

인삼근 적변현상과 근권 토양환경

양덕조 · 김용해 · 윤길영 · 이성식¹ · 권진이 · 강현미
충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹한국인삼연초연구원
(1997년 5월 17일 접수)

Red-Colored Phenomena of Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) Root and Soil Environment

Deok-Cho Yang, Yong-Hae Kim, Kil-Young Yun, Sung-Sik Lee¹,
Ji-Ni Kwon and Hyun-Mi Kang

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk
National University, Cheongju 361-763, Korea.

¹Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

(Received May 17, 1997)

Abstract : In order to elucidate the mechanism of red-colored phenomena(RCP) in ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer), distribution of inorganic elements of ginseng root and its surrounding soil, and microflora in the soil were investigated. Red brown colored-substances were accumulated in the cell wall of epidermis at early stage of red-colored ginseng(RCG). Cell wall of the late stage of RCG were disordered and microorganisms were shown in the disordered cell wall. Al, Si and Fe contents among inorganic elements in the epidermis of RCG were higher at two or three times than that of healthy ginseng. On the other hand, K content was higher at three times in healthy ginseng than that of RCG. Especially, Fe content was higher at three times in lateral roots of RCG than that of healthy ginseng. Total 21 strains of microorganisms were isolated on the 523 medium from surface soil, surrounding soil of both healthy and RCG, and RCG. Six strains of microorganisms among them were resistant to 2 mM Fe. Two species in *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp., and one species in *Micrococcus* sp. and *Neisseria* sp. respectively were identified. It seemed that RCP was closely related with the distribution and uptake of inorganic elements, was also correlated Fe-independant metabolism of microorganisms.

Key words : Red-colored phenomena(RCP), ginseng root, soil, inorganic elements, microorganisms, Fe.

서 론

인삼뿌리에 나타나는 적변현상(Red-Colored Phenomena; RCP)은 전 산지에서 발생 되고 있으며, 원인을 규명하지 못한 병해로써 인삼근 품질하락의 근원적 요인중의 하나이다. 적변삼의 증상은 초기에는 뿌리표면에 크고 작은 암적갈색의 병반이 생기고 점차 전근으로 확산되며, 표면은 거칠고 부란하게 된다. 표피는 조잡하고 변색되며 2차적인 균의 침입을 받아 부

패된다^{1,2)}. 인삼의 적변현상의 발현과 연관지을 수 있는 토양의 물리·화학적 요인중의 하나는 토양의 유·무기이온의 분포이다. 이들은 식물체의 요구도에 따라 N, P, K, C, H, O등과 같은 1차 필수이온과 Ca, Mg, S와 같은 2차 필수이온, Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo와 같은 미량원소 그리고 Si, Na, Cl의 부수원소로 대별된다.^{3,4)} 그러나 이들의 요구도는 식물 종에 따라 다소간의 유의차를 나타내며, 식물체의 요구도 외는 다르게 토양의 구성은 Al, O, Si 가 대부분을 차지하고 있다.

식물체에 의한 무기 영양분의 흡수 및 이용은 토양의 pH나 질소원(NH_4^+ , NO_3^-) 등에 의해 크게 달라진다.¹⁰⁾ 질소원은 식물체가 직접적인 고정을 통해 흡수하기도 하지만 미생물의 대사과정을 거쳐 흡수되기도 하기 때문에 식물체의 영양생리와 근권 미생물상은 밀접한 상호관계를 갖는다. 식물체와 근권 미생물과의 경쟁적 또는 길항적 관계는 건조나 수분 stress 상태하에서 나타나는데, 식물체는 betaines나 proline 등을 축적하며 이들을 미생물이 이용하기도 한다. 미생물은 아미노산, betaines, 당과 같은 양쪽성 용질이 중요한 보호 역할을 한다.¹¹⁾ 또한 Fe 등과 같이 대사조절의 효소반응에 필수적인 미량원소들의 동원과 흡수도 잘 알려져있다. 특히 Fe은 미생물의 병원성 획득에 주요한 요인이 되기 때문에 토양의 미생물상 구성에 대한 중요한 선택적 압력으로 작용하고 있다.¹²⁾ 미생물은 Fe을 효율적으로 이용하기 위해 저분자 복합물인 catechols이나 hydroxamates 같은 siderophores를 생성하여 분비하고 siderophores는 Fe-특이적인 흡수계를 통해 흡수된다.^{13,14)} 식물의 뿌리는 Fe 결핍상태에서 mugenic acid 또는 avenic acid와 같은 phytosiderophores를 분비하는 것으로 보고되어 있다.^{15,16)} 이들은 미생물에 의해 흡수되기도 하기 때문에 근권에서 유효철 경쟁은 상호간의 성장을 조절하는 요인이 되고 있다.

인삼의 경우 동일 포장에서 장기간 재배되기 때문에 건전삼 생산은 재식토양의 이온분포 및 변화와 미생물의 밀도 및 분포에 의존도가 높다. 이러한 점을 감안하여 볼 때, 적변은 재식토양의 물리·화학적 특성의 변화에 의한 비생물학적인 요인과 미생물상 및 대사활성의 변화와 인삼의 이온흡수기작 등과 같은 생물학적 요인에서 기인된 현상으로 생각할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 적변현상의 원인을 구명하기 위해 적변삼과 건전삼 그리고 근권토양의 무기이온 분포와 미생물상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 형태·해부학적 특성관찰

건전삼과 적변삼의 표피를 분리하여 광학 현미경 하에서 외부형태를 관찰하였으며, 초미세구조를 관찰하기 위해 표피를 일정한 크기(0.5×0.5 cm)의 절편을 만들어 2.5% (v/v) glutaraldehyde로 전고정한 후

1%(v/v) osmium tetroxide로 후고정을 하였다. 고정이 끝난 시료는 alcohol series와 isoamylacetate로 탈수한 후 gold coating하여 주사전자 현미경(Hitachi, SENS-570)으로 관찰하였다.¹⁶⁾

2. 토양시료

무기이온 분석 및 근권미생물을 분리한 토양은 음성 인삼연초연구원의 시험포장에서 4년생 인삼의 채굴시 표토와 적변삼과 건전삼이 발견된 토양을 무작위로 표토는 10 cm²의 표면을 5 cm 깊이까지, 근권토양은 인삼동체를 중심으로 5 cm 주위의 토양을 멸균된 비닐에 채취하였다. 채취된 토양은 실험실의 저온실(4°C)에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

3. 무기이온 분석

(1) EDX(energy dispersive X-ray)에 의한 분석

건전삼과 적변삼 그리고 근권토양의 무기이온 함량은 EDX(Hitachi, S-2500C)로 분석 하였다. 각 토양시료를 자연건조 후 압착한 다음 탄소증착을 하여 상대적인 원소의 무게비율(weight percent)을 측정 하였다.

(2) ICP(inductively coupled plasma)에 의한 분석

건전삼과 적변삼은 각각 부위별(표피, 세근, 피층, 수)로 토양은 표토, 건전삼의 근권 토양 그리고 적변삼의 근권토양으로 구분하여 60°C에서 24시간 동안 건조하였다. 인삼 조직은 0.1 g dry wt.를 취하고, 토양은 0.3 g dry wt.를 취하여 전기로에서 500°C로 2시간 동안 연소시킨 후 20 μl 증류수와 1 ml 5N HNO₃로 용해시켰다. 각 시료는 다시 100°C에서 증발 시킨후 500°C에서 1시간 동안 연소시켜 5N HCl에 용해시킨 다음 원심분리 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 ICP(JY38 PLUS)를 이용하여 이온함량을 측정 하였다.¹⁶⁾

4. 근권미생물상 조사

근권토양과 적변삼을 멸균수로 1% 현탁액을 만들어 28°C에서 24시간 동안 현탁 후 상등액을 523 고체배지¹⁷⁾에 도말하였다. 도말 후 28°C에서 배양하면서 총미생물의 밀도를 조사하였으며 colony의 형태, 색깔, 모양등에 따라 각각 분리한 21종의 미생물을 동일 배지에 3회 계대배양 하였다. 분리된 21종의 미생물은 2 mM의 철($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$)을 첨가한 523 고체배지에서 저항성을 나타내는 미생물만을 선별하여 동정에 이용하였다. 선별된 미생물은 각

각의 생리적 특성을 조사하여 Microbiology a laboratory manual¹⁸⁾에 준하여 동정하였다.

결과 및 고찰

1. 해부·형태학적 특성

적변 초기상태의 표피는 세포벽 사이에서 갈색의 침적물이 다량 관찰되었으며, 적변이 심한 말기상태의 표피는 전체가 갈색의 침적물로 덮여 있음이 관찰되었다(Fig. 1). 또한 주사전자현미경으로 관찰한 건전삼의 표피는 세포벽의 상태가 일정한 장방형으로 전형적인 배열상태를 나타내었으나(Fig. 2A), 적변삼의 경우 세포벽이 파괴되어 기형화되어 있었다(Fig. 2B, C).

특히 적변이 심한 말기상태의 인삼근 표피는 세포벽 파괴 정도가 심하였으며 구멍이 생기는 등 불규칙한 표면구조를 나타내었으며, 파괴된 조직속에서 많

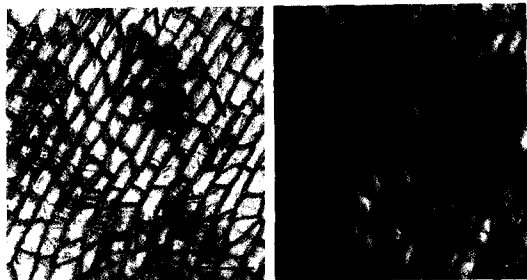


Fig. 1. Light microscopy of epidermis in healthy ginseng(A) and red-colored ginseng(B). Bar indicates 74 μ m.

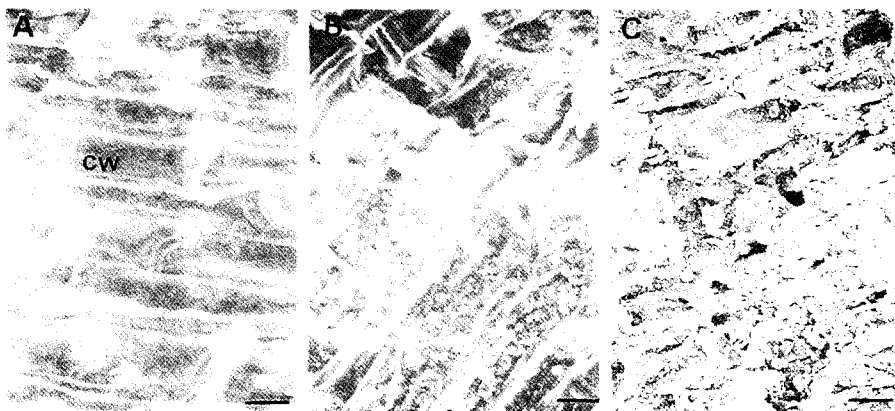


Fig. 2. Scanning electron microscopy of epidermis in healthy ginseng(A) and red-colored ginseng(B, C). B; early stage, C; late stage. CW: cell wall. Bar indicates 20 μ m(A,C) and 33 μ m(B).

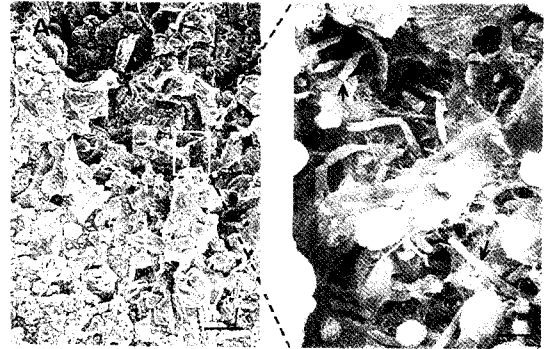


Fig. 3. Ultrastructure of epidermis in late stage of red ginseng. Various microorganisms(arrow) observed in the deconstructed cell wall. Bar indicates 1.7 μ m.

은 미생물이 관찰 되었다(Fig. 3). 이와같이 적변삼의 경우 세포의 형태 유지 및 외부의 stress에 대해 1차적인 방어기능을 담당하는 세포벽이 손상됨에 따라 토양의 유 무기 이온이나 기타 다른 착화합물의 침적이 용이하고, 이온 및 양분흡수의 생리적 기능을 수행할 수 없을 뿐만 아니라 외부로부터의 공격에 대한 방어 능력이 상대적으로 약화되어 인삼근 표면에 적갈색의 병반이 생기고 2차적인 미생물의 침입이 일어나는 것으로 생각된다.

또한 적변삼에서 세포벽이 심하게 파괴되고 미생물의 존재가 확인됨에 따라 적변현상은 세포벽의 주요 구성성분인 cellulose나 pectine을 분해하는(또는 대사의 기질로 이용하는) 미생물이 관여하는 것으로 생각된다. 따라서 인삼근에서 나타나는 적변현상은

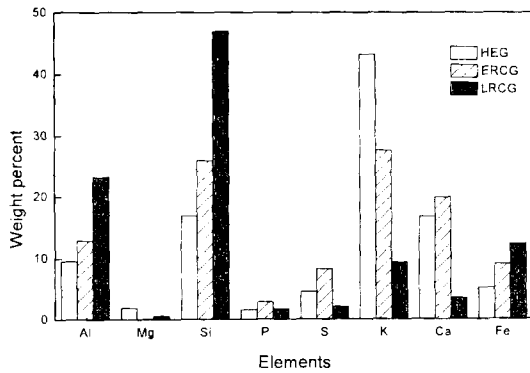


Fig. 4. Comparison of inorganic elements in epidermis of healthy and red-colored ginseng by EDX. HEG; healthy root of ginseng, ERCG; early stage of red-colored ginseng, LRCG; late stage of red-colored ginseng.

토양성분중 갈색의 착화합물을 형성할수 있는 성분과 인삼근 자체의 성분 그리고 세포벽을 분해하는 미생물과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

2. 무기이온 분포

(1) EDX에 의한 분석

건전삼과 적변삼의 표피로부터 무기원소 분석 결과, 적변삼 표피에서 Al, Si 그리고 Fe의 함량이 건전삼 표피에 비해 2~3배 이상 높게 나타났으며, 건전삼

에서는 K의 함량이 현저히 높게 나타났다(Fig. 4).

토양성분 중 Al, Si 그리고 Fe의 함량이 적변삼 표피에서 적변현상이 초기에서 말기로 진행될수록 높게 나타나는 것은 이들 이온과 적변현상과의 상관관계가 있음을 제시 한다. 특히 Fe의 경우 생체내 물질대사에 관여하는 효소계의 중요한 보조인자^{16,17)}이며, 전자전달계에서의 역할^{18,19)} 등을 고려해 볼 때 인삼근 자체의 물질대사에 미치는 영향 뿐만 아니라 토양미생물의 대사활동에도 조절인자로 관여하여 적변현상에 직접적인 영향을 미치는 것으로 생각된다.

(2) ICP에 의한 분석

ICP를 이용하여 인삼근의 각 부위별 미량원소의 함량을 조사한 결과, Fe함량은 적변삼에서 건전삼에 비해 표피에서 2배, 세근에서는 3배 정도 높게 나타난 반면, Mn은 측근과 내피에서 건전삼이 다소 높게 나타났으며, 다른 원소의 경우 건전삼과 적변삼의 각 부위에 따라 큰 유의차가 나타나지 않았다(Fig. 5). 또한 표토, 적변삼의 근권토양 그리고 건전삼의 근권 토양에서의 미량원소 함량은 표토에서 전반적으로 높은 경향이었으며, 특히 Cu, Fe, Mn 그리고 Ca가 2배 정도 높았다. 그러나 건전삼과 적변삼의 근권 토양간에는 큰 유의차가 없었다(Fig. 6).

이러한 결과는 EDX에 의한 분석결과와 유사하며,

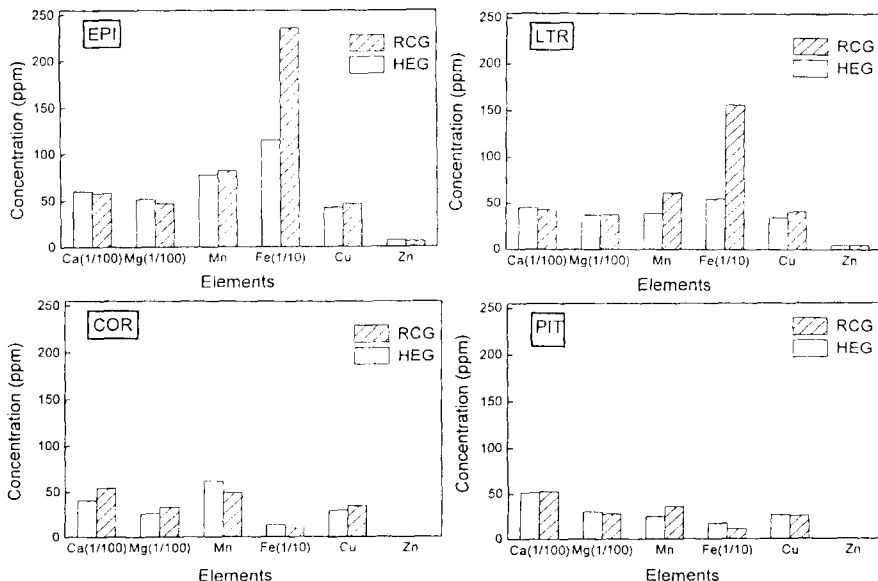


Fig. 5. Comparison of inorganic elements in healthy ginseng (HEG) and red-colored ginseng(RCG) by ICP. Samples were burned for 2 hours at 500°C. EPI; epidermis, LTR; lateral roots, COR; cortex, PIT; pith. 1/10and 1/100 indicates division ratio of measuring data.

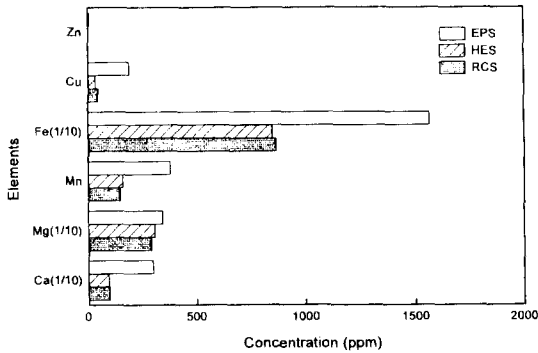


Fig. 6. Comparison of inorganic elements in surface soil(SUS), surrounding soil of healthy(HES) and red-colored(RCS) ginseng by ICP. 1/10 indicates division ratio of measuring data.

토양의 무기이온 분포는 토양에 따라 큰 유의차가 없었으며, 인삼근 조직내에 분포하는 무기이온만이 적변삼과 건전삼에서 차이가 있음이 확인됨에 따라 적변현상은 토양중의 무기이온이 인삼근 표피에 흡착 또는 침적되는 현상과 상관관계가 있으며, 특히 철의 작용 또는 철의존성 물질대사와 밀접한 관계가 있음을 시사해주고 있다.

3. 미생물상

(1) 부위별 총미생물 밀도

표토, 건전삼 및 적변삼의 근권토양 그리고 적변삼에서의 총미생물 밀도는 $2.4 \times 10^4 \sim 4.5 \times 10^4$ 의 범위를 나타냈으나, 적변삼에서는 1.1×10^9 로 현저히 높게 나타났다(Fig. 7). 적변삼에서 발견된 높은 미생물의 밀도가 적변의 직접적인 원인으로 작용했는지 또는 적변현상이 어느 정도 진행된 다음 2차적인 감염에 의한 현상인지에 대한 검증이 필요 하지만 적변삼은 미생물의 집적과 깊은 관계가 있음을 잘 제시하고 있다.

(2) 각 부위에서 분리된 미생물의 특성

표토, 건전삼 및 적변삼의 근권토양 그리고 적변삼으로 부터 분리한 균의 외형적 특성에 따라 21종으로 분리하고 다시 Fe(2mM)에 내성을 갖는 6종의 균을 선별하여 최종적으로 동정한 결과는 Table 1과 같다. *Bacillus* spp.는 건전삼의 근권토양과 적변 초기에 있는 인삼의 근권토양에서, *Lactobacillus* spp.는 표토와 적변 말기 인삼의 근권 토양에서 나타났다. *Micrococcus* spp. 그리고 *Neisseria* spp.는 적변삼에서만 나타났다. 또한 *Micrococcus* spp.는 온도에 대한 저항

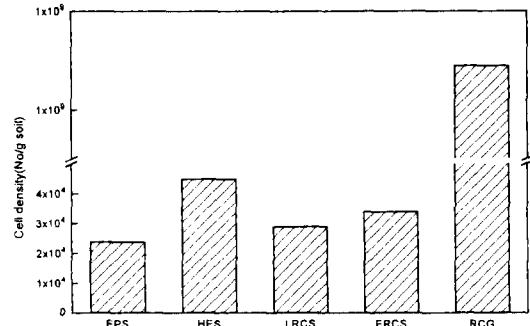


Fig. 7. Total density of microorganisms in surface, surrounding soil and red-colored. SUS; surface soil, HESA; surrounding soil of healthy ginseng. LRCS; surrounding soil of late stage red-colored ginseng, ERCS; surrounding soil of early stage red-colored ginseng, RCG; red-colored ginseng.

성이 다른 균주에 비해 높았으며, 성장속도도 매우 빨랐다. 이와같이 토양부위에 따른 미생물 분포가 다양하게 나타나는 것으로 볼 때, 적변현상은 미생물 단독의 영향이라기 보다는 미생물과 무기이온, 토양산도 등과 같은 환경요인과의 상호작용에 의한 생리적 장애로 사료된다. 토양 미생물중 Fe 대사와 관련된 것으로는 *Thiobacillus ferrooxidans*가 잘 알려져 있으며, 이들은 전자공여체로 Fe²⁺를 이용하며 Fe²⁺를 Fe³⁺로의 산화와^{22, 23)} 관련이 있다. 이때 얻어지는 에너지는 적기 때문에 많은 양의 철의 산화가 불가피하여 다량의 Fe³⁺가 침적된다. 이와같이 철의 대사와 관련된 미생물들은 모두 대사과정에서 Fe의 산화 환원에 관여하며, 이때 토양의 pH, 무기이온 분포, O₂, S 등 다양한 요인의 영향을 받게된다.

이상의 결과로 볼 때, 적변현상은 인삼 뿌리의 plasma membrane을 경계로하여 근권 미생물과 토양의 지·화학적 특성 변화에서 기인된 생리적 상호작용에 의한 장애현상으로 이해된다. 인삼근의 생장은 뿌리의 이온흡수 조절 기능과 무기영양원의 조성 및 분포, 토양의 산도 그리고 토양미생물상등 다양한 외부환경 요인이 관여한다. 생육과정은 이들 요인들의 유기적인 상호작용의 균형이다. 식물체는 이온 균형을 유지하기 위한 다양한 생리적 기작을 가지고 있다.²⁴⁻²⁶⁾ 인삼의 경우 이온 균형이 깨지면 뿌리의 정상적인 대사기능의 변화가 유발되고, 불균형을 1차 신호(primary signal)로 하여 뿌리의 H⁺ efflux pump가 작동하게 되어 근권토양의 산성화를

Table 1. The characteristics of microorganisms isolated from soil

strains	SUS4*	HES3	ERCS2	LRCS2	RCG1	RCG2
color of colony	white	white	white	white	white	white
shape of colony	circular	circular	circular	circular	circular	circular
Gram's stain	+	+	+	+	+	-
shape of bacteria	rod	rod	rod	rod	coccus	coccus
spore formation	-	+	+	-	-	-
catalase activity	-	-	-	-	+	-
mannitol utilization	-	-	-	-	-	-
pigmentation	-	-	-	-	-	-
glucose utilization	-	-	-	-	-	+
Genus name	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Neisseria</i> sp.

SUS; surface soil, HES; surrounding soil of healthy ginseng, ERCS; surrounding soil of early stage red-colored ginseng, LRCS; surrounding soil of late stage red-colored ginseng, RCG; red-colored ginseng, *: selection NO., +; positive, -; negative.

초래하게 된다. 산성 조건하에서는 유기철의 용해도와 chelation의 증가로 철의 mobilization이 일어난다. 또한 철산화 및 철의존성 미생물의 집적 및 대사활성의 변화로 인해 근권에 산화철이 축적된다. Mobilization된 철은 뿌리의 reductase 활성화에 의해 일부가 흡수되어 환원되기도 하지만, 인삼뿌리의 표피구성 성분인 lignin등과 강력한 리간드를 형성할 수 있다. 따라서 적변 현상은 적변삼 표피에 다량의 Fe가 침적되어 있는 점과, 적변삼에서 높은 미생물의 밀도 등을 볼 때, 인삼뿌리와 미생물의 이온흡수기작에서 경쟁적 또는 길항적 상호작용의 불균형이 일어나고 있으며 이 과정에서 Fe³⁺가 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있다.

요 약

인삼근에 나타나는 적변현상의 원인을 구명하기 위해 적변삼 표피와 근권토양의 무기이온분포 그리고 미생물상을 조사한 결과는 다음과 같다. 적변삼 표피는 세포벽 사이에서 적갈색의 침적물이 관찰되었으며, 세포벽이 파괴되어 세포형태가 기형화되어 있음이 확인되었다. 특히 적변삼의 파괴된 세포벽 안쪽에서는 다수의 미생물이 관찰되었다. 적변삼과 건강삼 표피의 무기이온 분포는 Al, Si 그리고 Fe 함량

이 적변삼 표피에서 2~3배 높은 반면 K의 함량은 건강삼에서 3배 이상 높게 나타났다. 또한 Fe 함량은 건강삼 보다 적변삼 표피에서 2배, 세근에서 3배 높았다. 토양의 총미생물의 밀도는 적변삼에서 현저하게 높게 나타났으며, 523 고체배지에서 분리된 21종의 미생물중 6종이 2 mM Fe에 저항성을 나타냈다. 따라서 인삼근의 적변현상은 토양의 무기이온 분포, pH, 함수량등의 변화에 따른 뿌리와 근권 미생물 사이에서 영양분의 동원 및 흡수기작과 보호작용의 상호 경쟁적 또는 길항적 작용과 Fe의 산화환원이 밀접한 관련이 있음이 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 한국인삼연초연구원(한국담배인삼공사) 용역 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. 김명수, 이종화, 이태수, 백남아 : 인삼연구보고서, 한국인삼연초연구원, p.13 (1984).
2. 김명수, 이종화, 이태수, 백남아, 홍순근 : 인삼연구보고서, 한국인삼연초연구원, p.787 (1985).
3. 김명수, 홍순근, 이태수, 한중구 : 인삼연구보고서,

- 한국인삼연초연구원, p.811 (1986).
4. 양덕조 : 인삼근 적변현상의 원인구명과 방제대책
중간보고서, 충북대학교, 청주, p.1 (1996).
 5. 양덕조 : 인삼근 적변현상의 원인구명과 방제대책
최종보고서, 충북대학교, 청주, p.1 (1996).
 6. Salisbury, F. B. and Ross, C. W. : *Plant Physiology*,
4th ed., Wadsworth, Inc., California, p.116 (1992).
 7. Taiz, L. and Zeiger, E. : *Plant Physiology*, The
Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.,
California, p.107 (1991).
 8. McKenzie, D. B., Hossner, L. R. and Newton, R.
J. : *J. Plant Nutr.* **9**, 1289 (1986).
 9. Imhoff, J. F. : *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 57
(1986).
 10. Leong, J. : *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 187 (1986).
 11. Neilands, J. B. : *Structure Bonding* **58**, 1 (1984).
 12. Braun, V. : *Trends Biochem. Sci.* **10**, 75 (1985).
 13. Romheld, V. and Marschner, H. : *Plant Physiol.*
80, 175 (1986).
 14. Marschner, H., Romheld, V. and Kissel, M. :
Physiol. Plant. **71**, 157 (1987).
 15. Bain, J. M. and Gove, D. W. : *J. Microscop.* **93**, 159
(1971).
 16. AOAC : *Official Methods of Analysis*, 14th ed., As-
sociation of Official Analytical Chemists, 3.014
(1984).
 17. Kado, C. I. and Heskett, M. G. : *Phytopathology*
60, 969 (1970).
 18. James, G. C. and Natalie, S. : *Microbiology a la-
boratory manual*, 3rd ed., The Benjamin/Cum-
mings Publishing Company, Inc., New York, p.1
(1992).
 19. Salisbury, F. B. and Ross, C. W. : *Plant Phy-
siology*, 4th ed., Wadsworth, Inc., California, p.
132 (1992).
 20. Salisbury, F. B. and Ross, C. W. : *Plant Phy-
siology*, 4th ed., Wadsworth, Inc., California, p.
215 (1992).
 21. Chaney, R. L. and Bell, P. F. : *J. Plant Nutri.* **10**,
963 (1987).
 22. Aristovskaya, T. V. and Zavarzin, G. A. :
Biochemistry of iron in soil. In, McLaren, A. D.
and Skujins, J., eds., *Soil biochemistry*, Marcel
Dekker, New York, Vol.2, p.385 (1971).
 23. Trafford, B. D., Bloomfield, C., Kelso, W. I. and
Pruden, G. : *J. Soil Sci.* **24**, 453 (1973).
 24. Kannan, S. : *J. Plant Nutri.* **2**, 324 (1980).
 25. Marschner, H., Romheld, V. and Kissel, M. : *J.*
Plant Nutri. **9**, 695 (1986).
 26. Treeby, M., Marschner, H. and Romheld, V. :
Plant and Soil **114**, 217 (1989).