

超多 根瘤着生 突然變異體 콩의 뿌리혹 形成 및 初期生育

李錫河* · 李弘祐**

Nodulation and Early Growth of Supernodulating Mutants in Soybean

Suk Ha Lee* and Hong Suk Lee**

ABSTRACT : Increase in nodulation and nitrogen fixation was achieved partly through the isolation of supernodulating soybean mutant plants. This experiment was conducted to compare nodulation, nitrogen fixation, and early growth characters of wild type 'Bragg' with those of its supernodulating soybean mutant, 'nts 382' and 'nts 246'. At 31 days after planting, nodule dry weight of nts mutants was 2.5 to 3.7 times greater than that of Bragg. Higher nodulation of nts mutants showed the reduced top growth, indicating that photosynthates might be translocated and used for nodule growth attached to the root system. Total acetylene reduction activity was higher in nts mutants than Bragg, whereas specific acetylene reduction activity of nts mutant was the half of that of Bragg. Mixture of nts mutants and Bragg did not affect nodulation characters each other, suggesting that factors affecting supernodulating characters exist inside rather than outside the root system.

콩의 生育 및 收量 向上을 위한 窒素供給은 必須의이며, 窒素 供給源으로서는 土壤, 施肥, 그리고 뿌리혹의 生物學的 固定 窒素의 세 形態가 있는데, 이들간의 相互作用에 의해 窒素供給이 決定된다고 할수 있다. 우리나라에서 콩의 低位 生産性은 土壤 肥沃度, 酸度등 발토양의 劣惡한 理化學的 性質이 주된 原因이므로, 콩 生育을 위한 植物體내 窒素 確保는 그 意義가 크다 할수 있겠다.^{11, 12, 13)}

한편, 다량의 窒素施肥는 뿌리혹 形成을 抑制하여 생물학적 窒素 固定을 감소 시킬뿐만 아니라, 토양중 監類 蓄積을 초래하여 施肥와 토양 무기화 작용에 의하여 공급된 질산태 질소($\text{NO}_3^- - \text{N}$)가 지하수에 유입하게 되어, 이를 식수원으로 이용하여 심한 경우에는 N_2 -毒性(methemoglobinemia)으로 호흡장애를 유발하게 되며, 하천으로 유입된 질소는 富營養化(eutrophication)의 원인이 되기도 하므로¹⁷⁾ 環境汚染의 防止, 生産費의 節減 및 sustainable agriculture 차원등 여러면에서 두 과작물의 생물학적 窒素固定 능력 향상을 위한 연구는 시급한 실정이다.

콩의 根瘤着生 및 窒素固定能力은 土壤微生物인 根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)과 기주식물체와의 環境條件에 따른 相互作用에 의존되는데 농업미생물 이용측면에서는 土着根瘤菌과의 경합에 강한 균주를 선발 접종하여 척박지에서 그 효과가 인정되었으며⁸⁾, 뿌리에서 분비된 flavonoid 계통의 저분자 화합물이 根瘤着生 遺傳子(*nod gene*)를 활성화 하는 현상이 보고 되면서,^{9, 16)} 기주식물체

한편, 다량의 窒素施肥는 뿌리혹 形成을 抑制하여 생물학적 窒素 固定을 감소 시킬뿐만 아니라, 토양중 監類 蓄積을 초래하여 施肥와 토양 무기화 작용에 의하여 공급된 질산태 질소($\text{NO}_3^- - \text{N}$)가 지하수에 유입하게 되어, 이를 식수원으로 이용하여 심한 경우에는 N_2 -毒性(methemoglobinemia)으로 호흡장애를 유발하게 되며, 하천으로 유입된 질소는 富營養化(eutrophication)의 원인이 되기도 하므로¹⁷⁾ 環境汚染의 防止, 生産費의 節減 및 sustainable agriculture 차원등 여러면에서 두 과작물의 생물학적 窒素固定 능력 향상을 위한 연구는 시급한 실정이다.

* 農村振興廳 作物試驗場 (Crop Expt. Stn., RDA, Suwon 441-100, Korea)

** 서울大 農大 農學科 (Dept. of Agron., Seoul Nat'l Univ., Suwon 441-744, Korea)

(접수일자 : 92. 2. 10)

역할의 중요성이 대두되었다.

최근 콩品種 改良을 위한 突然變異 育種法이 인정을 받으면서 Carroll등은 콩 Bragg종자에 EMS를 처리한후 M₂ 세대 2500계통을 대상으로 5mM KNO₃의 窒素 水準하에서 超多根瘤着生 15系統을 선발하였는데, 이 系統들은 일반 콩에서 보이는 토양중 질산태 질소에 의한 根瘤着生 抑制 現象이나 나타나지 않아 nts (nitrate-tolerant symbiotic) 계통이라 하였다. 또한 Harper등은 이와같은 방법으로 Williams로부터 超多根瘤着生性 系統을 分離하였는데 이들 유전자형은 주당 많은 뿌리혹이 형성되었고, 높은 아세틸렌 還元 能力을 보여, 이 突然變異體는 根瘤着生 機作 究明과 생물학적 窒素 固定能力 向上을 위한 유전자원으로서 그 가치가 크다 하겠다.^{2, 5, 6)}

본 연구는 超多 根瘤着生 系統 'nts 382', 'nts 246'와 그의 wild type 'Bragg'의 初期 生育 및 根瘤着生에 관한 作物學的 特性을 經時的으로 검토하고, 이들을 近接播種하여 뿌리간의 접촉을 誘導, 地下部 特性을 조사함으로써 超多 根瘤着生機作을 究明하고자 실시하였다.

材料 및 方法

本 試驗에 供試된 콩 品種은 wild type 'Bragg'와 超多 根瘤着生 突然變異體 'nts 382', 'nts 246'로서, 供試種子是 播種前 5%(V/V) NaOCl에 10분간 浸種하여, 種子表面 殺菌後에 滅菌水로 7-10회 세척 사용하였으며, 초기 생육 및 根瘤着生 特性을 조사하기 위해서 혼중된 모래로 채워진 1-L 스티로폼 포트에 5립씩 집과한 후 5일째 생육이 좋은 두 개체만을 남기고 제거하였다.

Bragg와 nts계통간 地下部 相互 根瘤形成 影響 檢討는, 뿌리간의 접촉을 충분히 誘導하도록 포트당 Bragg 3립, nts계통 3립을 近接 播種하였다. 그 후 5일째 각 유전자형당 건전한 생육을 하고 있는 한 개체를 선발 포트당 두 개체만을 남기고 잔여개체는 뽑아내었으며, 생육은 400W multivapor lamp를 이용하여 日長條件을 16시간으로 조절된 그린 하우스에서 실시되었다.

栽培養液은 다음표에서 보는 바와 같이 변형된 Hoagland's solution으로 KNO₃와 Ca(NO₃)₂를 이용하여 NO₃⁻ 농도를 12mM로, 養液의 pH는 6.5-7.0으로 조절하여 일주일에 2-3회 포트당 100ml씩 급여하였다.

Table Composition of modified Hoagland's solution used for culturing plants.

Stock	ml in a liter nutrient solution
1 M KH ₂ PO ₄	1
1M MgSO ₄	2
1M KNO ₃	3
1M Ca(NO ₃) ₂	4.5
Micronutrients*	1
Iron chelate*	1

* Stock solutions for micronutrients and iron chelate were made on the basis of Hoagland's solution preparation.

根瘤菌은 USDA I110 ARS로서 파종 2일후에 균주 현탁액(10⁸/ml)을 만들어 포트당 10ml씩 분주하여 接種하였고, 파종후 14, 18, 22 및 31일 제에 부위별 植物體 乾物重과 根瘤着生程度를 조사하였으며 파종후 22일째에는 窒素 固定 能力을 측정하였다. 窒素 固定 能力은 Nitrogenase의 아세틸렌 還元 能力에 의해 測定되었는데, 콩의 地下部를 제거한 직후 착생된 뿌리혹이 떨어지지 않도록 조심스럽게 모래를 분리하여 1-L병에 넣고 密封을 한다음, 주사기를 이용하여 50cc acetylene을 注入하였으며, 30분후에 생성된 ethylene을 gas chromatography에 의해 分析 定量하였다.

結果 및 考察

포장에서 재배된 超多 根瘤着生 突然變異體의 根瘤着生程度는 寫眞 1에서 보는 바와 같이 많은 뿌리혹이 形成되어 있으며, 뿌리전체에 均等하게 分布되어 있음을 알수 있다. 일반적으로 두과 식물의 뿌리혹 形成은 뿌리 組織에 根瘤菌이 侵入, 感染되어 뿌리혹이 形成되면, 감염된 조직부위에서 생성된 미확인 물질에 의해 신장되고 있는 새 뿌리 조직의 根瘤着生을 억제함으로써 주로 根冠部位에 뿌리혹이 形成되는 根瘤着生 自家調節 能力(Autoregulation of nodulation)이 보고되어 있는데, nts계통은 신장된 새로운 뿌리 조직에도 많은 뿌리혹이 形成되어 이 조절능력이 결여 되었음을 나타내고 있다. 또한 nts계통은 根瘤菌이 棲息하고 있는 어느 장소에서든지 많은 뿌리혹이 形成되어, nts계통의 超多 根瘤着生 特性은 土着 根瘤菌 유전

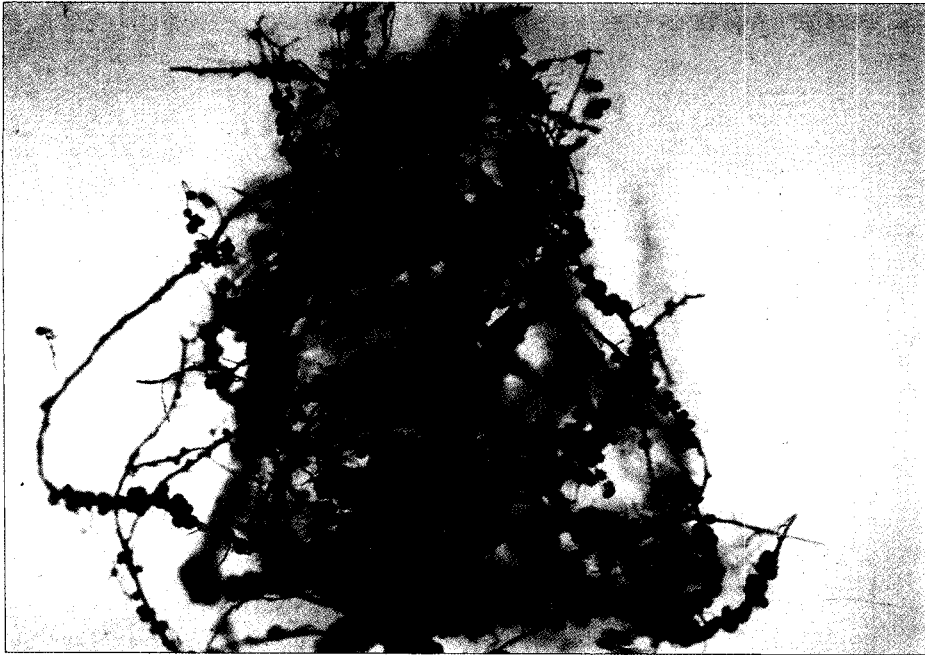


Photo 1. Nodulation of nts 382 mutant soybean plant grown in the field.

자형에 관계없이 기주 식물체에 의존되고 있음을 알 수 있다.

根瘤의 着生程度는 뿌리혹 乾物重을 조사하였는데, 공시된 세 유전자형들의 생육초기에 조사한 뿌리혹 건물중은 표1에서 나타나는 바와 같으며, 전체적으로 볼 때 標本採取時期($F=209.37^{**}$)와 유전자형($F=151.24^{**}$)에서 고도의 有意性이 인정되었다. 각 標本採取時期 내에서는 Bragg에 비하여 nts系統에 着生된 뿌리혹 건물중이 현저히 높아서, 파종후 31일째에는 Bragg에 대비 nts계통이 2.5내지 3.5배이었으며, nts 382보다는 nts 246가 다소 높은 경향이였다.

生育初期에 조사한 지상부, 뿌리 및 뿌리혹 건물중의 경시적인 변화를 보면 그림1에서 보는 바와같이, 播種後 22일째에 nts系統들의 뿌리혹 형성이 급격히 이루어져서 이후에는 Bragg와의 차이가 현저하였으며, 이 기간중에 지상부 총 건물중은 nts계통에 비하여 Bragg가 현저히 높았다. 뿌리혹 형성 및 성장을 위한 에너지와 炭水化合物 골격 구조체는 지상부 光合成에 의하여 고정된 炭水化合物의 지하부로 공급량에 따라서 결정되는데, nts계통은 과다한 뿌리혹 형성을 위하여 많은 光合成 產物

Table 1. Nodule dry weight of Bragg and nts mutant soybean plants at each sampling date.

Genotypes	Days after planting			
	14	18	22	31
 mg /plant			
Bragg	9 c*	19 b	39 b	60 c
nts 382	20 b	38 b	99 a	151 b
nts 246	33 a	72 a	119 a	224 a

* Within sampling dates, means (column) not followed by the same letter are significantly different at $P=0.05$ based on an LSD.

을 消耗하여 지상부 생육이 저해되었음을 보여주고 있다.

다음으로 각 생육시기별 總 乾物重에 대한 地上部 乾物重 比率과 地下部 總 乾物重에 대한 뿌리 乾物重 比率을 살펴보면 표2와 같다. 總 乾物重에 대한 地上部 乾物重 比率은 Bragg와 nts계통들간에 차이가 없어, 總 乾物重이 Bragg에 비하여 상

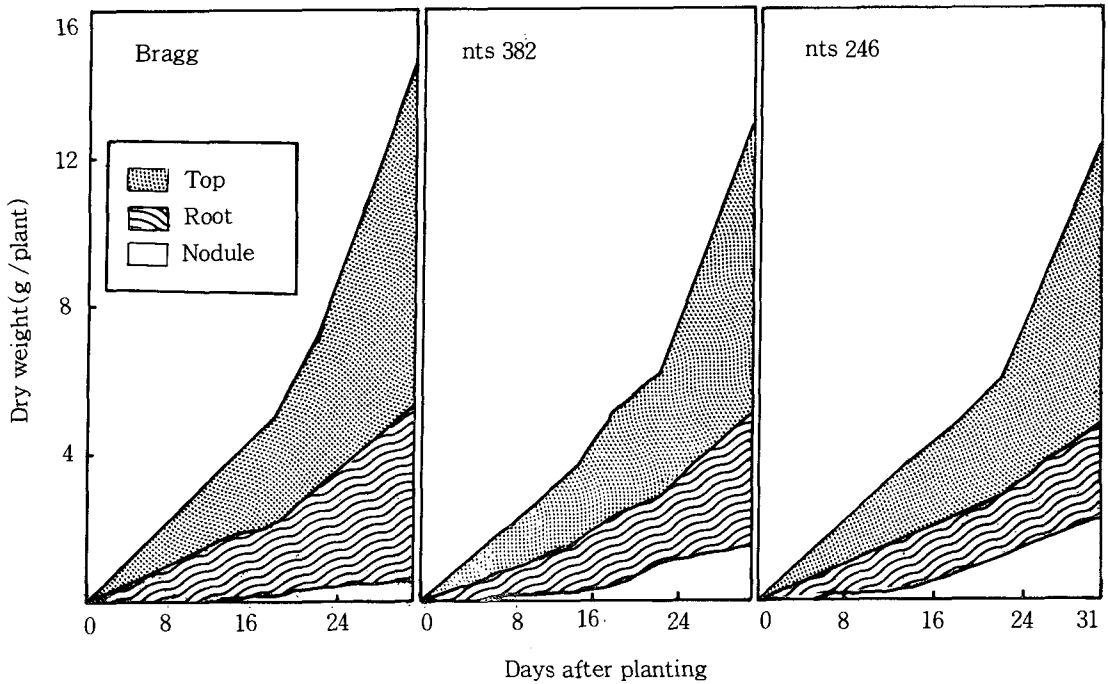


Fig 1. Distribution of dry weight in plant parts of soybean in relation to days after planting.

Table 2. Relative distribution of dry weight in plant parts of Bragg and nts mutant soybean at each sampling date.

Genotypes	Days after planting			
	14	18	22	31
Relative shoot dry weight				
..... %				
Bragg	54.1 a*	58.4 a	58.0 a	63.4 a
nts 382	56.7 a	55.3 a	53.8 a	60.6 a
nts 246	54.6 a	53.1 a	53.5 a	61.5 a
Relative below-ground root dry weight				
..... %				
Bragg	94.8 a	90.8 a	87.0 a	88.8 a
nts 382	86.7 b	83.4 a	64.9 b	69.9 b
nts 246	81.0 c	68.5 b	57.3 c	52.9 c

* Within sampling dates, means (column) not followed by the same letter are significantly different at $P=0.05$ based on an LSD.

대적으로 작은 nts系統들도 지상부와 地下部の 均衡된 生長을 Bragg와 같이 일정하게 유지하고 있

었다. 그리고 각 생육시기별 nts계통들의 地下部 總 乾物重에 대한 뿌리 乾物重 比率는 Bragg에 비하여 낮아, 지상부에서 지하부로 轉流된 光合成 產物이 뿌리 生長보다 상대적으로 뿌리혹 형성으로 많이 분배되고 있음을 나타내고 있다.

개체당 및 뿌리혹 건물중당 아세틸렌 還元能力에 의한 窒素固定 能力을 유전자형들간에 비교하여 나타낸것이 표 3이다. 개체당 아세틸렌 還元能力은 nts 246가 Bragg보다는 높았으며 nts 382와는 차이가 없었다. 突然變異體인 nts 系統과 Bragg의 窒素固定能力은 생육시기나 환경에 의해 차이가 있으나, 일반적으로 nts 系統이 개체당 窒素固定能力이 2-5배 높은것으로 보고되었으며, 高濃度の 窒酸態 窒素 이용시에는 그 차이가 더욱 많은 것으로 알려져 있다. 한편 단위 뿌리혹 건물중당 아세틸렌 還元能力은 유전자형간에 유의적인 차이가 인정되어 Bragg가 nts계통보다 높은수준을 나타내었는데, 이는 nts 系統이 根瘤着生에 효율적인 반면에 窒素固定을 위한 기능적인 면에서는 Bragg보다는 열세에 있음을 나타낸다. 超多根瘤着生 nts 突然變異體의 뿌리혹은 bacteroid 및 haem 含量에 있어서 Bragg보다 낮은것으로 알려

Table 3. Comparison of acetylene reduction activity of three soybean genotypes which were measured at 22 days after planting.

Genotypes	C ₂ H ₂ reduction activity	
	ARA	SARA
	uMh ⁻¹ plant ⁻¹	uMh ⁻¹ g ⁻¹ nodule dry wt.
Bragg	4.8 b	127.0 a
nts 382	5.7 ab	58.9 b
nts 246	6.7 a	57.0 b

* Within sampling traits, means (column) not followed by the same letter are significantly different at P=0.05 based on an LSD.

져 있어,⁴⁾ 이는 단위 뿌리혹 건물중당 질소고정능력이 낮은 원인이 되고 있음을 알 수 있다.

根瘤着生 및 뿌리혹 형성에는 酸素, 水分, 溫度 및 窒素水準 등 환경요인과 微生物 측면에서 根瘤菌의 感染能力 등 복합적인 요인의 相互作用에 의해 좌우되는데,^{3, 4, 7, 10, 15)} 최근 두과 식물의 뿌리에서 분비된 flavonoid계통의 低分子化合物이 根瘤菌의 根瘤着生 遺傳子(nod gene)를 활성화 또는 억제하는 機作이 밝혀짐에 따라^{9, 16)} 기주식물의 根瘤着生에 대한 중요한 역할이 점차 인식되어가고 있

Table 4. Nodulation characters of Bragg and nts mutants in a mixture and in a monoculture.

Genotypes	Nodule number no. plant ⁻¹	Nodule dry wt. mg plant ⁻¹
Monoculture		
Bragg	89 ± 11*	144 ± 5
nts 382	784 ± 68	327 ± 23
nts 246	688 ± 29	320 ± 9
Mixture of Bragg and nts 382		
Bragg	79 ± 18	164 ± 21
nts 382	704 ± 60	314 ± 12
Mixture of Bragg and nts 246		
Bragg	102 ± 15	167 ± 13
nts 246	537 ± 64	283 ± 15

* : Data represented mean ± standard error of four replications.

다. 표 4는 nts 계통의 뿌리로부터 根瘤着生을 촉진시키는 물질이 있는지, 또는 이와 反對로 Bragg에서 根瘤着生을 억제하는 물질이 분비되고 있는지의 假說을 재배적으로 검증하기 위하여 nts 계통과 Bragg를 近接播種하여 뿌리간의 相互接觸을 유도하여 뿌리혹 형성능력을 조사한 것이다. 遺傳子를 혼합하여 近接播種時에 nts 系統에 의한 Bragg 根瘤着生이 촉진되거나 Bragg에 의한 nts 系統의 根瘤着生이 억제되지 않는 것으로 보아 超多根瘤着生 形質은 뿌리분비물등에 의한 根圈의 외적인 요인보다는 식물체내의 다른 요인에 의해 결정되고 있음을 시사하고 있다. 이를 뒷받침하는 결과로서, Bragg와 nts 系統간의 相互接木實驗에 의하면,^{5, 14)} Bragg에는 지상부에서 생성된 미확인 물질이 지하부로 전유되어 根瘤着生을 억제하는 반면에 超多根瘤着生性 nts 系統은 이물질의 생성 능력이 없는 것으로 알려져 있다.

한편 nts 系統의 과도한 根瘤着生으로 지하부의 뿌리혹 형성 및 窒素固定을 위하여 지상부의 많은 光合成 물질을 필요로 함으로 지상부의 생육이 저해되어 개체당 수량이 wild type에 비하여 떨어진 다. 그러나 矮小한 지상부 생육때문에 밀식이 가능하고, 도복에 강하여 단위 면적당 수량은 크게 떨어지지 않는데, 1987년 미국조지아주에서 3개지역에 걸쳐 수행된 재배시험의 평균치에 의하면 Bragg는 10a당 268kg이었으며, nts 246와 nts 382가 각각 264kg, 229kg을 나타내었다.¹⁾ 따라서 초다근류착생 콩은 척박지의 높은 콩생산을 가능하게 하여 栽培地의 확대 뿐만아니라, 시비절감 및 시비에 의한 환경오염 문제의 해결과 根瘤着生機作을 구명할 수 있는 좋은 생물학적 재료로 생각된다.

摘 要

超多 根瘤着生性 콩 nts 382 및 nts 246와 wild-type인 Bragg의 초기생육, 뿌리혹 形成 및 窒素固定能力을 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같이 요약된다.

1. nts 系統은 뿌리혹건물중이 현저히 높아서 파종 후 31일째에는 Bragg에 비하여 2.5배지 3.5배에 달하였다.
2. nts 系統은 과도한 뿌리혹 형성때문에 地上部 光合成產物을 많이 소모하여 지상부의 생육이 저해되었다.

3. 개체당 아세틸렌還元能力은 nts 系統이 높았지만 뿌리혹 건물중당 아세틸렌還元能力은 낮아 Bragg의 약 50%수준이었다.
4. Bragg와 nts 系統을 혼합하여 近接播種時에 根瘤着生 能力에 遺傳子相互間 影響을 주지 않았다.

引用 文獻

1. Boerma, H. R. 1990. Personal comm.
2. Carroll, B. J., D. L. McNeil, and P. M. Gresshoff. 1985. Isolation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. Proc. Natl Acad. Sci. USA 82 : 4162-4166.
3. Davis, L. C. 1980. Limiting factors in nitrogen fixation. What's New in Plant Physiol. 11(11) : 41-44.
4. Day, D. A., G. D. Price, K. A. Schuller, and P. M. Gresshoff. 1987. Nodule physiology of a supernodulating soybean (*Glycine max*) mutant. Aust. J. Plant Physiol. 14 : 527-538.
5. Delves, A. C., A. Mathews, D. A. Day, A. S. Carton, B. J. Carroll, and P. M. Gresshoff. 1986. Regulation of the soybean-*Rhizobium* nodule symbiosis by shoot and root factors. Plant Physiol. 82 : 588-590.
6. Delves, A. C., B. J. Carroll, and P. M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis and complementation studies in a number of mutant supernodulating soybean lines. J. Genetics 67 : 1-8.
7. Denison, R. F. and T. R. Sinclair. 1985. Diurnal and seasonal variation in nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. Agron. J. 77 : 679-684.
8. 김창진, 김성훈, 이윤, 유익동, 민태익. 1985. 대두 접종제 개발을 위한 優秀 根瘤菌의 選拔 및 Plasmid 특성. 한국농화학회지 28(3) : 149-155.
9. Kosslak, R. M., R. Bookland, J. Barkei, H. E. Paren, and E. R. Applebaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7428-7432.
10. Lawn, R. J. and W. A. Brun. 1974. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulation. Crop Sci. 14 : 11-16.
11. 이홍석, 권오하, 김광호. 1988. 大豆의 土壤 酸度에 따른 窒素反應 研究. 1. 土壤 및 養液의 酸도와 窒素 施用量이 콩의 根瘤着生, allantoin에 窒素 및 全窒素 含量에 미치는 영향. 한국작물학회지 33(1) : 38-47.
12. 이홍석, 구자환. 1989. 養液栽培에 있어 根瘤菌의 接種 및 窒素反應에 관한 研究. 1. 根瘤菌의 接종 및 질소시용량이 대두품종의 根瘤着生, 전질소 및 Allantoin 질소 함량과 종실중의 조지방 및 단백질 함량에 미치는 영향. 한국토양비료학회지 22(3) : 245-252.
13. 이홍석, 윤성환. 1989. 養液栽培에 있어 根瘤菌의 接種 및 窒素反應에 관한 研究. 2. 根瘤菌의 接종 및 질소시용량이 대두품종의 生育 및 收量에 미치는 影響. 한국작물학회지 34(4) : 400-407.
14. Lee, S. H., D. A. Ashley, and H. R. Boerma. 1991. Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild-type soybean. Crop Sci. 31 : 688-693.
15. Patterson, T. G. and T. A. LaRue. 1983. Nitrogen fixation by soybeans: seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. Crop Sci. 23 : 488-492.
16. Peters, N. K., J. W. Frost, and S. R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233 : 977-980.
17. Reneau, Jr. R. B., D. F. Berry, and D. C. Martens. 1990. Fate and Transport of selected pollutants in soil. Seoul Natl. Univ. Intl. Symp. Environ. Pollut. Agri. 14-44.