

土壤別 根瘤菌接種이 大豆의 根瘤形成 및 窒素固定活性에 미치는 影響

俞益東 · 金昌鎭 · 金聖勳 · 李 潤 · 閔泰益

韓國科學技術院, 遺傳工學센터

(1986년 2월 28일 수리)

The inoculation effect of *R. japonicum* on the nodulation and nitrogen fixation activity in *Glycine max* with the different kinds of soil.

Ick-Dong Yoo, Chang-Jin Kim, Sung-Hoon Kim, Yoon Rhee, Tae-Ick Mheen

Genetic Engineering Center, KAIST

(Received February 28, 1986)

The inoculation effect of the highly nitrogen fixing strains of *R. japonicum* were tested in the 3 kinds of soil with different cultural history onto *Glycine max* cv. Jang-yeob. The nodulation and nitrogen fixation activity in 3 test soils all showed the great increase in inoculated group compared to the non-inoculated group. The plant dry weight of the inoculated groups were increased about 10% than that of the non-inoculated groups. The numerical index of the increase in total nitrogen fixation activity were 238% in the pre-cultivated, 266% in the immatureed and 157% in the matured soil and these results suggested the clear effect of inoculation. Among the strains tested, *R. japonicum* R214 and R138 showed the excellent inoculation effect.

농경생태계에 있어서 질소고정 미생물의 역할은 토양미생물 상호간의 결합, 길항 혹은 공생작용 등에 따라서 그 기여도가 현저하게 다르며 그에 관여하는 각종 미생물의 상대 수도 토양의 종류, 재배작물, 경작방법 등에 의해 크게 지배를 받고^(6,8,11,12,14) 있다.

그 중에서도 특히 두과작물과 공생관계를 유지하며 공중질소를 공급하는 근류균(Rhizobium)은 연간 약 50-150kg/ha의 질소를 작물에 공급하고 있어⁽⁹⁾ 농경학적 측면에서 크게 주목을 받고 있고 실제 각국에서는 우수 근류균을 선발, 개량하여 두과 근류균 접종제로 실용화하고 있는 실정이다^(1,13,16). 그러나 이와같은 근류균은 질소고정에 필요한 에너지를 광합성산물로 부터 공급받고 있기 때문에 작물의 재배조건이나 환경조건 등에 따라서 질소고정량에 큰 차이를 보이고 있고 특히 토착근류균의 서식 정도에 따라서도 접종효과는 크게 좌우된다. 따라서 근류균을 두과작물의 접종제로 이용하기 위해서

는 근류형성능 및 질소고정능이 우수하고 동시에 토양내의 토착근류균과의 상호결합에서 이길 수 있는 우수균주를 선발하는 것이 시급한 문제이다.

石沢⁽²⁾에 의하면 우수한 두과작물 접종제로 이용하기 위한 균주선발의 선행조건으로는 토양 및 각종 환경조건에 내성 또는 적응성을 가지며 토양 중이나 배지, carrier 물질 속에서 빠른 생육을 보이고 생존력, 결합성 및 질소고정능이 높고 숙주친화성 범위가 넓은 균주이어야 한다고 제시하였다.

한편 국내에서도 대두근류균의 접종효과에 관한 연구가 일부 실시 되어져 왔으나 이들 일련의 연구 보고^(4,10)는 특정토양을 대상으로 주로 외국 균주들을 도입하여 그 효과를 검토 보고 하였기 때문에 근류균의 이용 가능성 여부를 판단하기에는 유용했지만 우리나라 토양에 적합한 균주의 선정이나 토양 유형별 접종효과등을 밝히기에는 미흡한 실정이었다.

본 연구에서는 대두증산용 근류균접종제를 개발

Table 1. Physico-chemical properties of soil used.

Soil	pH	O.M (1:5 H ₂ O)	T-N (%)	T-C (%)	C/N ratio	soil texture
Matured soil	5.65	1.45	0.26	0.84	3.23	L
Immatured soil	5.63	1.34	0.25	0.78	3.12	SCL
pre-cultivated soil	6.26	0.83	0.17	0.48	2.82	SCL

하기 위하여 우리나라 토양에서 분리선발한 근류균⁽³⁾ 중 상기의 특성을 구비하고 있는 우수균주를 대상으로 재배경력이 상이한 토양에 접종하여 근류형성능, 질소고정능 및 대두생육등에 미친 영향을 조사, 검토하였다.

재료 및 방법

공시토양

경기도 수원시 작물시험장 田作圃場중 대두를 5년 이상 재배한 熟田土壤과 대두를 재배한 경력이 없는 未熟田土壤 및 경기도 화성군 반월면 野山開墾田土壤의 작토층을 1985년 2월에 채취한 후 습윤상태 그대로의 토양을 2mm체를 통과시켜 공시토양으로 하였다. 공시토양의 이화학적 특성은 표 1과 같다.

공시균주 및 대두품종

공시균주는 본 연구실에서 수집 분리하여 우수균주로 선발된⁽³⁾ *Rhizobium japonicum* R-67, R-138,

R-214, R-224 및 R-256의 5 균주를 사용하였으며 공시 대두품종으로는 현재 장려품종으로 보급재배되고 있는 장엽콩(長葉콩)을 사용하였다.

처리내용 및 실험방법

공시 습윤토양(乾土 500g/pot 상당량)에 NPK 를 (NH₂)₂CO 및 KH₂PO₄로 각각 44 mg, 175mg씩 사용하고, 토양개량제로 Ca(OH)₂ 0.5g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 6 mg 를 사용한 후 균일하게 혼합 조제하였다. 처리구로는 1) 토양멸균·근류균무접종구, 2) 토양 무멸균·근류균무접종구, 3) 토양무멸균·근류균접종구를 설계한 후 상기조제토양을 토양무멸균구는 그대로, 멸균구토양은 121°C 에서 2 시간 가압살균하여 플라스틱 pot에 충전하였다. 미리 정선된 장엽콩은 수세하고 70% ethanol 과 0.1% HgCl₂ 용액에 약 3 분간씩 침적하여 표면살균하고 멸균수를 이용하여 재차 수세한 다음 25°C 암조건에서 3 일간 발아시켰다. 발아정도가 균일한 장엽콩은 선별하여 pot 당 2 주씩 이식하였다. 근류균 접종은 공시 근류균을 각각 yeast extract mannitol (YM) 배지에 접종하고 28°C 에서 약 3 일간 배양하여 1~5×10⁸ cells/ml 정도로 증식된 균액을 얻은후 pot 당 1ml 씩 콩뿌리 인접부위에 접종하였다.

대두 생육은 온도 25±1°C, 습도 70±5%, 明 15 시간, 暗 9 시간으로 조절된 plant growth chamber (Heraeus-vötsch GMBH) 내에서 60 일간 재배하였으며 photon flux density는 450 μ Em⁻¹S⁻¹ 이었다. 각 처리는 4 반복으로 실시한 후 평균값으로 나타냈다.

Table 2. Effect of inoculation of *R. japonicum* strains on the nodulation and growth of soybean (Matured soil).

Treatments	Days after planting								
	20 days			40 days			60 days		
	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)
Soil sterilized, no inoculation	0	0	0.14	0	0	0.21	0	0	0.31
Soil not sterilized, no inoculation	26	0.08	0.44	29	0.15	0.75	38	0.36	1.16
Soil not sterilized, inoculation (R-67)	37	0.09	0.51	41	0.23	0.99	58	0.38	1.37
Soil not sterilized, inoculation (R-138)	34	0.13	0.61	44	0.17	0.95	37	0.38	1.28
Soil not sterilized, inoculation (R-214)	44	0.13	0.57	39	0.29	0.93	47	0.41	1.24
Soil not sterilized, inoculation (R-224)	47	0.12	0.58	39	0.23	0.89	41	0.46	1.33
Soil not sterilized, inoculation (R-256)	33	0.07	0.42	33	0.21	0.81	37	0.33	1.19
Soil not sterilized, inoculation (Av.)	39	0.12	0.54	39	0.23	0.91	44	0.39	1.28

근류형성능 및 질소고정능 조사

근류균 접종후 20일, 40일, 60일차에 식물체를 수거하여 근류형성정도 및 질소고정 활성을 조사하였다. 질소고정 활성은 williams의 방법⁽¹⁸⁾에 준하였다.

중하여 각 토양별 근류형성 정도를 조사한 결과를 표 2, 표 3 및 표 4에 나타냈다.

표 2의 숙전토양의 경우를 보면 토양멸균·근류균 무접종구에서는 전 생육기간중 근류의 형성이 관찰되지 않았다. 그에 비하여 토양무멸균·근류균 무접종구에서의 근류형성 정도를 보면 근류수는 20일차 26개, 40일차 29개 60일차 38개/株 이었고 근류무게도 각각 0.08, 0.15, 0.36g/株 이었다. 한편 토양무멸균·근류균 접종구에서의 평균 근류수는 20일차 39개, 40일차 39개 및 60일차 44개/株 이었으며 근류무게도 각각 0.12, 0.23, 0.39g/株 로 토

결과 및 고찰

근류균 접종이 대두의 근류형성 정도에 미치는 영향

재배경력이 상이한 3 종류의 토양에 근류균을 접

Table 3. Effect of inoculation of *R. japonicum* strains on the nodulation and growth of soybean (Immatured soil).

Treatments	Days after planting								
	20 days			40 days			60 days		
	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)
Soil sterilized, no inoculation	0	0	0.15	0	0	0.22	0	0	0.30
Soil not sterilized, no inoculation	28	0.07	0.44	39	0.12	0.83	34	0.26	1.17
Soil not sterilized, inoculation (R-67)	36	0.09	0.54	58	0.22	0.88	55	0.37	1.35
Soil not sterilized, inoculation (R-138)	31	0.11	0.60	43	0.27	0.98	37	0.31	1.40
Soil not sterilized, inoculation (R-214)	29	0.08	0.51	41	0.24	0.86	50	0.36	1.30
Soil not sterilized, inoculation (R-224)	33	0.11	0.53	35	0.18	0.88	38	0.33	1.22
Soil not sterilized, inoculation (R-256)	30	0.09	0.51	44	0.22	0.86	46	0.34	1.25
Soil not sterilized, inoculation (Av.)	31	0.10	0.54	43	0.23	0.89	45	0.34	1.23

Table 4. Effects of inoculation of *R. japonicum* strains on the nodulation and growth of soybean (Pre-cultivated soil).

Treatments	Days after planting								
	20 days			40 days			60 days		
	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)	Nodule number (No. of nodule /plant)	Nodule fresh weight (g/plant)	Plant dry weight (g/plant)
Soil sterilized, no inoculation	0	0	0.09	0	0	0.09	0	0	0.13
Soil not sterilized, no inoculation	36	0.05	0.41	45	0.18	0.30	46	0.31	0.95
Soil not sterilized, inoculation (R-67)	48	0.07	0.43	50	0.25	0.75	51	0.53	1.22
Soil not sterilized, inoculation (R-138)	43	0.07	0.45	36	0.22	0.70	35	0.36	1.08
Soil not sterilized, inoculation (R-214)	41	0.08	0.45	43	0.23	0.83	34	0.34	1.16
Soil not sterilized, inoculation (R-224)	34	0.05	0.36	46	0.25	0.84	39	0.37	1.01
Soil not sterilized, inoculation (R-256)	25	0.04	0.35	40	0.21	0.80	43	0.41	1.13
Soil not sterilized, inoculation (Av.)	38	0.06	0.41	43	0.23	0.78	40	0.40	1.12

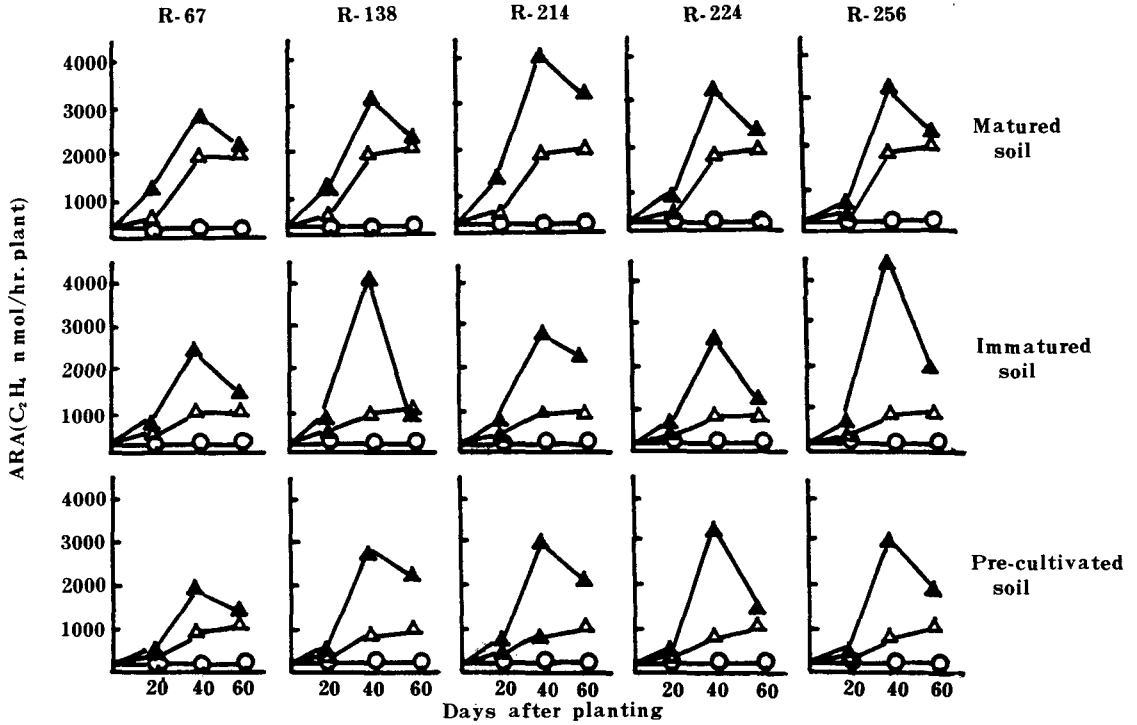


Fig. 1. Effect of inoculation of *R. japonicum* strains on the nitrogen fixing activity.

○—○ Soil sterilized, no inoculation △—△ Soil not sterilized, no inoculation
 ▲—▲ Soil not sterilized, inoculation

양무명균 · 근류균무접종구에 비하여 현저히 증가하는 경향이였다.

표 3 및 표 4의 미숙전 토양과 개간전 토양을 공시 토양으로 하여 접종효과를 조사한 결과에서도 약간의 차이는 있었으나 숙전토양과 거의 비슷한 접종효과를 나타냈다.

이상의 결과를 고찰하여 보면 다음과 같다. 즉 토양명균 · 근류균무접종구에서 생육 후 60일차 까지

근류형성이 전혀 관찰되지 않은 것은 토양명균에 의해 토양 중에 서식하고 있는 토착근류균들이 완전히 사멸되었기 때문인 것으로 생각되었다. 또 일반적으로 토양무명균 · 근류균무접종구의 토착근류균에 의해 형성된 근류보다 토양무명균 · 근류균접종구에서 근류수나 무게가 현저하게 양호한 것은 토착근류균 이외 인위적으로 접종한 접종근류균이 근류형성에 크게 기여했기 때문인 것으로 판단되었다.

Table 5. Total amount of nitrogen fixing activity in 60 days with the different kinds of soil.

Treatments	Matured soil		Immatured soil		Pre-cultivated soil		Average index (%)
	Total ARA ($\mu\text{mol. C}_2\text{H}_4 / 60 \text{ days} \cdot \text{plant}$)	Index (%)	Total ARA ($\mu\text{mol. C}_2\text{H}_4 / 60 \text{ days} \cdot \text{plant}$)	Index (%)	Total ARA ($\mu\text{mol. C}_2\text{H}_4 / 60 \text{ days} \cdot \text{plant}$)	Index (%)	
Soil sterilized, no inoculation	0	0	0	0	0	0	0
Soil not sterilized, no inoculation	627	100	655	100	1223	100	100
Soil not sterilized, inoculation (R-67)	1205	192	1406	215	1544	126	178
Soil not sterilized, inoculation (R-138)	1520	243	1906	291	1959	160	231
Soil not sterilized, inoculation (R-214)	1760	281	1751	267	2448	200	249
Soil not sterilized, inoculation (R-224)	1526	243	1497	228	1938	159	210
Soil not sterilized, inoculation (R-256)	1452	232	2156	329	1708	140	234
Soil not sterilized, inoculation (Av.)	1493	238	1743	266	1919	157	220

한편 개간전 토양의 경우를 보면 토양무멸균·근류균점종구에 비하여 토양무멸균·근류균무점종구에서 오히려 근류수가 많거나 비슷한 경향을 보였다. 그러나 근류수에 비하여 근류무게가 아주 낮았고 근류의 크기도 1mm 이내의 작은 근류들이 대부분이었는데, 이 결과로 미루어 개간전 토양의 근류균무점종구에서 형성된 근류들은 토양내에 서식하고 있는 열등한 토착근류균들에 의한 것이라고 생각되었다.

근류형성 정도를 공시 근류균주별로 비교해 보면 *Rhizobium japonicum* R-67, R-138, R-214 균주 점종구에서 비교적 근류형성이 양호하였다. 또 이들 균주는 미숙전, 숙전토양에서도 점종효과가 뚜렷이 나타난 것으로 보아 토착근류균들과의 상호경합에서도 강한 경쟁력을 갖는 우수한 균주들이므로 판단되었다.

근류균점종이 대두의 질소고정활성 및 생육정도에 미치는 영향

근류균 점종에 따른 생육기간 중 질소고정활성의 경시적 변화를 그림 1에 나타냈다.

그 결과, 熟田, 未熟田 및 開墾田 토양 모두 토양멸균·근류균무점종구에서는 전술한 바와 같이 전 생육기간 중 근류의 형성이 관찰되지 않았으며 그에 따라 질소고정활성도 인정되지 않았다. 그에 비하여 토양무멸균구에서의 질소고정활성을 보면 숙전토양의 토양무멸균·근류균무점종구에서는 20 일차 439 nmol, 40 일차 1955 nmol, 60 일차 2050 nmol C₂H₄/株/時의 질소고정 활성을 나타냈으며 이와 같은 효과는 토양무멸균·근류균점종구에서는 각각 806 nmol, 3398 nmol, 2376 nmol C₂H₄/株/時로 더욱 높은 질소고정 활성을 나타냈다. 이상과 같은 경향은 숙전토양에서 뿐만 아니라 미숙전토양, 개간전토양에서도 같은 결과를 나타냈다.

근류균 점종에 의한 질소고정 활성의 증가는 대두 생육에도 영향을 미쳐 표 2, 표 3 및 표 4에서와 같이 근류균무점종에 비해 점종함으로써 약 10% 정도의 식물체 건물중 증가를 보였다.

한편 토착근류균에 의한 활성이라고 할 수 있는 토양무멸균·근류균무점종구의 질소고정활성 (40 일차)을 토양별로 보면 개간전토양 및 미숙전토양의 1000~1300 nmol C₂H₄/株/時에 비하여 숙전토양에서 1955 nmol C₂H₄/株/時로 월등히 높은 활성을 나타내고 있는데 이는 숙전토양은 대두 재배경력이 오래된 토양으로 토양중에 비교적 우수한 토착근류균이 많이 서식하고 있기 때문인 것으로 생각할 수 있겠다. 그러나 토착근류균과 점종근류균의 양 효과라고 할 수 있는 토양무멸균·근류균점종구에서

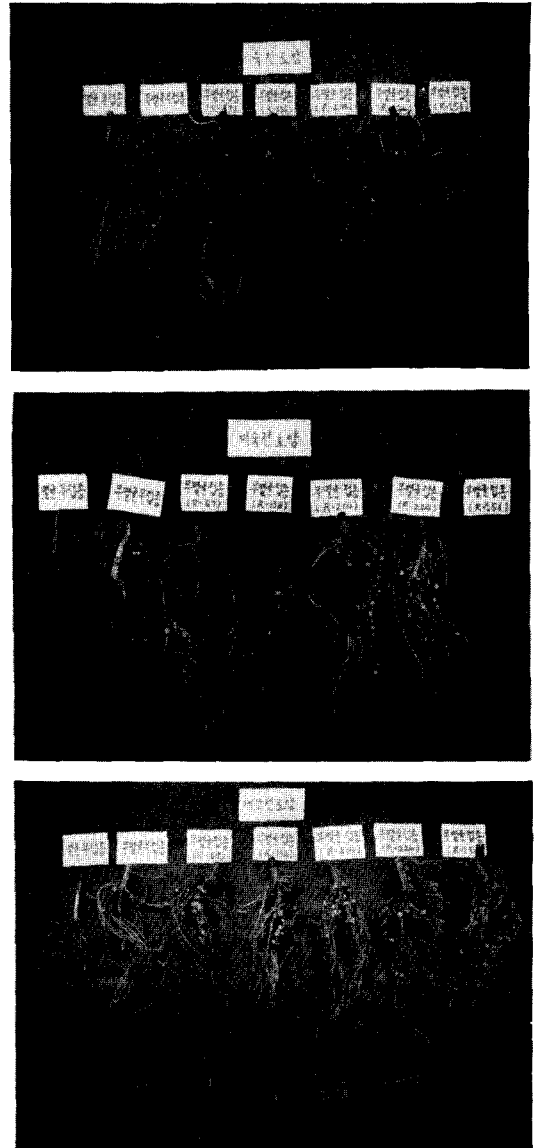


Fig. 2. Inoculation effect of *R. japonicum* on the nodulation in soybean(*Glycine max*) with the different soils(after 60 days).

는 토양별 차이는 나타나지 않고 3 토양 모두 3000~3400 nmol C₂H₄/株/時的 높은 활성을 나타내고 있다. 이들 결과로부터 개간전이나 미숙전토양에서도 인위적으로 근류균을 점종해 주면 점종근류균에 의해 질소고정활성은 증가되어 숙전토양과 비슷한 높은 활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

일반적으로 숙전토양보다는 미숙전 혹은 개간전 토양에서 근류균 점종효과가 크게 나타나는 것으로

알려져 있다. 그 이유로 숙전토양은 토양중에 이미 토착근류균등이 많이 서식하고 있기 때문에 인위적으로 접종한 접종균과의 경합관계에서 인공접종균보다 토착근류균이 우선적으로 감염하여 근류를 형성 질소고정 작용을 하기 때문이라고 보고되고 있다⁽⁷⁾.

본 실험결과에서도 총질소고정 활성의 토양별 증가지수를 보면 표 5 와 같이 근류균무접종구에 비하여 근류균을 접종함으로써 개간전토양 238%, 미숙전토양 266%의 높은 증가현상을 나타내고 있는 반면 숙전토양에서는 157%의 증가 밖에 보이고 있지 않아 상기의 보고들과 일치하였다.

각 토양별 근류균 접종 유무에 따른 생육 60일 후의 근류형성 정도는 그림 2 와 같다.

그림 2 에서 보는 바와 같이 토양무멸균 근류균무접종구에 비하여 근류균을 접종함으로써 모든 접종구에서 뿌리가 증가되었고 균류의 형성이 뚜렷이 증가되는 것이 확인되었다.

그러나 토양멸균·근류균무접종구에서는 뿌리의 형성정도가 지극히 불량하였으며 근류형성도 관찰되지 않았다. 이는 토양멸균에 의해 토착근류균이 사멸되었을 뿐만 아니라 토양중의 易分解性 유기물들이 불용화되어 작물이 쉽게 이용할 수 없는 난분해성 물질들로 변화되었기 때문에 작물이 토양중의 양분을 충분히 흡수 이용하지 못하는데 원인이 있는 것으로 판단되었다.

요 약

대두근류균 접종제 개발을 목적으로 수집, 분리되어 우수균주로 선발된 근류균(*Rhizobium japonicum*)을 대상으로 각기 재배경력이 상이한 3종류의 토양에 장엽콩(長葉콩)을 공시 품종으로 하여 접종효과 시험을 실시하였다. 그 결과 근류형성정도 및 질소고정활성을 보면 근류균무접종구에 비하여 근류균을 접종함으로써 3 토양 모두 현저한 근류형성 및 질소고정활성의 증가를 보였고 그에 따라 대두의 생육정도도 양호하여 평균 10%의 건물중의 증가를 보였다. 토양별 총질소고정활성의 증가지수는 개간전토양 238%, 미숙전토양 266%, 숙전토양 157%로 개간전 및 미숙전토양에서 접종효과가 뚜렷하였다. 공시 근류균주별 접종효과는 *Rhizobium ja-*

ponicum R-214, R-138 균주가 우수한 접종효과를 나타냈다.

참고문헌

- Burton, J.C.: Microbial Technology, (Peppler, H.J., ed.) Reinhold Publishing Co., (1967).
- 石沢修一: 微生物と植物生育, 博友社, 181 (1980).
- 金昌鎮, 金聖勳, 李潤, 俞益東, 閔泰益: 한국농화학회지, **28**, (3), 149 (1985).
- 이상규, 유진창, 유인수: 농촌진흥청 시험연구보고서, **19**, (S, F, P & M), 133 (1977).
- 민태익, 유익동의: 미생물분자 육종기술개발에 관한 연구, 한국과학기술원 연구보고서, **90**, (1985).
- Munevar, F. and Wollum, A.G.: *Soil Sci. Society of Amer. J.*, **45**, (6), 1113, (1981).
- 中村道徳: 生物窒素固定, 学会出版センター, 215 (1980).
- Nutman, P.S.: IBP 7, Symbiotic nitrogen fixation in plants (Nutman, P.S. ed.) Cambridge Uni. Press, London, 211, (1976).
- Quispel, A.: The biology of nitrogen fixation (Quispel, A. ed.) North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 3, (1974).
- 유진창, 이상규, 이혁호, 홍종운, 조무제: 한국토양비료학회지, **16**, 188 (1983).
- Steele, K.E., Bonish, P.M., Daniel, R.M. and W. O'hara: *Plant Physiol*, **72**, 1001, (1983)
- Taylor, J.D., Day, J.M. and Dudley, C.L.: *Ann. Appl. Biol.*, **103**, 419, (1983)
- 十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所: 根粒菌 (1983).
- Williams, L.E. and Phillips, D.A.: *Crop Science*, **23**, 246, (1983)
- Williams, W.M. and Broughton, W.J.: *Rhizobial experimentation and supply in Malaysia*, 1, (1976)
- Wolf, D.C. and Nester, R.P.: *Arkansas Farm Research*, **9**, (1980)