

野山 牧草地用 耐酸性 優秀 窒素固定菌株 開發

III. 野山 開墾地에서 *R. meliloti* “YA03”의 알팔파 接種效果

姜渭金* · 崔柱鉉** · 李載生* · 鄭鍊泰*

Studies on the Development of Acid Tolerant and Superior Nitrogen Fixation Symbionts for Pasture on Hilly Land

III. Inoculation Effect of *R. meliloti* “YA03” to Alfalfa on Hilly Acid Soil

Ui-Gum Kang*, Ju-Hyeon Choi**, Jae-Saeng Lee*, and Yeun-Tae Jung*

SUMMARY

An acid tolerant *R. meliloti* “YA03” which was characterized through both acidified tube and pot soil experiment, was examined on its inoculation effect to alfalfa [*Medicago sativa* (L.)] cv. Vernal on hilly acid soil. It was conducted for 2 years to evaluate inoculation residual effect and there were two-fertilizer factors of nitrogen(0, 8kg/10a) and lime(0,162kg/10a) as urea and Ca(OH)₂, respectively.

The results obtained were summarized as follows :

1. In the 1st-year experiment, YA03 inoculated without nitrogen and lime application showed higher symbiotic effectiveness than check strains, YA026 and Rm2011 in nodule mass, N₂-fixing activity, and dry matter yield, but with N 8kg/10a application lower effectiveness than Rm2011.
2. In the 2nd-year experiment, Alfalfa dry matter yield by YA03 inoculation with N application(without lime) was 74% higher than that(276 kg/10a) in the 1st year, and the value showed 166%, 20%, and 21% increments as compared with noninoculated control(180kg/10a), YA026(399kg/10a), and Rm2011(397kg/10a), respectively.
3. In the 2nd-year experiment of N applied plot(without lime), especially, YA03 showed higher shoot nitrogen(7.7kg N/10a/Yr.) fixed and soil rhizobial population(1×10⁴ cells/g. soil) than check strains.
4. On the basis of lime application, application effect of three major fertilizers with YA03 inoculation on alfalfa yield and soil rhizobial population was in the order of N+P₂O₅+K₂O > P₂O₅+K₂O > P₂O₅+K₂O.
5. On the whole, alfalfa yield by acid tolerant *R. meliloti* YA03 inoculation on hilly acid soil was enhanced with nitrogen application, and besides it appeared 44% higher with lime than without lime.

緒 言

우리나라 野山地는 그 傾斜度面에서 볼 때, 대부분 이 草地開發 可能地域으로 分類된다¹³⁾. 그러나, 瘠薄

한 野山地에서 草地를 造成할 경우에는 肥沃度 改善을 위한 土壤 改良作業이^{6,7)} 隋伴되므로, 이를 勘案한 草種의 選擇이 重要할 것으로 생각된다.

일반적으로, 豆科 牧草인 알팔파는 良質粗飼料 給

* 嶺南作物試驗場(Yeongnam Crops Exp. Sta., RDA, Milyang, Korea)

** 農業研究所(Agricul. Chemicals Research Institute, RDA, Suwon, Korea)

源으로서 일반 家畜의 嗜好性이 높을 뿐만 아니라, 共生根瘤菌 *R. meliloti* 接種에 의한 空中窒素 固定效 果를 크게 期待할 수 있어 經濟的인 草種으로 推 薦 된다¹⁾. 하지만, 根瘤菌 *R. meliloti*는 窒素固定力 發 現에 있어서 다른 根瘤菌 보다 土壤 肥沃度 특히, 酸 度의 影響을 많이 받기^{8, 11, 17)} 때문에, 우리나라 野山 地처럼 酸性의 土壤條件에서 經濟的인 알팔과 草地 를 造成하려면 耐酸性과 窒素固定力이 높은 優秀 根 瘤菌을 이용하는 것이 바람직하다^{5, 9, 10)}.

본 研究는 野山 牧草地用 優秀 窒素固定菌株 開發 의 일환으로 既 發表된 第 I⁸⁾, II⁹⁾에 이어지는 第 III¹⁰⁾로써, 瘠薄野山地에서 檢討된 耐酸性根瘤菌 *R. meliloti* "YA03"의 알팔과 接種效 果를 報告하고자 한 다.

材料 및 方法

1. 供試 土壤

土壤은 慶南 密陽郡 府北面에 위치한 전형적인 赤 黃色 野山地로써 表1과 같이 土壤反應(pH)이 강한 酸性이면서 有機物, 有效磷酸 含量 등이 매우 낮은 瘠薄한 土壤이었다.

2. 處理 內容

'87年 4월에 供試土壤을 石灰 無施用과 施用 두 條件으로 大別한 다음, 石灰 無施用 條件에서는 前報⁹⁾에서 選拔된 耐酸性菌株 YA03과 對照菌株로써 國 內 選拔된 YA026(未發表) 및 外國 導入菌株 Rm2011³⁾ 을, 石灰施用 條件에서는 YA03만을 Vincent法¹⁵⁾에 따라 Peat培養 후 알팔과 種子 Vernal 2kg/10a에 10⁸cells/seed 水準으로 粉衣接種하여 3反復 散播하였 다. 그리고, 肥料는 表 2와 같이 모두 基肥로 施用하 였다. 이를 試驗 年次別로 보면, 根瘤菌接種 1年次의 境遇 石灰 無施用條件에서는 窒素水準(0, 8kg/10a)을 달 리하면서 磷酸과 加里를 각각 20kg/10a씩 施用하

Table 1. Characteristics of the experimented soil

pH (1:5)	O.M. (%)	Av.P ₂ O ₅ (ppm)	T-N (%)	Ex.cations(me/100g)			Texture
				Ca	Mg	K	
5.0	1.4	9	0.07	0.16	0.26	0.07	Loam

였고, 石灰 施用條件에서는 이들 3要素 肥料를 窒素 + 磷酸+加里, 磷酸+加里, 磷酸, 加里區로 區分하여 施用하였다. 그리고, 接種殘效인 2年次 試驗(단, 石灰 無施用條件은 알팔과 生育이 阻斷되었던 窒素 8kg/ 10a 施用區에서의 殘效試驗)에서는 全 處理區에서 窒素를 缺在하였다.

3. 根瘤菌 接種效果

알팔과에 대한 耐酸性 根瘤菌 *R. meliloti* YA03의 接種效果는 1, 2年次 開花期의 乾草收量과 2年次 試 驗後의 土壤內 根瘤菌 密度¹⁵⁾를 爲主로 檢定하였다. 알팔과 收量은 刈取面積을 試驗區當 4m²(2×2m)로 하여 1年次 試驗에서 3回, 2年次 試驗에서 4回 調查 하였는데 특히, 石灰를 施用하지 않은 條件에서는 1 年次 試驗에서 比較的 뿌리採取가 容易하였던 1, 2次 刈取期의 根瘤重 및 空中窒素 固定力(Hardy 法²⁾)과 2年次 收穫物 中の 全窒素含量(Indophenol-Blue 法¹⁴⁾)을 測定하여 處理間에 根瘤菌 接種效果를 추가 比較하였다.

結果 및 考察

1. 石灰 無施用條件에서의 根瘤菌 接種效果

野山에서 알팔과 栽培時 石灰를 施用하지 않고 根 瘤菌 *R. meliloti*만을 接種했을 때, 試驗 1年次의 刈 取時期別 根瘤重과 空中窒素 固定力 그리고 乾草收 量은 表 3과 같았다. 根瘤菌 接種效果는 全般的으로 뚜렷하였는데, 刈取時期別로 보아서 1次보다 2次 刈 取時에 더 향상된 경향이었다. 이를 窒素의 施肥水準

Table 2. Application contents of fertilizers for experiment

(kg/10a)

Treatments	1987	1988	Fertilizer sources
None Lime	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O-B ₂ O ₃	P ₂ O ₅ -K ₂ O	N : Urea P ₂ O ₅ : FMP
	0-20-20-1	excluded	
Lime [Ca(OH) ₂] 300kg/10a]	8-20-20-1	20-20	K ₂ O : Potassium Chloride B ₂ O ₃ : Borax
	0-20-20-1	20-20	
	0-20-0-1	20-0	
	0-0-20-1	0-20	

別로 比較해 보면, 根瘤重과 窒素固定力은 刈取時期에 관계없이 窒素 無施用區에서 높았으나 乾草生産은 1次 刈取時 窒素施用區에서, 2次 刈取時는 窒素無施用區에서 더 많이 增收된 傾向이었다. 그리하여 窒素施肥 水準에 따른 根瘤菌의 無接種 對比 接種區에서의 乾草生産은 窒素 無施用區에서 1次와 2次刈取時에 70% (7.1kg/10a)와 151% (19.3kg/10a) 增收되었고, 窒素 施用區에서는 각각 108% (116.4kg/10a)와 121% (113.0kg/10a) 增收되었다. 따라서, 野山地에서의 알팔과 根瘤菌 接種에 의한 乾草의 絶對收量은 窒素 無施用區보다 施用區에서 1,540% (1次刈取)-485% (2次刈取) 더 增收된 結果를 나타내었다. 이와같이, 乾草生産에 있어서 窒素施用의 效果가 뚜렷하였던 것은 施用窒素가 瘠薄地 알팔과의 初期 生育을 촉진시켜 뿌리활작을 좋게 하였기^{4,9)} 때문이라 생각되었다. 그리고, 根瘤菌을 접종한 窒素施用區에서 2次 刈取時 根瘤重 및 窒素固定力이 增加되었음에도 불구하고 1次 刈取時에 비해 乾草收량이 減少된 傾向을 보인 것은 根瘤菌의 空中窒素 固定량이 1次 刈取된 植物體의 土壤內 窒素奪取量보다 적었음을 의미하는 것이 아닌가 생각되었다.

그리고, 耐酸性根瘤菌 YA03의 알팔과 接種은 窒素 無施用區에서 1, 2次 刈取時 모두 對照菌株 YA026, Rm2011보다 높은 根瘤重과 窒素固定力 및 乾草收량을 보였으나, 窒素 施用區에서는 대체로 Rm2011에 비해 低調한 接種效果를 보였다. 이러한 가운데서도

窒素施用區에서의 YA03 接種效果는 1次 刈取時 보다 2次 刈取時에 根瘤重의 월등한 增加傾向을 나타내었다. 이는 YA03 菌株가 土壤內 施肥窒素의 存在下에서 다소 低調한 根瘤形成을 보이다가, 植物이 施用窒素를 利用함에 따라 2次 生育期(1次 刈取 後)에서의 알팔과 뿌리感染이 促進되었기 때문으로¹⁶⁾ 看做되었다. 이렇게 볼 때, 2次 刈取時 YA03 接種區에서의 窒素固定력과 乾草收량의 低調는 주로 後期에 着生된 根瘤에서 菌株가 *nif+* 遺傳子를 충분히 發現할 수 있을 만큼의 leghemoglobin이 生合成 되지 못한 데서도 基因되었으리라¹⁶⁾ 짐작된다.

窒素 8kg/10a 施用條件에서의 알팔과 乾草收량은 1年次(接種 當年)와 2年次(殘效) 成績으로 區分해서 보면, 表 4와 같이 無接種區를 포함한 全 處理區가 1年次 보다 2年次에서 平均 45%(無接種區)-56%(接種區) 增加된 傾向을 나타내었다. 그리고, 接種 菌株別 乾草生産은 1年次の 경우 Rm2011(299kg/10a) > YA03(276kg/10a) > YA026(241kg/10a) 順으로써 導入菌株 Rm2011이 가장 좋았으나, 2年次에서는 YA03 (479kg/10a) > YA026(399kg/10a) > Rm2011(397kg/10a) 順으로 耐酸性인 YA03의 接種效果가 돋보였다. 또한, YA03接種區는 試驗 2年次 植物體의 莖葉中에서 對照菌株보다 많은 11.6kg/10a의 窒素 蓄積量을 보였는데, 이는 無接種區에서의 蓄積量을 減할 경우 7.7kg/10a의 空中窒素를 固定한 것으로 해석되었다. 그 결과, YA03接種區에서 1年次 對比 2年次에서의 乾草收

Table 3. Symbiotic effectiveness of *R. meliloti* to alfalfa cv. Vernal according to the application level of nitrogen

Treatments		1st cutting(Jul. 24th, '87)			2nd cutting(Aug. 24th, '87)		
Nitrogen (kg/10a)	Strains	Nodule F.W. (mg/plant)	ARA*	Yield in D.M. (kg/10a)	Nodule F.W. (mg/plant)	ARA*	Yield in D.M. kg/10a)
0	Control	—	—	4.2(100)	—	—	7.7(100)
	YA03	138	137	7.7(183)	269	218	21.6(281)
	YA026	85	89	6.4(152)	227	164	20.4(265)
	Rm2011	65	67	7.3(174)	172	129	15.9(206)
	Av. of inocul.	96	98	7.1(169)	223	170	19.3(251)
8	Control	—	—	55.9(100)	—	—	51.1(100)
	YA03	63	90	123.4(221)	276	107	105.8(207)
	YA026	58	116	106.4(190)	191	104	99.8(195)
	Rm2011	93	101	119.4(214)	167	161	133.5(261)
	Av. of inocul.	71	102	116.4(208)	211	124	113.0(221)

* Acetylene Reduction Activity based on nmol C₂H₄/plant/hr. as N₂-fixing activity

Table 4. Inoculation effect of *R. meliloti* to alfalfa on shoot yield for 2 years*

(kg/10a)

Strains	1987		1988		Shoot N in 1988	N** fixed
	F. M.	D. M.	F. M.	D. M.		
Control	562	124(100)	615	180(100)	3.9(100)	—
YA03	1,309	276(223)	1,762	479(266)	11.6(297)	7.7
YA026	1,153	241(194)	1,461	399(222)	9.5(243)	5.6
Rm2011	1,371	299(241)	1,409	397(221)	9.0(231)	5.1

* From nitrogen application(8kg/10a) plot only.

** N content difference between inoculation and noninoculation plot

Table 5. Soil populations of *R. meliloti* inoculated on hilly acid soil after 2nd-year experiment

Strains	Log ₁₀ no. of cells/g. soil	Remarks
YA03	4.00	Korean acid tolerant strain
YA026	2.00	Korean acid sensitive strain
Rm2011	3.49	Foreign effective strain

量增加는 對照菌株 YA026(66%) 및 Rm2011(3%)보다 더 높은 74%에 달하였다. 뿐만 아니라, YA03菌株는 1, 2年次 全試驗期間의 乾草生産量에 있어서도 가장 높은 755kg/10a의 收量을 보였는데, 이는 對照菌株 YA026(640kg/10a)보다 18%, Rm2011(690kg/10a)보다는 9% 더 增收된 것이었다.

窒素 8kg/10a 水準에서의 이같은 收量은 羅 等¹²⁾이 報告한 石灰含量이 높은 中性土壤(pH-6.5, O.M.-3.2%, Av.P₂O₅-36ppm, Ca-41.2me/100g)에서 根瘤菌을 接種하지 않고 窒素를 28.5kg/10a 施用했을 때의 2年間 收量의 76% 水準이었으나, 試驗된 土壤의 化學性과 窒素施肥量을 考慮할 때 耐酸性菌株 YA03의 알팔과 接種栽培는 實用성이 매우 높을 것으로 判斷되었다. 또한, YA03은 表 5에서 처럼 試驗後 土壤의 根瘤菌 密度에 있어서 接種菌株 가운데 가장 많은 10⁴cells/g. soil의 生菌數를 나타내므로써 酸性土壤에의 높은 適應力이 立證되었다(그림 1 參照).

2. 石灰 施用時 根瘤菌 接種效果

野山地에서 石灰施用에 따른 施肥條件別 耐酸性菌株 YA03의 接種效果는 그림 2와 같았다. 알팔과의 乾草收量은 磷酸, 加里의 單用區 보다는 窒素+磷酸+加里, 磷酸+加里的 混用區에서, 그리고 混用區의

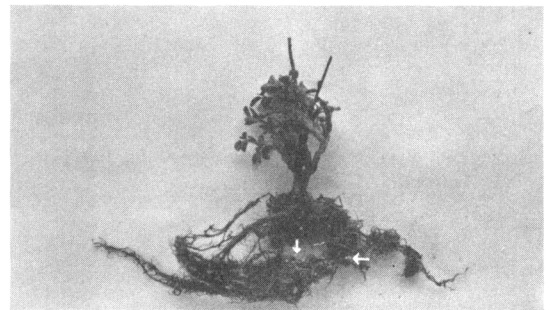


Fig. 1. Alfalfa root and nodule after 2nd-year(1988) experiment in "YA03" inoculation plot with N 8kg/10a.

試驗 1年次 보다는 2年次에서 높게 나타났다. 施肥條件에 따른 乾草收量은 3要素 施用區에서 가장 높았고, 다음으로는 磷酸+加里>磷酸>加里區 順이었는데, 1年次 試驗에서의 收量은 각각 410, 337, 222, 117kg/10a이었고, 2年次에서는 각각 680, 395, 150, 66kg/10a이었다. 따라서, 試驗 1年次 對比 2年次的 收量變化는 3要素 施用區와 磷酸+加里區의 境遇 각각 66% 및 17%의 增加를 나타낸 반면, 磷酸과 加里 單用區에서는 오히려 48% 및 77% 減少된 結果를 보였다.

試驗 後 土壤의 生菌數는 3要素 施用區(31×10² cells/g. soil)에서 가장 높았고, 다음으로 磷酸+加里區(17×10² cells/g. soil)>磷酸區(1×10² cells/g. soil)>加里區(0.6×10² cells/g. soil)順으로써 乾草收量과 같은 傾向을 나타내었다.

그리고, YA03을 接種한 3要素 施用區에서의 2年間 乾草收量은 石灰 無施用條件(表 4參照)에 비해서 44% 더 增收된 傾向이었다. 이같은 현상은 아마도 알팔과가 石灰物質을 많이 吸收하는 植物인 關係로 그

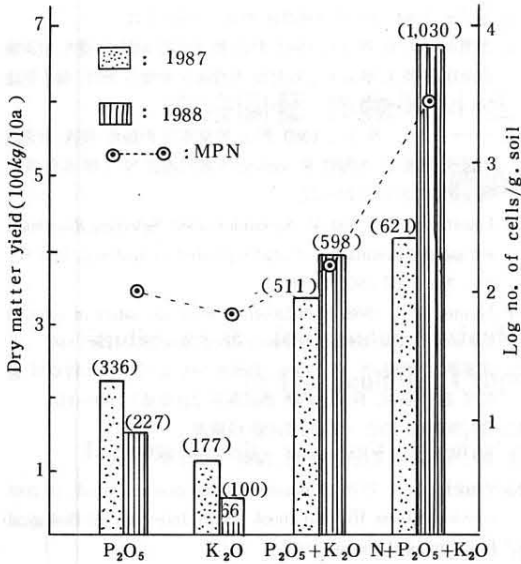


Fig. 2. *R. meliloti* "YA03" inoculation effect according to N, P₂O₅, K₂O application with lime on dry matter yield and soil rhizobial population.

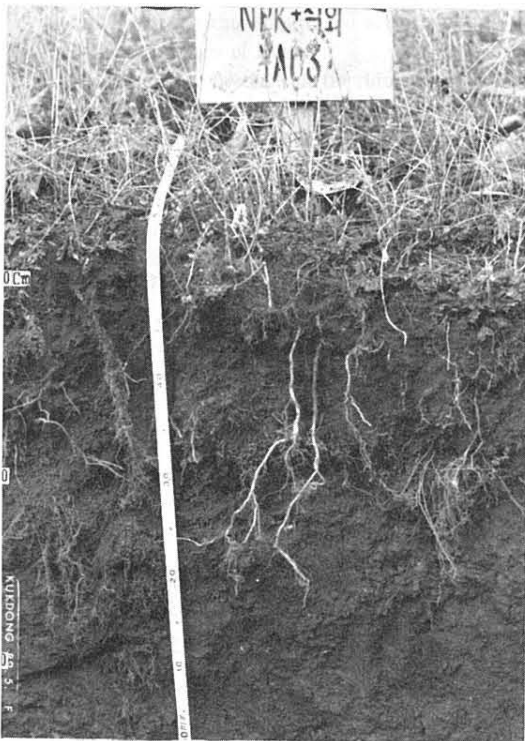


Fig. 3. Alfalfa root extent after 2nd-year (1988) experiment in "YA03" inoculation plot with lime and nitrogen.

림 3과 같이 石灰無施用(그림 1 參照) 보다도 石灰施用條件에서 뿌리 發達⁶⁾ 및 根瘤菌의 共生的 與存^{11,17)} 더 좋았던 까닭이 아닌가 생각되었다.

以上の 결과로 보아, 瘠薄한 野山地에서의 알팔과 草地 造成時 耐酸性 *R. meliloti* YA03의 種子接種은 乾草收量の 增大에 劃期的이었으며, 특히 窒素와 石灰를 施用하지 않는 것 보다는 이들을 多少 施用한 條件에서 立苗率 確保 및 初期生育 促進으로 더 큰 增收效果를 期待할 수 있었다.

그러므로, 國內의 瘠薄한 野山地에서 알팔과의 生産基盤을 보다 經濟的으로 擴充하기 위해서는 *R. meliloti* YA03과 같은 耐酸性 優秀 窒素固定菌의 이용이 必要할 것으로 믿어진다.

摘 要

瘠薄한 野山 開墾地에서의 經濟的인 알팔과 草地 造成을 목적으로 耐酸性 *R. meliloti* "YA03" 根瘤菌 劑의 圃場接種效果를 檢討한 結果는 다음과 같았다.

1. 石灰와 窒素를 施用하지 않은 條件에서, 試驗 1 年次 YA03의 알팔과 接種은 對照菌株 YA026 및 Rm2011에 비해서 根瘤重과 窒素固定力 및 乾草收量の 增加를 보였으나, 窒素를 8kg/10a試用한 條件에서는 대체로 Rm2011보다도 低調한 接種效果를 나타내었다.

2. 石灰施用 없이 窒素를 8kg/10a 施用한 條件에서 YA03 接種區의 乾草生産은 試驗 1年次(276kg/10a)보다 2年次 殘效(479kg/10a)에서 더 높았는데, 이때의 收量은 根瘤菌 無接種보다 166%, 對照菌株 YA026(399kg/10a) 및 Rm2011(397kg/10a)보다는 20내지 21% 더 增收되었다.

3. 耐酸性菌株 YA03은 또한, 石灰없이 窒素施用 2 年次 殘效試驗에서 對照菌株보다 높은 空中窒素 固定量(7.7kg N/10a/Yr.)과 土壤內 生菌數(1×10^4 cells/g. soil)를 보여, 酸性土壤에의 適應力이 優秀하였다.

4. 石灰施用과 함께 YA03 接種時 施肥條件別 알팔과의 乾草生産은 窒素+磷酸+加里>磷酸+加里>磷酸+加里區 順으로써 試驗後 土壤의 生菌數와 같은 傾向을 보였다.

5. 瘠薄 野山地에서 內酸性菌株 YA03의 알팔과 接種에 의한 乾草生産은 窒素無施用보다 施用區에서

높았는데, 이境遇 石灰를 並用하므로써 약 44% 더 增收되는 結果를 보였다.

引用 文 獻

1. Burns, R. C. and R. W. F Hardy. 1975. "Nitrogen-fixation in bacteria and higher plant". Springer-Verlag. P. 189.
2. Hardy, R. W. F. 1979. A treatise on dinitrogen fixation. John Wiley & Sons, New York.
3. Harry M. Meade, Sharon R. Long, Gary B. Ruvkun, Susan E. Brown, and Frederick M. Ausubel. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn 5 mutagenesis. *Journal of Bacteriology* 149(2) : 114~122.
4. Haystead, J. King, W. I. C. Lamb, and C. Marriott. 1980. Growth and carbon economy of nodulated white clover in the presense and absence of combined nitrogen. *Grass Forage Sci.* 35 : 123~128.
5. Howieson, J. G., M. A. E. Wing, and M. F. D'antunono. 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil* 105 : 179~188.
6. Joost, R. E., and C. S. Hoveland. 1986. Root development of sericea lespedeza and alfalfa in acid soil. *Agron. J.* 78 : 711~714.
7. 정연규. 1984. 초지토양관리와 비료. 가리연구회.
8. 姜渭金, 崔柱鉉 外 3人. 1987. 野山 牧草地用 耐酸性 優秀 窒素固定菌株 開發. I. 嶺南地方 牧野地 根瘤菌의 耐酸性 程度. 韓土肥誌 20(4) : 369~373.
9. ———, ——— 外 3人. 1989. 野山 牧草地用 耐酸性 優秀 窒素固定菌株 開發. II. 耐酸性 *R. meliloti*의 器內選拔 및 土壤 接種效果. 韓土肥誌 22(1) : 72~77.
10. Lowendorf, H. S. and M. Alexander. 1983. Selecting *Rhizobium meliloti* for inoculation of alfalfa planted in acid soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47 : 935~938.
11. Munns, D. N. 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid sensitive steps. *Plant Soil* 28 : 129~146.
12. 羅基準, 朴炳勳 外 7人. 1979. 濟州地方에 있어서 導入牧草의 選拔에 關한 研究. 農村振興廳 農試報告 21(畜產) : 99~110.
13. 農村振興廳. 1985. 山地開發試驗 成績書.
14. 農村振興廳 農業技術研究所. 1988. 土壤化學 分析法.
15. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook no. 15. International Biological Programme, London.
16. Winston J. Brill. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiological review* 44(3) : 449~467.
17. Wood M., Cooper J. E., and Holding A. J. 1984a. Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant Soil* 78 : 367~379.