

두과작물 근류균에 대한 생리 및 생화학적 연구

I. 근류균 균주의 특성과 접종시험

임 선 우

서울대학교 농과대학
(1969, 12, 27. 수리)

Physiological and biochemical studies on legume nodule bacteria, *Rhizobia*

I. Some characteristics of isolated strains of *Rhizobia* and inoculation test on soy bean.

Sun-Uk Lim

College of Agriculture, Seoul National University

(Received Dec. 27. 1969)

Summary

On the basis of the specific interrelationship between the species or variety of leguminous crops and the species or strain of nodule bacteria, *Rhizobia*, the rhizobial species and strain must be effectively chosen for the successful inoculation.

The present paper describes on some results of the isolation and taxonomic study on the native rhizobial strains isolated from the nodules of five species of leguminous crops such as numerous varieties of soy bean, lespedeza, birdfoot trefoil, ladino and red clovers.

The isolated strains of soy bean nodule bacterium, *Rhizobium japonicum* were grouped through the inoculation test on variety Changdanbaikmock into the effective, noneffective and toxic strain for the nodule formation.

In the study of the effect of some inorganic and organic nitrogenous compounds on the growth of *Rhizobium japonicum* strain Ac 20, a promotive response was showed by asparagine, and glutamine, but hydroxylamine, nitrite, hydrazine and azide was inhibitory at the concentration of $10^{-2}M/l$ in mannitol-yeast extract basal medium.

In the physiological characteristics each strain showed somewhat different activities of the indole-3-acetic acid formation and hydrogenase and discussed with these characters in relation to nodule forming ability.

서 론

두과식물이 근류균과 공생하여 질소를 고정동화하고 있음은 기주작물의 영양과 토양비옥도의 향

상을 위하여 매우 유익한 현상이나 근류형성 과정과 질소고정작용의 화학기작은 아직 구명되지 못한점이 많으며 또한 두과식물과 균종 및 균주의 사이에는 여러 복잡한 특수성이 있는 것으로 알려

본연구는 FY.69 문교부 학술 연구조성비에 의하여 이루어짐

저있다.¹⁾ 두과작물의 근류균에는 같은 종에서도 근류의 형성성과 질소의 고정능력이 달라 무효균주와 유효균주로 나누며^{2),3)} 또한 유효균주도 기주작물의 품종에 따라 근류의 형성성과 질소의 고정능력이 다르므로⁴⁾ 실제로 작물의 재식에 있어서 근류균을 인공접종함에는 품종 대 균주의 친화성을 검토하여 선정되어야 할 것이다.

본 시험은 우리나라 수개지역의 여러 대두 품종과 alfalfa 및 clover 류의 두과사료작물의 근류에서 근류균을 분리하여 형태, 배양특성 및 생리적 성질을 조사하여 분류 동정하고 분리한 여러 대두근류균을 대두에 접종배하여 얻은 근류형성성의 시험결과를 보고한다.

재료 및 방법

근류균을 채집분리하기 위하여 수개지역의 대두 재배지와 목야지 또는 시험포에서 생육상태가 좋은 작물의 뿌리를 채집하여 보통 방법⁵⁾으로 분리하여 mannitol-yeast extract agar 배양기에서 배양 (25°C, 3~7일) 한것을 manual^{6),7)}에 따라 형태, 배양특성 및 생리화학적 성질을 조사 검토하여 동정 하였다.

탄수화물에서 산생성력과 발효성을 조사하기 위

하여 mannitol을 첨가하지 않은 yeast extract 기초 배양액에 각 탄수화물과 0.2% brom-thymol-blue 용액을 가하고 봉관을 넣어 48 시간배양하여 변색과 gas 발생정도를 관찰하였다.

hydrogenase의 활성은 methylene blue의 환원에 의한 변색을 비교 하였으며 indole 초산 생성력은 mannitol-yeast extract 기초 배양액에 L-tryptophan (10⁻²M/l)을 가하고 균현탁액의 일정량을 접종하여 항온실 (25°C)의 rollerdrum에서 5일간 배양한 다음 ether로 추출하고 여기에 1 ml의 물을 가하여 ether는 증발시킨다음 Salkowski 시약⁸⁾으로 발색 비교하였다.

균의 생육 및 배양에 미치는 질소화합물의 영향은 기초 배양액에 1×10⁻²M/l와 2×10⁻²M/l의 농도로 각각 첨가하여 접종 배양여 혼탁도를 측정하였다. 대두에 대한 균의 접종시험은 70%의 알콜과 0.1%의 승홍수로 종자의 표면을 살균하고 멸균수로 씻은 다음가열 살균한 vermiculite에서 발아시켜 생장이 고른것을 골라 모래와 vermiculite를 혼합한 것을 담은 PVC 용기 (φ9cm)에 3분씩 3반복으로 이식하고 균의 mannitol-yeast extract 현탁액을 뿌리에 접종하고 배양액⁹⁾을 담은 좀더 큰 용기에 놓아 재식하고 매주배양액을 갱신하여 4주후에 근류의 형성성을 조사하였다.

결과 및 고찰

Tab. 1. Morphological and cultural characteristics of legume nodule bacteria.

Name of host crops	soy bean	alfalfa	ladino clover	Korean lespédeza	birdfoot trefoil
Name of bacteria	<i>Rhizobium japonicum</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. sp.</i>	<i>R. sp.</i>
Shape	slender rod	rod	rod	slender rod	slender
Growth on Bouillon agar	(±)	++	(±)	(±)	(±)
Growth on mannitol-yeast extract agar*	slow	faster	faster	slow	slow
	R. Gl. Op. W. buty. Gm.	R. Gl. Op. W. buty. Gm.	W. Gm. muc.	R. Gl. W. sl.	R. W. Gm.
Gram-stain	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+
Fragella	monotri.	peritri.	peritri.	peritri.	peritri.
Bacteroid	long	club, branch.	pear, swollen	rod	rod
Relation to O ₂	aerobic	aerobic	aerobic	aerobic	aerobic
Litmus milk	alkaline	acid	alkaline	alkaline	alkaline
Serum zone on litmus milk	-	+	+	-	-

* Notes (abbreviation) -; negative, +; positive, R.; raised, Gl; glistening, Op; opaque, W; white, buty; butyrous, Gm; gummy, muc; mucilous, sl; slimy

대두(*Glycine max L.*), alfalfa (*Medicago sativa L.*), Ladino clover (*Trifolium repens L.*) Korean lespedeza (*Lespedeza stipulacea*) 및 Birdfoot trefoil (*Lotus corniculatus L.*) 등의 두과작물의 근류에서 분리한 균의 형태 및 배양적특성을 종합하여 보면 Table 1 과 같다.

여러 지역에서 채집 분리한 근류균들은 그 형태와 배양적특성이 manual¹⁷⁾에 제시된바와 같이 균종사이에는 bacteroid의 형태, mannitol-yeastextract agar에서의 colony 형태 그리고 litmus milk에 대한 작용에 차이가 있었으며, 이성질은 근류균의

grouping에 있어서 중요한 성질의 하나이며 alfalfa의 근류균, *Rhizobium meliloti*만이 산성이고 대두와 다른 사료작물의 것은 alkaline이었고 Lab. 효소에 의한 serum zone은 *Rhizobium meliloti*와 *R. trifolii*에 의하여 형성되었다.

분리한 균종 및 균주에 대한 생리시험은 9종류 탄수화물의 이용성, 발효성 및 유기산 생산성, L-tryptophan을 기질로 한 indole-3-acetic acid(IAA)의 생산력 그리고 hydrogenase의 활성을 시험한 결과는 Table 2 과 같다.

탄수화물에 대한 작용과 발육상태를 보면 균주

Tab. 2. Acid and gas producibility from carbohydrates by some isolated rhizobial strains

Strain	gluc.		fruc.		galac.		arab.		lact.		malt.		sucr.		raf.		star.		IAA	H ₂ -ase
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G		
Ac 3	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	+	+
" 4	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
" 6	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
" 8	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
" 11	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
G 25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
" 26	+	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OR 5	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
" 9	+	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
" 15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
" 19	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
" 24	+	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
" 27	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
" 29	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
" 32	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	(+)	+
" 36	+	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA 1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LB 3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LC 3	+	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
RC 5	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Notes: A; acid G; gas

gluc; glucose fruc; fructose galac; galactose
 arab; arabinose lact; lactose malt; maltose
 sucr; sucrose raf; raffinose star; starch
 IAA; indole-3-acetic acid H₂-ase; hydrogenase

-; acid, gas not produced

(+); acid, gas produced questionably

++; acid, gas produced

+++; acid, gas produced highly

와 탄수화물의 종류에 따라 많은 차이가 있었으나 대체로 pentose 보다는 hexose를 oligo- 및 polysaccharide 보다는 monosaccharide를 더 잘 이용하는 편이었다. 특히 lactose와 starch의 이용성 및 발육은 좋지 않았으며 raffinose도 비슷하게 좋지 않았다. 목초 근류균중에는 선택적으로 이를 이용하는 것도 있었다. 탄수화물의 이용성과 발효에 의한 gas 발생정도와는 같지 않았다. indole 초산 생산력의 시험결과는 균종과 균주에 따른 차이가 많았으며 시험균주에서 생산력이 없는 것이 많았으나 이활성과 기주식물과 공생할때의 활성과는 다를 것으로 생각된다. 또한 이 indole 초산 생산력과 그 균의 유효성과의 관계는 일치 된다고 보기는 어려우나 근류형성에 있어서 균이 작물의 근모에 감염 되면 그 부분이 위축되거나 변형되는데 그 원인은

indole 초산의 분비에 의한 것이며 nitrite^{10, 11)}가 근류 형성을 저해하는 것은 nitrite에 의한 indole 초산생성의 억제나 파괴에 의한것으로 해석 하고 있으므로¹²⁾ indole 초산의 생산력으로 그 균의 활성과 유효성을 비교하는데 도움이 될것으로 생각한다.

hydrogense의 활성을 배양상태에서 비교 조사한 결과도 균주에 따른 차이가 많으며 이 효소는 분자질소의 고정반응계에 있어서 분자수소를 활성화 하여 전자를 유리시켜 이를 ferredoxin, flavodoxin 등의 전자 전달체에 전달하여 nitrogenase 반응계에 관여하게 되므로^{13), 14)} 질소의 고정력과 관련된것은 성질일것으로 생각된다.

이상 분리균들의 형태, 배양, 탄수화물에 대한 작용등으로 보아 동정, 선발된 균주는 Table 3과 같다.

Tab. 3. Isolates of Rhizobia

Modf. No. strain	Variety	locality	modfino Strain.	Variety	locality
균주번호	대두품종명	채 집 지	균주번호	대두품종명	채 집 지
Ac 1	Hong Kong	수원, 농대시험포	OR 3	밀태	수원, 작물시험장
" 2	안전대립	"	" 4	울산	"
" 3	울산	"	" 5	금산중	"
" 4	Chippewa	"	" 6	장백 29	"
" 6	갑산재래	"	" 8	청두	"
" 8	Hasilkali	"	" 9	황색중립	"
" 9	금강대립	"	" 11	아리다리콩	"
" 11	충북백	"	" 12	길금콩1호	"
" 12	early aliana	"	" 13	이용콩	"
" 14	육우 3	"	" 15	금화재래	"
" 16	Clark	"	" 19	용곡	"
" 17	함안	"	" 21	재래12호	"
" 18	금두	"	" 22	재래14호	"
" 19	진주재래	"	" 23	반청두	"
" 20	장단백목	"	" 24	영광1호	"
G 21	백콩	진주, 농대시험포	" 27	Dorman	"
" 22	충북백	"	" 28	등산6호	"
" 25	울산	"	" 29	Hood	"
" 26	등산 6	"	" 31	Jackson	"
" 27	형	"	" 32	Oden	"
" 28	선비잡이	"	" 36	옥치조생	"
" 29	옥금	"	" 37	단파흑	"
" 31	장단백목	"	" 38	적협	"
			" 41	삼석대두	"
			" 42	네마시리스	"
			" 43	이와태 2	"
			" 44	황색추대두	"
			" 46	백모9호	"

OR	48	시로메유다가	수원, 작물시험장
"	51	오우 13	"
"	52	환대두	"
"	53	복정	"
"	54	청천석	"
"	55	백협1호	"
"	56	옥작	"
"	57	D514-20	"
"	59	D53-526	"
"	60	51-32	"
"	62	51-14	"
"	63	NK-5	"
"	64	86112	"
"	69	157432	"
"	74	Pickett	"
"	81	부채콩	"

LA	1	alfalfa	화산, 축산시험장
"	2	"	"
"	3	"	성환, 종축장
LB	3	birdfoot trefoil	"
"	4	"	화산, 축산시험장
"	1	"	"
LC	3	ladino Clover	"
LR	1	red clover	"
"	2	"	"
KL	5	korean lespedeza	춘천, 농대목야지
RC	5	red clover	"

한 근류균주들의 생육에 끼치는 몇가지 무기 및 유기질소 화합물의 영향을 조사한 결과는 table 4 와 같다.

Tab. 4. Effect of combined nitrogen on the growth of a rhizobial strain, *Rhizobium japonicum* strain Ac 20.

	O.D. (660m μ)	
	1×10^{-2} M/l	2×10^{-2} M/l
KNO ₃	.35	.32
NH ₄ Cl	.34	.36
NaNO ₂	.28	.18
NH ₂ OH	.02	.01
NaN ₃	.03	.01
NH ₂ NH ₂	.01	.01
thiourea	.25	.21
urea	.25	.26
asparagine	.41	.46
glutamine	.40	.42
control	(.33)	

근류의 형성과 질소의 고정작용에 끼치는 질소 화합물의 영향은 물론 종류와 농도에 따라 달라 나타나나 nitrate 와 nitrite 에 의하여는 저해되거나 지연된다고 보고 된바 있으며^{15), 16)} 두과작물의 실제경작에 있어서 질소비료를 절제하는 것도 근류균의 활동에 불리한 영향을 주기 때문이다.¹⁷⁾ 배양에 첨가한 이질소 화합물에 대한 균의 감응은 hydroxylamine, hydrazine 및 azide 에 의하여 발육이 거의 완전히 저지 되었으며 nitrite, urea 및 thiourea 등이 억제하였고 asparagine 과 glutamine 의 첨가에 의하여는 촉진적인 효과를 나타내었으

나 보다더 광범위하게 많은 화합물과 다른 탄소원 화합물 및 특수 생장요소들과 아울러 정량적으로 검토되어야 할것이다.

기주식물에 대한 균의 점종성을 시험하기 위하여 대두 품종 "장단백목"에 여러 균주를 각각 점종하여 근류 형성성을 조사한 결과는 Table 5 과 같다.

Tab. 5. Nodule forming test by the inoculation with various rhizobial strains on soy bean var. Changdanbaikmock.

strain	nodule forming ability	strain	nodule forming ability
AC 2	+	OR 3	+
" 3	+	" 8	+
" 4	+	" 9	○
" 6	+	" 11	○
" 8	+	" 12	+
" 9	+	" 15	+
" 11	+	" 21	+
" 12	+	" 22	○
" 14	+	" 23	+
" 17	+	" 24	+
" 19	+	" 27	○
" 20	+	" 28※	○
		29	+

Note; ○ : no nodule
 + : 1~5 nodules
 ++ : 5~10 nodules
 +++ : >10 nodules
 ※ the root is deformed,

접종한 25 균주 가운데 5 균주는 근류를 형성하지 못하였으며 다른 균주는 다소의 차이가 있었고 AC 20 균주에 의하여 가장 많은 근류가 형성되었다. 그리고 균주 OR 28 을 접종한 대두의 뿌리는 근류가 형성되지도 않았고 근의 발육이 억제되고 뿌리의 끝이 둔하게 변형되어 있었다. 이와같이 균주 대 기주식물의 관계는 특수하며 이미 이러한 상호 특수관계에 대하여 보고된 바 있으며¹⁸⁾ 대두근류에 유효, 무효균주의 구분이 있고^{2, 3} *Rhizobium phaseoli* 에 있어서와 어느 대두근류에 있어서는 근류를 형성한 것이라도 질소의 고정량에 차이가 있는 것으로 알려져 있다.⁴ 또한 균주의 근류형성능력과 대두품종과의 관계를 품종의 계통성과 관련하여 추구한 바 있으며¹⁹ 종 사이에 근류형성의 특이성을 핵산(DNA)의 첨가에 의하여 형질전환을 이룩켜 유효한 결과를 얻을 수 있었다.^{20), 21)}

근류균의 감염에 의하여 기주식물에 이상이 유발된 예로는 황화현상이 보고 되었으며^{22), 23)} *Rhizobium japonicum* 의한 균주가 생산하는 유독성 물질을 분리하여²⁴⁾ 염기성 유황 함유 amino 산으로 Rhizobitoxine 이라 부르고 있으나²⁵⁾ 균주 OR 28 에 의한 장애는 그 원인이 불분명하다.

두과작물을 자연상태에서 재배하고 근류균을 접종하여 좋은 효과를 얻어주기에는 이러한 식물 대 균주의 특수 상호관계와 영양상태등을 검토하여 알맞은 조건을 선정하여야 될 것이다.

요 약

두과작물과 그 근류균은 특수한 상호관계에 있으며 복잡한 과정을 거쳐 분자질소의 고정작용이 이루어지고 있는 것이다. 기주식물의 종류, 품종에 대한 근류균종 및 균주의 접종친화성은 특이하여 근류형성성과 질소고정력이 다르므로 유효균주를 선발하여接种의 효과를 기대하게 된다.

본 실험은 우리나라에 재배 또는 야생하는 두과작물 가운데 대두와 사료작물인 alfalfa, clover 류, lespedeza, birdfoot trefil 의 근류균을 수계지역의 여러 품종(대두)에서 채집 분리하여 균의 형태, 배양 및 생리적인 성질등을 조사 비교하여 동정하고 대두 근류균을 대두에 접종하여 근류형성성을 조사 하였다.

분리한 균종과 균주는 형태와 배양특성 및 생리적인 성질로 분류되어 대두 근류균 56 과 사료작물에서 11 균주를 분리 선발하였다. 각 균주는 탄수화물의 이용성, 유기산생산성, hydrogenase 활성 및 indole 초산 생리력에 많은 정도의 차이

가 있었으며 이성질을 근류균 활성과 관련하여 고찰하였다.

근류균의 생육에 끼치는 몇가지 질소화합물의 영향을 시험한 결과는 화합물의 종류와 농도에 따라 달리 나타났으며 asparagine 과 glutamine 이 가장 유효하였고 hydroxylamine, hydrazine, nitrite azide, thiourea 등은 $1 \times 10^{-2} M/l$ 의 농도에서 균의 발육을 심히 저해하였다.

대두 품종 "장단백목"에 대한 25 균주의 접종시험결과는 20 균주가 상이한 정도로 근류를 형성하였고 5 균주가 근류를 형성하지 않았으며 이 가운데 한 균주에 의하여는 뿌리의 발육이 억제 변형되어 있었다. 이로써 대두품종에 대한 근류균 균주의 근류 형성 친화성을 확인하였다.

이 연구는 1969 년도 문교부 연구조성비의 지원으로 수행하였으므로 이에 당국에 감사하며 또한 연구의 진행에 많은 격려와 고견을 베풀어주신 이춘영 교수, 시료채집에 적극 협조하여주신 김동암, 한상기 교수와 작물시험장 박근용 과장에게 감사의 뜻을 포함합니다.

참 고 문 헌

1. Vincent, J.M. : in "Soil Nitrogen" edited by Bartholomew, W.V. and Clark, F.E. Amer. Soc. Agron., Madison, p 413 (1965)
2. Theornton, H.G.: Nature, 156 654 (1945)
3. Burton, J.C. and Allen, O.N. and Berger, K.C: Proc. Soil Sci. Amer. 167 (1951)
4. 石澤修一: 日土肥誌 25, 4 (1965)
5. Pramer, D. and Schmidt, E.L: Experimental Soil Microbiology Burgess, Minneapolis p.63 (1965)
6. Soc. Amer. Bacteriologists; Manual of Microbiological Methods, Mc Graw-Hill, New York (1957)
7. Breed, R.S., E.G.D. and Smith, N.P.: Berg-ey's manual of determinative bacteriology, 7th ed., Willan & Wilkins, p.286(1957)
8. Gordon, S.A. and Weber, R.P: Plant Physiol. 26, 192(1951)
9. Raggio, M., Raggio, N. and Torrey, J.G.: Amer. J. Botany 44, 325 (1654)
10. Kefford, N.P., Brockwell, J. and Zwar, J.A.: J. Soil Sci. 13, 456(1960)
11. Rovira, A.D.: Plant Soil 11, 53 (1959)
12. Tanner, J.W. and Anderson, I.C.: Nature, 198,

- 303 (1963)
13. Burris, R.H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **17**, 155 (1966)
 14. Hardy, R.W.F. and Burns, R.C.: *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 331 (1968)
 15. van Schreben, D.A.: *Plant Soil* **11**, 93 (1956)
 16. Gibson, A.H. and Nutman, P.S.: *Ann. Bot.* **24**, 420 (1960)
 17. 村山登.: 土壤肥料全篇 (2版) 養賢堂, 東京 p. 624 (1960)
 18. Allen, E.K. and Allen, O.N.: *Encyc. Plant Physiol.* **8**, 43 (1958)
 19. 鎌田悦男: 日作物紀 **31**, 78 (1962)
 20. Balassa, R.: *Naturwiss.* **43**, 133 (1956)
 21. Bergersen, F.J. and Briggs, M.J.: *J. gen. Microbiol.* **19**, 482 (1958)
 22. Erdman, L.W., Johnson, H.W. and Clark, F.E.: *Plant Disease Report* **40**, 646 (1956)
 23. Johnson, H.W., Means, U.M. and Clark, F.E.: *Nature*, **183**, 308 (1959)
 24. Owens, L.D. and Thompson, J.F.: *Bacteriol. Proc.* (1967) 19
 25. Owens, L.D., Guggenheim, S. and Hilton, J.L.: *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 219 (1968)