주후에 部位別 地上部와 뿌리혹 건물중, 엽중질산태 질소 축적 및 환원 능력을 조사하였다.

엽중 질산태 질소 환원 능력은 nitrate reductase에 의하여 NO₃⁻가 환원되어 NO₂⁻가 생성되는 속도를 비색법에 의하여 측정하였는데, 지상부에서 엽을 분리하여 1mm 의 넓이로 잘게 썬 다음, 0.2g의 잎을 0.1M KNO₃와 1%(v/v) isopropanol을 함유하고 pH7.7로 조절된 5ml 0.1M potassium phosphate 緩衝溶液에 넣어 밀폐된 용기 안에 치상하였다. 5분동안 N₂가스를 용기에 주입

하여 질산태 질소 환원 반응에 있어서 산소에 의한 방해 제거하고 室溫 暗狀態에 30분간 치상한다음 생성된 NO₂⁻ 함량을 0.02%(w/v) N-(1-naphthyl)ethylenediamine dichloride 와 반응시켜 비색법에 의하여 측정하였으며 吸光係數 E^{1mm}_{1cm} = 55를 이용하였다.

한편 엽중 질산태 질소 축적정도는 nitrate reductase활성의 측정방법과 동일하나, 0.1M KNO₃를 포함하고 있지 않는 5ml 0.1M potassium phosphate 緩衝溶液에 暗狀態에서 2시간동안 反應시켜 생체엽에 존재하는 모든 NO₃⁻를 nitrate reductase에 의하여 변환된 NO₂⁻ 함량을 측정하여 엽중 질산태 질소함량을 推定하였다.

結果 및 考察

窒酸態 窒素 水準에 따른 가축의 可食 部位인 지상부 엽 및 줄기의 건물중을 살펴보면 表1과 같다. 부위별 건물중 수량은 건조형 Vernal 및 방목형 Victoria 품종간 차이는 認定되지 않았으나, NO₃⁻수준에 따라서는 줄기 건물중에서의 유의적인 차이를 보였다. 품종 및 NO₃⁻수준간의 相互作用 效果는 유의성이 없었으며, 대체로 NO₃⁻수준이 높아짐에 따라 지상부 건물중이 증가하였으나, 높은 수준인 8mM과 12mM간에는 큰 차이가 없었다.

表2는 NO₃⁻수준에 따른 根瘤의 着生程度를 뿌리혹 건물중으로 나타낸 것이다. 파종후 6주째 생육초기에 조사된 뿌리혹 건물중은 지상부 건물중에서와 마찬가지로 공시된 두 품종들간의 차이가 없었으나, NO₃⁻수준에 따라서는 고도로 유의적인 차이를 나타내었다. 8mM 이상의 NO₃⁻수준에

Table 1. Leaf and stem dry weight of alfalfa as affected by exogenous nitrate level.

| NO ₃ ⁻ level (mM) | Varieties | | Mean | Varieties | | Mean |
|---|-------------------------|----------|------------------|-------------------------|----------|------------------|
| | Vernal | Victoria | | Vernal | Victoria | |
| | Leaf dry wt. (mg/plant) | | | Stem dry wt. (mg/plant) | | |
| 0 | 102 | 125 | 114 ^d | 147 | 173 | 160 ^d |
| 2 | 197 | 182 | 190 ^c | 250 | 254 | 252 ^c |
| 4 | 269 | 252 | 261 ^b | 372 | 348 | 360 ^b |
| 8 | 319 | 387 | 253 ^a | 438 | 420 | 429 ^a |
| 12 | 399 | 389 | 394 ^a | 480 | 465 | 473 ^a |
| | F-test | LSD 0.05 | F-test | LSD 0.05 | | |
| NO ₃ ⁻ level(N) | 105,926 | 43.7 | 131,848** | 67.2 | | |
| Varieties(V) | 912 | - | 293 | - | | |
| N*V | 2,697 | - | 823 | - | | |

Table 2. Nodule dry weight of alfalfa as affected by exogenous nitrate level.

| NO ₃ ⁻ level (mM) | Varieties | | Mean |
|---|-----------|----------|-------------------|
| | Vernal | Victoria | |
| | mg /plant | | |
| 0 | 7.8 | 10.1 | 9.0 ^a |
| 2 | 12.1 | 6.4 | 9.3 ^a |
| 4 | 15.0 | 7.8 | 11.4 ^a |
| 8 | 0.0 | 1.2 | 0.6 ^b |
| 12 | 3.3 | 0.0 | 1.7 ^b |
| NO ₃ ⁻ level(N) | F-test | | LSD 0.05 |
| Varieties(V) | 191** | | 5.2 |
| N×V | 66 | | - |
| | 35 | | - |

서 두 품종 모두 뿌리혹 형성이 급격히 抑制되었다.

NO₃⁻ 는 根瘤菌 感染 經路를 통하여 뿌리혹 형성 억제와 동시에 질소고정기능을 저하시키는 현상은 많은 연구에 의하여 구명되었는바 Eardy 등 (1984)에 의하면 알팔파는 2mM NO₃⁻ 에서 뿌리혹 형성이 억제되었으며¹⁾ 18mM 이상에서는 뿌리혹 착생이 거의 되지 않는 것으로 보고하였다¹²⁾. 일반적으로 4 내지 8mM의 NO₃⁻ 를 數週日 동안 급여하게 되면 콩의 질소고정 기능 보다는 뿌리혹 착생에 더 영향을 주게 된다고 하였는데, 본 실험에서의 뿌리혹 착생 억제 NO₃⁻ 농도는 8mM 이상으로서 다소 차이가 있으나 이는 作物의 種類, NO₃⁻ 給與時期 및 量이 다른데서 기인 하는 것이라 생각된다. 그러나 이와 같이 뿌리혹 착생에 결정적으로 영향을 주는 NO₃⁻ 수준은 두과작물의 생물학적 공중질소 고정에 의한 식물체내 질소이용을 향상하는데 중요한 정보가 될것이다.

Nitrate reductase는 앞에서 질산태 질소의 동화능력을 결정하며, 기질인 NO₃⁻ 에 의하여 유기되는 酵素로 알려져 있다. 表3은 NO₃⁻ 수준에 따른 알팔파 잎의 nitrate reductase 活性도를 나타낸 것인데, NO₃⁻ 수준에 따라 고도로 有意한 차이가 인정되었다. 單位葉 生體重當의 nitrate reductase는 낮은 수준의 NO₃⁻ 농도에서는 수준이 증가함에 따라서 높은 활성을 보였으나 4mM 이상의 수준에서는 그 차이가 없었다.

토양중 NO₃⁻ 함량이 낮은 지역에서 자라고 있는 豆科作物의 경우, 뿌리에서 흡수되는 대부분의 질산태 질소는 뿌리에 있는 nitrate reductase에 의하여 동화되는 반면에, 토양중 NO₃⁻ 함량이 높

아짐에 따라서 지상부의 엽이나 줄기에서 窒素 同化가 급격히 증가된다고 하였는 바¹⁾, 알팔파는 4mM 이상의 NO₃⁻ 수준에서 뿌리로 부터 窒酸態 窒素가 엽으로 충분히 전류되어 엽중 nitrate reductase 활성이 유기되는 것으로 생각된다.

豆科 作物은 土壤, 施肥, 그리고 뿌리혹의 生物學的 窒素 固定등의 相互作用에 의해 질소공급이 결정된다고 할 수 있는데⁶⁾, 알팔파의 뿌리혹 착생은 8mM 이상에서 현저히 억제되었으며 葉中 窒酸態 窒素 還元 能力은 4mM 이상에서 수준간 차이가 없어 4mM NO₃⁻ 수준의 공급이 뿌리혹에 의해 고정된 空中窒素와 시비에 의한 질소 이용이 효율적일 것으로 기대된다.

한편 공급된 NO₃⁻ 농도를 nitrate reductase 반응 기질로 하여 Michaelis 常數(K_m)와 酵素의 最大 活性度(V_{max})를 구한 結果는 表 4와 같다. V_{max}는 Vernal과 Victoria의 품종간 차이가 크지 않았으나, Vernal의 K_m이 Victoria보다 높아 질소시비에 의한 효소활성도 반응이 鈍感하였음을 알수 있다.

Table 3. The activity of nitrate reductase in uppermost fully expanded leaves of alfalfa

| NO ₃ ⁻ level (mM) | Varieties | | Mean |
|---|---|----------|-------------------|
| | Vernal | Victoria | |
| | μ mol NO ₂ ⁻ hr ⁻¹ gFW ⁻¹ | | |
| 0 | 0.60 | 0.56 | 0.58 ^c |
| 2 | 1.01 | 1.18 | 1.09 ^b |
| 4 | 2.05 | 1.73 | 1.89 ^a |
| 8 | 1.94 | 2.50 | 2.21 ^a |
| 12 | 2.04 | 2.39 | 2.22 ^a |
| NO ₃ ⁻ level(N) | F-test | | LSD 0.05 |
| Varieties(V) | 4.28** | | 0.50 |
| N×V | 0.21 | | - |
| | 0.23 | | - |

Table 4. Estimated values of K_m and V_{max} of nitrate reductase on the basis of exogenous nitrate level as a substrate

| Genotypes | Values from enzyme kinetics | |
|-----------|---|----------------|
| | V _{max} | K _m |
| | μ mol NO ₂ ⁻ hr ⁻¹ gF.W. ⁻¹ | |
| Vernal | 2.82 | 3.39 |
| Victoria | 2.88 | 2.93 |

摘 要

飼料가 질산태 질소를 다량으로 함유하고 있는 경우에는 血液중에 酸素 運搬이 불가능한 methemoglobin을 생성하여 가축에게 호흡장애를 가져 오게 하는데¹³⁾, 그림 1은 NO₃⁻ 수준을 달리하였을 때 단위엽 생체중당 NO₃⁻ 축적정도를 나타내고 있다. Vernal과 Victoria 두 품종 모두 비슷한 경향을 보이고 있으며, 0mM~8mM NO₃⁻ 수준에서는 엽 생체중 1g당 10⁻⁵g NO₃⁻ 보다 낮은 축적을 보였다. 그러나 12mM NO₃⁻ 에서 다른 수준에 비하여 높은 축적을 보여 엽생체중 1g당 4 × 10⁻⁵g NO₃⁻ 이었다.

엽중 질산태 질소환원 능력은 表 3 에서 보는 바와 같이 4mM NO₃⁻ 에서 이미 최고 활성을 나타내고 있었으며, 8mM 까지는 식물체내에 흡수된 NO₃⁻ 를 뿌리와 엽에서 충분히還元할 수 있는 것으로 추측되지만, 12mM 의 NO₃⁻ 를 급여할 경우에는 葉中 窒酸態 窒素 還元能力은 4, 8mM 전류된 다량의 NO₃⁻ 는 일부만 환원되고 나머지는 엽에 축적되는 것으로 사료된다. 따라서 12mM 이상의 높은 NO₃⁻ 수준을 공급할 경우에는 窒酸鹽 蓄積 程度가 더욱 심할 것으로 예상된다.

Bradley에 의하면 사료 건물중당 질산태 질소를 0.208% 함유하고 있으면 家畜 毒性을 유발한다고 하였다²⁾. 본 실험에서는 12mM NO₃⁻ 수준의 경우 단위엽 생체중 g당 4 × 10⁻⁵g NO₃⁻ 가 축적되었는데, 생체중의 약 80%가 수분을 함유하고 있다고 가정할 경우에 이는 0.02%정도에 불과하여 질산염 축적에 의한 家畜의 致死濃度 보다는 아주 낮은 수준이어서 문제시 되지 않았다.

알팔과 放牧型 品種 Victoria와 乾草型 品種 Vernal을 공시하여 窒酸態 窒素 濃度 0, 2, 4, 8, 12mM의 다섯 수준으로 급여하여 파종 6주후 초기 생육시기에 지상부 부위별과 뿌리혹 건물중, 葉中 窒酸態 窒素 還元 能力 및 蓄積 程度를 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같이 요약된다.

1. NO₃⁻ 수준이 높아짐에 따라 지상부 건물중이 증가하였으나 NO₃⁻ 의 8mM과 12mM간의 차이는 없었다.
2. 두 품종 모두 8mM 이상의 NO₃⁻ 수준에서 뿌리혹 着生이 현저히 抑制되었다.
3. 葉生體重當 nitrate reductase활성은 NO₃⁻ 수준이 증가함에 따라 높아졌으나 4mM이상에서는 차이가 크지 않았다.
4. 엽중 질산태 질소축적은 NO₃⁻ 의 12mM처리시 크게 증가하였다.

引用文獻

1. Andrews, M. 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environ.* 9 : 511-519.
2. Bradley, W. B., H. F. Eppson, and O. A. Beath. 1940. Livestock poisoning by oat hay and other plants containing nitrate. *Wyoming Agr. Expt., Bull.* 241.
3. Campbell, W. H. 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plantarum*, 74 : 214-219.
4. Eardy, V. D., D. B. Hannaway, and P. J. Bottomley, 1984. Nitrogen nutrition and yield of seedling alfalfa as affected by ammonium nitrate fertilization. *Agron. J.* 77 : 57-61.
5. Gibson, A. H. and J. E. Harper, 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25 : 497-501.
6. 李錫河, 李弘和. 1992. 超多根瘤着生 突然變異體 공의 뿌리혹 형성 및 初期生育. *韓作誌* 37 (1) : 16-21.
7. Malik, N. S., H. E. Calvert, and W. D. Bauer, 1987. Nitrate induced regulation of

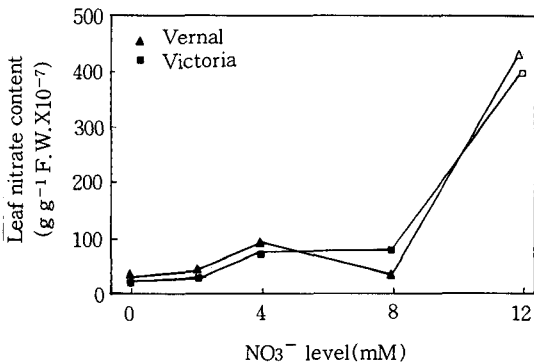


Fig. 1. Nitrate content in leaves of alfalfa plants as affected by exogeneous nitrate level.

- nodule formation in soybean. *Plant Physiol.* 84 : 266-271.
8. Schuller, K. A., D. A. Day, A. H. Gibson, and P. M. Gresshoff, 1986. Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules : effect of nitrate. *Plant Physiol.* 80 : 646-650.
 9. Silsbury, U. H. 1987. Nitrogenase activity in *Trifolium subterraneum* L. in relation to the uptake of nitrate ions. *Plant Physiol.* 84 : 950-953.
 10. Stephens, B. D. and C. A. Neyra, 1983. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 71 : 731-735.
 11. Streeter, J. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC Critical Reviews in Plant Sci.* 7(1) : 1-23.
 12. Truchet, G. L. and F. B. Bazzo, 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. *Planta* 154 : 352-355.
 13. 尹昌. 1988. 飼料作物內 窒酸염 蓄積과 窒酸염 攝取 水準이 緬羊의 第1 胃液 및 血液性狀에 미치는 影響. 博士學位論文. 全南大.
 14. 尹淳康, 李赫浩, 李鐘烈. 1990. 主要牧草들의 質的 및 量的 季節間 生産性과 養分組成變化에 관한 研究. 農試論文集(畜産篇) 32(2) : 32-41.