Korean Journal of Microbiology (2013) Vol. 49, No. 2, pp. 131-136
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2013.3024
Copyright ⓒ 2013, The Microbiological Society of Korea

| 보 문 |

뿌리혹 형성능과 질소 고정능이 우수한 헤어리베치 유래 *Rhizobium*의 분리 및 선발

장종옥[1,3] · 권미경[2] · 박동진[1] · 성창근[3] · 김창진[1*]

[1]한국생명공학연구원 미생물자원센터
[2]충청남도농업기술원 농업환경연구과
[3]충남대학교 식품공학과

Screening of *Rhizobium*, Hairy Vetch Root Nodule Bacteria, with Promotion of Nodulation and Nitrogen Fixation

Jong-Ok Jang[1,3], Mi-Kyung Kwon[2], Dong-Jin Park[1], Chang Keun Sung[3], and Chang-Jin Kim[1*]

[1]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Republic of Korea
[2]Agricultural Environment Research Division, Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Republic of Korea
[3]Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

(Received March 26, 2013 / Accepted April 19, 2013)

This study was conducted to select rhizobia from hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) with nodulation and excellent nitrogen-fixing ability. Hairy vetch root was collected from 7 of cultivation region of all over the country, rhizobia were isolated from the root nodules. Isolates were re-inoculated into a hairy vetch separately and studied nodulation and nitrogen-fixing ability. As a result, total of 52 *Rhizobium* isolates were isolated from the hairy vetch root nodules, among these, 16 isolates were *Rhizobium* which show good growth at more than 0.5% NaCl concentration. These 16 isolates were re-inoculated separately, 8 weeks after, good root nodule formation was observed from *Rhizobium* sp. RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, and RH93 strain treated samples. Six isolates were positive for nitrogen fixing ability, the highest acetylene reduction activity was shown by *Rhizobium* sp. RH84. Results suggest that the *Rhizobium* sp. RH84 could be used as the possibility of its application as a green manure crop of hairy vetches in nonuniform salt distribution reclaimed land.

***Keywords*:** *Rhizobium* sp., hairy vetch, nitrogen fixation, root nodule

녹비작물로 알려진 콩과 식물인 베치(vetch)는 전 세계적으로 150여 품종이 재배 중이고(Bull and Mayfield, 1992) 코먼베치(*Vicia sativa* L.), 헤어리베치(*Vicia villosa* Roth), 퍼플베치(*Vicia benghalensis* L.) 그리고 울리포드베치(*Vicia villosa* spp., dasycarpa Ten. Eav.)가 대표적인 품종으로 알려져 있다. 그러나 나라마다 재배되고 있는 품종이 다르며(Shin and Ko, 2003), 일본과 터키 등지에서는 종자수량이 많은 개체를 선발 육성하여 이용하고 있다(Walton, 1991; Mayfield, 1999). 최근 한국에서도 농촌진흥청 국립식량과학원에서 자생종 헤어리베치로부터 육성된 품종인 청풍보라를 이용하여 수확시기에 따른 종자 수량 등에 관한 연구가 보고되었다(Ku *et al*., 2012). 베치 중에서도 헤어리베치는 월동이 가능하여 겨울에서 봄 사이 휴경지에서 녹비효과를 기대할 수 있다. 또한, sand vetch (Goar, 1934)라고 불릴 만큼 모래에서 진흙토양까지 그 생육 범위가 넓고, 산성과 알칼리 토양에서도 잘 적응한다고 알려져 있다(Walton, 1991). 헤어리베치의 녹비작물로서 큰 장점은 뿌리에 공생하는 뿌리혹박테리아에 의해 공기 중의 질소를 고정하며(Mueller and Thorup-Kristensen, 2001; Provorov and Tikhonovich, 2003), 수확기 이후 헤어리베치가 분해된 후에도 토양에 부족한 질소 공급이 가능하기 때문에 화학성 질소비료를 대체할 수 있다는 점이라 하겠다(Stewart, 1987).

최근 국토 확장 사업의 목적으로 여러 간척지가 조성되었으며, 식량 자급도가 낮은 우리나라로서는 새만금 등의 대규모 간척지를 농업용지로 활용하려는 요구도가 높아지게 되었다. 한편 간척지는 염 농도의 분포가 불균일하기 때문에 재배작물의 염해를 최소화하기 위해서는 배수개선, 객토, 심경, 석회 시용 등의 토양개량이 필요하며 종합적인 제염 및 재 염화 방지기술이 필

*For correspondence. E-mail: changjin@kribb.re.kr; Tel.: +82-42-860-4332; Fax: +82-42-860-4625

요하다. 특히 간척지는 염 뿐만 아니라 토양의 화학성과 물리성 개량에 영향을 주는 토양 유기물의 함량이 1% 미만으로 매우 낮아서 농업용지로 사용하기 위해서는 유기물의 함량을 높여주는 것이 필수적이다.

본 연구에서는 새만금 간척지의 특성을 고려하여 간척지 토양의 개량을 위한 녹비작물로서 헤어리베치를 기본적으로 이용하고자 하였으며, 후작물과 간척지 토양에 충분한 유기물 공급을 위해 헤어리베치의 질소 고정능을 높이는 방법을 찾고자 하였다. 지금까지 국내에 보고된 관련 연구는 헤어리베치의 생산성 및 헤어리베치 생장 후의 토양 변화가 주된 연구분야라 할 수 있다(Seo and Lee, 1998; Kim *et al*., 2004; Jeon *et al*., 2011; Lim *et al*., 2012). 본 연구에서는 뿌리혹박테리아에 의한 헤어리베치의 생육 증진에 초점을 맞추었으며, 특히 간척지에서도 활용 가능한 기술을 개발하고자 하였다. 즉 헤어리베치에 대한 감염 및 근류 형성능이 우수할 뿐 아니라 간척지의 불균일한 염 농도에서도 생장이 가능하며, 질소 고정력이 높은 균주를 분리 선발하여 그 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 향후 본 결과는 기존의 화학적 토양 개량 방법보다 더욱 친환경적이고 지속 가능한 방법으로서 간척지 토양의 개량 효과를 가져 올 것으로 사료된다.

재료 및 방법

헤어리베치 근류 수집 및 *Rhizobium* 균주 분리

헤어리베치 유래의 뿌리혹박테리아 선발을 위하여, 헤어리베치가 재배되고 있는 지역으로서 장흥군, 강진군, 당진군, 예산군, 부안군, 예천군 그리고 평택시 일원에서 헤어리베치를 채집하였다. 채집한 헤어리베치의 뿌리는 95% 에탄올 1분, 2% 차아염소산 나트륨으로 2분간 표면 살균하고, 증류수로 충분히 세척 후 메스로 뿌리혹을 절개하여 그 단면을 YM agar (0.04% yeast extract, 1% mannitol, 0.05% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.01% NaCl, 1.8% agar) 배지에 직접 획선으로 그어 28℃ 항온기에서 3-4일간 배양하였다. 분리된 colony는 다시 순수 배양하여 20% glycerol stock 상태로 -80℃에 보관하며 실험하였다. 분리된 여러 종류의 colony 중 *Rhizobium* 속만을 선별하기 위해 배양된 균체에서 genomic DNA를 추출 후 27F (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CAG-3′)와 1492R (5′-GGT TAC TTG TTA CGA CTT-3′) 프라이머를 사용하여 PCR 방법으로 증폭하여 염기서열을 분석하였고, *Rhizobium* 속으로 확인된 균주만 본 실험에 사용하였다.

염 저항성 검정

분리된 *Rhizobium* 속 균주들의 염 저항성을 평가하기 위해서 YM 액체 및 고체배지 상에 0.5, 1, 3, 5%의 NaCl을 첨가한 후 균 생육 정도를 조사하였다. 액체 배양 시에는 *Rhizobium* 속 균주를 OD 0.1이 되게 접종하여 28℃에서 130 rpm으로 3-7일간 배양하여 그 생육 정도를 580 nm에서 흡광도로 비교하였다 (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech). 고체 배양 시에는 각 *Rhizobium* 속 균주를 OD 0.1이 되게 증류수에 현탁 후, 6 well plate (SPL, Korea)에 5 μl씩 동량으로 접종 후 spreading 하여 28℃에서 3-7일간 생장 유무 및 생육 정도를 확인하였다. 각 균주의 생장은 YM 배지에 기본적으로 0.01%의 NaCl을 첨가 후 비교하였다.

뿌리혹 형성능 검정

헤어리베치에 대한 뿌리혹 형성능을 확인하기 위하여 분리한 균주들을 헤어리베치 종자에 접종한 후 뿌리혹 형성 유무를 관찰하였다. 헤어리베치 종자는 농촌진흥청 국립식량과학원에서 개발 육성된 청풍보라 품종을 분양 받아 사용하였으며, 경실종자 제거 후 표면 살균하여 실험에 사용하였다. 표면 살균은 95% 에탄올(absolute for analysis, Merck)로 1분 30초, 2% sodium hypochlorite solution (JUNSEI)으로 3분간 처리 후 멸균된 증류수로 여러 번 세척하였다.

질석을 2/3 가량 채운 유리 시험관(지름 3 cm, 길이 15 cm)과 상토와 질석을 동량으로 섞어 채운 플라스틱 비닐 pot (가로 8 cm, 세로 8 cm)의 두 가지 시험구로 나누어 실험하였고, 상토와 질석은 121℃에서 30분간 멸균한 후 사용하였다. 종자에 처리할 균주는 고체 배지 상에서 3-4일간 배양 후 멸균 증류수로 회수하여 2×10^9 CFU/ml 농도의 균체 현탁액으로 만들었다. 표면 살균한 종자에 균체 현탁액과 동량의 2% CMC (carboxymethyl cellulose)를 섞어 코팅 후 파종하였다. 추가적으로 종자 코팅 농도와 같은 농도의 균체 현탁액을 pot 당 5 ml씩 관주 접종하였다. 각 처리구는 3반복하였고 20-22℃로 유지되는 유리 온실 내에서 자연광의 상태로 8주간 생육시킨 후, 형성된 뿌리혹의 수, 크기, 색깔과 모양을 비교 관찰하였다.

Acetylene 환원력을 통한 질소 고정능 검정

분리한 *Rhizobium* 속 각 균주들에 의한 질소 고정능 측정을 위해서 헤어리베치를 8주간 생육시킨 후 이때 형성된 뿌리혹을 채취하여 acetylene (C_2H_2) 환원에 의한 ethylene (C_2H_4) 생성량을 gas chromatography로 확인하였다. 앞의 뿌리혹 형성능 검정 실험과 동일하게 질석을 사용한 시험구와 상토와 질석을 동량으로 섞은 시험구로 나누어 각각 실시하였다.

8주간 생육시킨 헤어리베치의 뿌리를 물로 가볍게 세척 후 수분을 제거하여 유리로 된 50 ml serum bottle에 넣고 고무마개로 막은 다음, 5 ml 공기를 뺀 후 동량의 acetylene gas를 주입하였다. 30℃에서 60분간 반응시킨 후 생성된 ethylene gas 양을 gas chromatograph-FID (Shimazu GC-2010, Japan)를 이용하여 정량분석하였다. 분석용 컬럼으로는 HP-AL/S (length 50 m, diameter 0.53 mm, film 15 m, Agilent technologies, USA)를 사용하였고, Carrier gas는 He을 사용하였다. Injector, detector, column 온도는 각각 200℃, 250℃, 110℃로 2분 동안 분석하였다.

결과 및 고찰

헤어리베치 뿌리혹 유래의 *Rhizobium* 균주 분리

콩과 식물의 뿌리혹에서 공생하고 있는 것으로 잘 알려진

Table 1. Isolation of hairy vetch root nodule bacteria from various sites

Sample sites		Number of isolates	Number of *Rhizobium* sp.
Jeonnam	Jangheung	6	6
	Gangjin	5	3
Chungnam	Dangjin	2	1
	Yesan	39	20
Jeonbuk	Buan	20	10
Gyeongbuk	Yecheon	28	8
Gyeonggi	Pyeongtaek	7	4
Total		107	52

Rhizobium 속 균주는 1888년 처음 뿌리혹으로부터 분리된 후 지금까지도 공생관계에 의한 콩과 식물의 생장에 대해 많이 연구되고 있다(Alexander, 1991; Long, 1996; Gharzouli *et al*., 2013).

헤어리베치의 뿌리혹으로부터 *Rhizobium* 균주를 분리하기 위해 7개 지역의 재배지에서 채집 한 뿌리혹으로부터 총 107점의 세균 콜로니를 분리하였다(Table 1). 각 분리 균주들은 NCBI BLAST로 분석하여 분리 균의 동정 및 염기서열의 유사도를 분석하였다. 전남 장흥에서 분리된 6개의 colony 모두, 전남 강진에서 분리된 5개의 colony 중 3개인 60%가 *Rhizobium* 속이었다. 경북 예천에는 분리된 colony의 29%가, 나머지 지역에서는 50% 이상의 colony가 *Rhizobium* 속으로 확인되었다. 분리된 52개의 *Rhizobium*은 *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. cellulosilyticium* 등으로 확인되었다(자료 미제시).

염 저항성 비교

간척지처럼 과도하게 염류가 집적된 토양은 미생물의 생육이 어려운 것으로 알려져 있다(Elas *et al*., 1997). 이러한 환경에서 헤어리베치의 뿌리혹에 정착하여 공생하기 위해서는 *Rhizobium*의 염 저항성도 중요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 *Rhizobium* 속으로 확인 선발된 균주의 내염성을 시험 비교한 결과 52개의 균주 중에서 30%인 16개 균주가 NaCl 0.5% 이상의 액체와 고체 배지 상에서 생육 가능하였다. *Rhizobium* sp. RH1, 3, 81, 82, 84, 93 균주는 0.5% NaCl 농도까지 생육하였고, RH10, 35, 129 균주는 1% NaCl 농도까지, RH6, 76, 99, 101, 106, 122, 128은 3% NaCl 농도까지 생육하였다(Table 2). 현재까지 완공되었거나 개발 중인 재염되지 않은 간척지의 염 농도가 0.33% 이상이며 그 분포가 불균일하다는 점을 고려하면 0.5% 이상에서 생육이 가능한 16개의 *Rhizobium* 속 균주는 간척지 환경에서도 생육이 가능할 것으로 사료된다.

Table 2. Growth limit concentration of *Rhizobium* spp. isolated from hairy vetch root nodule isolates

Isolate No.	Growth limit conc. of NaCl (%)	Sample sites
RH1	0.5	Yesan
RH3	0.5	Yesan
RH6	3	Yesan
RH10	1	Yesan
RH35	1	Yesan
RH76	3	Yecheon
RH81	0.5	Yecheon
RH82	0.5	Yecheon
RH84	0.5	Yecheon
RH93	0.5	Yecheon
RH99	3	Dangjin
RH101	3	Pyeongteak
RH106	3	Yesan
RH122	3	Jangheung
RH128	3	Gangjin
RH129	1	Gangjin

뿌리혹 형성능 우수균주 선발

0.5% 이상의 NaCl 농도에서 생육 가능한 16개의 *Rhizobium* 균주를 실제 헤어리베치 종자에 접종 시, 식물의 뿌리혹 발달에 영향을 주는지 pot test를 통해 확인하였다. 16개의 균주에 대하여 질석 시험구와 질석 + 상토 시험구로 나누어 각각 실험한 결과 두 시험구 모두 *Rhizobium* sp. RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, RH93의 6개 균주를 접종한 헤어리베치에서 뿌리혹이 형성되었다. 그러나 두 시험구간의 뿌리혹의 크기나 개수에는 차이가 있었다. 질석 시험구에서는 각 헤어리베치 당 뿌리혹의 수는 15개 내외였으며 RH84, RH82 그리고 RH93의 순으로 뿌리혹의 개수가 많이 형성되었고 그 크기는 1-2 mm 범위로 유사하였다. 뿌리혹의 색은 접종 균주에 따라 흰색, 분홍색, 엷은 붉은색을 띄었으며 모양은 모두 원형 내지는 타원형이었다(Table 3, Fig. 1). 질석 + 상토 시험구에서는 질석 시험구와 마찬가지로 뿌리혹의 색은 흰색, 분홍색, 붉은색을 띄었고, 모양은 원형 혹은

Table 3. Characteristics of nodules formed in vermiculite

Isolate No.	Number of formed nodule	Nodule color	Nodule shape	Nodule size (mm)
RH1	2	white	circle, oval	1-1.5
RH3	7	pink	circle, oval	0.5-2
RH81	7	pink	circle, oval	0.5-2.2
RH82	11	pink, pale red	circle, oval	1-2.2
RH84	13	pink, pale red	circle, oval	1.8-2
RH93	9	white	circle, oval	0.7-2
Control[a]	0	-	-	-

[a] Control means non-inoculated with *Rhizobium* sp.
-, none

Table 4. Characteristics of nodules formed in vermiculite + peat moss

Isolate No.	Number of formed nodule	Nodule color	Nodule shape	Nodule size (mm)
RH1	32	white, pink	oval	2.5-3
RH3	20	pink	oval	2
RH81	24	pink	oval, flower	4
RH82	19	white, pink, red	oval, flower	3-4
RH84	17	pink	oval	3
RH93	52	white	Flower	5-6
Control[a]	0	-	-	-

[a] Control means non-inoculated with *Rhizobium* sp.
-, none

타원형의 혹이 뭉쳐진 모양이었다. 그러나 접종 균주에 따라 17-52개의 많은 뿌리혹이 형성되었으며, 그 크기도 2-6 mm로 다양하였다(Table 4, Fig. 2). 또한, 뿌리혹의 개수도 질석 시험구와는 다르게 RH93, RH1 그리고 RH81의 순으로 형성되었다. 이렇게 토양에 따라 형성되는 뿌리혹의 개수와 크기가 차이 나는 이유는 상토의 유무에 따른 토양 내 유기물 함량에 따른 차이로 판단되며, 실제 간척지에 적용 시에는 유기물 함량이 비교적 적은 질석 시험구의 경우와 유사한 결과가 나올 것으로 추측된다. 또한, *Rhizobium*을 접종하지 않은 무접종구에서는 뿌리혹이 형성되지 않은 것으로 보아(자료 미제시) *Rhizobium*의 추가적 접종은 헤어리베치의 뿌리혹 발달에 영향을 미칠 것이라 사료되며, 이는 헤어리베치의 녹비 수율에도 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Acetylene 환원력을 통한 질소 고정능 확인

Acetylene 환원에 의한 ethylene 생성량으로 질소 고정능을 확인하기 위하여 질석+상토 시험구에서 샘플을 채취하여 GC로 측정한 결과 *Rhizobium* sp. RH84, RH3, RH81의 순으로 질소 고정능이 높았다(Table 5). 이는 동일한 방법으로 실험한 Table 4와는 다른 결과로 뿌리혹의 개수가 많고 크기가 큰 RH93은 다른 처리 균주에 비해 상대적으로 질소 고정능이 낮은 반면, 뿌리혹의 개수가 적고 크기가 작은 RH84가 질소 고정능이 가장 높은 것으로 확인되었다. 이 결과로 보아 질소 고정능이 뿌리혹의 개수나 크기와의 상관성보다 뿌리혹 내부의 색깔과 관련 있는 것이라 판단된다. RH84를 처리한 경우 두 가지의 시험구 모두에서 분홍색 내지 연한 붉은색을 띄었고, RH3과 RH81을 처리한 경우도 같은 패턴의 색을 보였다(Tables 3 and 4). 반면 뿌리혹이 흰색을 띄는 RH1, RH82, RH93은 상대적으로 낮은 질소 고정능을 보였다. 이는 뿌리혹 내부에 붉은색을 띄게 하는 leghemoglobin이 뿌리혹의 산소공급과 nitrogenase의 활성을 도와 질소 고정이 일어난다는 기존의 보고와도 일치한다(Bergersen and Turner, 1976; Dazzo and Hrabak, 1981; Ott *et al*., 2005). 결과적으로 뿌리혹의 색, 모양, 크기가 유사한 RH3, RH81, RH84 중 가장 높은 질소 고정력을 보이는 RH84를 최종적으로 선발하였다. RH84의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였으며, phylogenetic tree를 통하여 *Rhizobium* sp. 간의 유전적 관계를 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, *R. gallicum*과 *R. hainanense*와

Table 5. Nitrogen fixation activities of *Rhizobium* spp.

Isolate No.	Nitrogen fixation activities[a]
RH1	6,786
RH3	18,536
RH81	11,854
RH82	6,351
RH84	25,158
RH93	7,020
Control	0

[a] Ethylene height measurement were used as nitrogen fixation. At this point the acetylene height was 3.5 million.

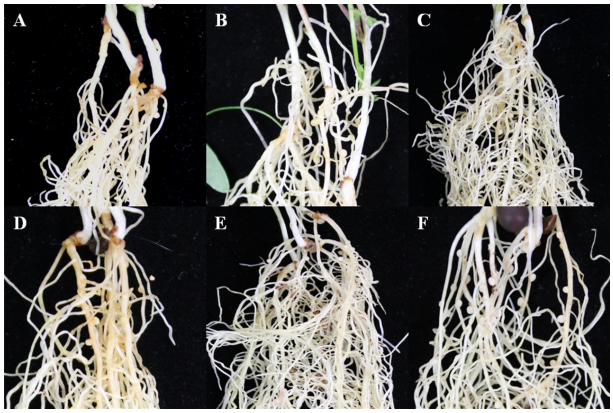

Fig. 1. Nodules of 6 isolates formed by artificial inoculation in vermiculite. Hairy vetches grown for 8 weeks after inoculation. (A) RH1, (B) RH3, (C) RH81, (D) RH82, (E) RH84, (F) RH93.

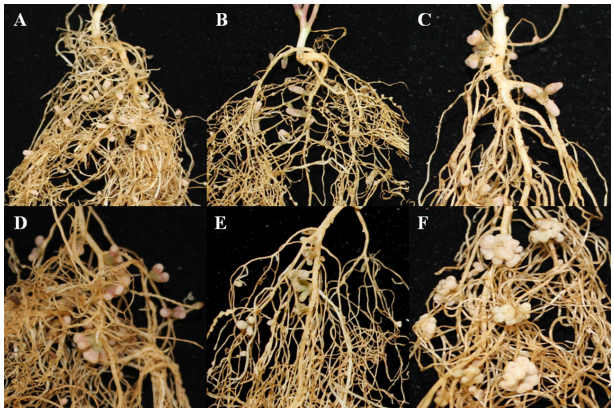

Fig. 2. Nodules of 6 isolates formed by artificial inoculation in vermiculite + media. Hairy vetches grown for 8 weeks after inoculation. (A) RH1, (B) RH3, (C) RH81, (D) RH82, (E) RH84, (F) RH93.

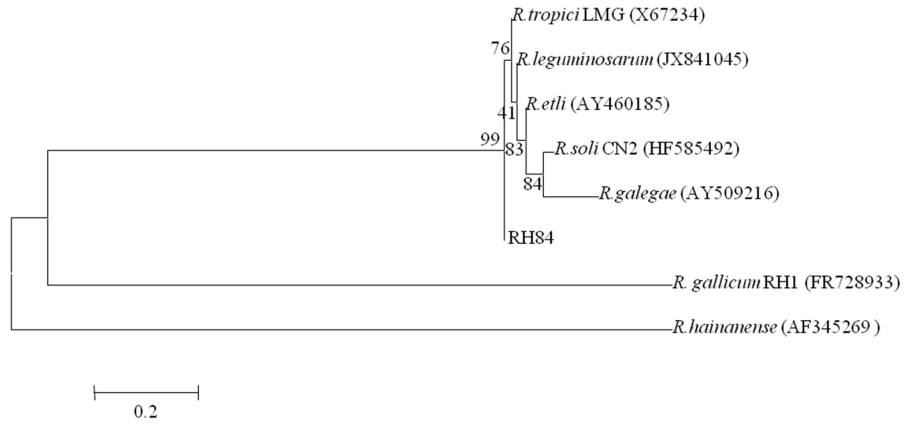

Fig. 3. Neighbor-joining tree based on almost-complete 16S rRNA gene sequences, showing phylogenetic relationships between strain RH84 and species from *Rhizobium* genus. Scale bar, 0.2 substitutions per nucleotide position.

는 유전적 차이가 매우 크게 나며, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*와 가장 유사한 결과를 보였다. 지금까지 헤어리베치와 공생 관계로 알려져 있는 *R. leguminosarum*과 RH84는 유전적으로 유사하지만, 실제로 *R. leguminosarum*으로 동정 된 RH129 균주는 헤어리베치 뿌리혹 형성 실험에서 뿌리혹을 형성하지 못하였다(자료 미제시). 이는, 청풍보라 종의 헤어리베치 뿌리혹 형성에는 유전적 유사성을 갖는 *R. leguminosarum* 보다 RH84가 더욱 우수한 균주임을 증명하는 결과이다. 따라서 RH84는 우수한 뿌리혹 형성능과 높은 질소 고정능으로 헤어리베치의 녹비 수율을 증가시키며 간척지 토양 유기물 증가에 큰 영향을 줄 것으로 사료된다. 본 연구에서 분리된 *Rhizobium* sp. RH84는 미생물자원센터(Korea Collection for Type Culture)에 균주를 기탁하였으며, 기탁번호 KCTC12024BP를 부여받았다.

최근 농촌진흥청에서 녹비작물로 추천하는 헤어리베치는 뿌리혹 형성능과 질소 고정능이 우수하여 토양의 유기물을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 지금까지의 헤어리베치에 대한 연구는 대부분 재배 후 수량(Shin *et al*., 2000; Ryoo, 2008), 사료가치(Kim *et al*., 2007), 토양환경 개선 효과(Yang *et al*., 2012)에 초점이 맞추어져 있었다. 그러나 이러한 결과만으로는 염의 분포가 불균일한 간척지에 헤어리베치를 적용하는 데는 한계가 있을 것으로 판단되었다. 이에 본 연구에서는 전국의 헤어리베치 재배지에서 뿌리혹에 공생하는 *Rhizobium*을 분리하였고, 그 중 0.5% 이상의 염 농도에서 생육이 가능한 *Rhizobium*을 헤어리베치에 각각 적용하였다. 그 결과 헤어리베치의 뿌리혹에 공생하는 *Rhizobium*의 종류에 따라 질소 고정능이 달라지는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 판단할 때 본 연구에서 분리한 *Rhizobium* sp. RH84는 헤어리베치에 적용 시 생산량 증대에 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 향후 *Rhizobium* sp. RH84에 대한 균주의 특성을 파악하고, 실제 간척지 포장 실험에서의 헤어리베치의 생산량 증대 가능성에 관한 연구를 계속하고자 한다.

적 요

본 연구에서는 헤어리베치로부터 뿌리혹 형성능과 질소 고정능이 우수한 *Rhizobium* 균주를 분리하고자 하였다. 전국의 일곱 군데 헤어리베치 재배 지역에서 수집 후 뿌리혹으로부터 균주를 분리하였고, 헤어리베치에 분리 균주를 재접종하여 뿌리혹 형성능과 질소 고정능을 확인하였다. 그 결과, 52개의 *Rhizobium* 속 균주를 분리하였고, 이 중 0.5% NaCl 농도 이상에서 자라는 *Rhizobium*은 16균주이었다. 뿌리혹 형성능은 16개 균주 중 *Rhizobium* sp. RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, RH93의 균주를 접종한 시험구에서 우수하였다. 또한, 질소 고정능을 확인한 결과 *Rhizobium* sp. RH84가 가장 높은 acetylene reduction activity를 보였다. 이러한 결과는 향후 염의 분포가 불균일한 간척지에 적용 시에도 헤어리베치의 생육을 촉진해 녹비 작물로의 활용 가능성을 높여주는 결과로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업에서 지원한 '호염성 질소 고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및 이를 통한 간척지 녹비화 기술 개발' 과제와 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

Alexander, M. 1991. Introduction to soil microbiology. Krieger Pub Co. Malabar, Florida, USA.

Bergersen, F.J. and Turner, G.L. 1976. The role of O_2-limitation in control of nitrogenase in continuous cultures of *Rhizobium* sp. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **73**, 524−531.

Bull, B. and Mayfield, A. 1992. Growing vetch bold images, Australia.

Dazzo, F.B. and Hrabak, E.M. 1981. Presence of trifoliin A, a rhizobium trifolii binding lectin, in clover root exudate. *J. Surramol. Struct. Cell. Biochem.* **16**, 133−138.

Elas, J.D.V., Trevors, T.J., and Wellington, E.M.H. 1997. Modern soil microbiology. Marcel Dekker INC., New York, N.Y., USA.

Gharzouli, R., Carpene, M.-A., Couderc, F., Benguedouar, A., and Poinsot, V. 2013. Relevance of Fucose-rich extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium sullae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* L. legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**,

1764-1776.

Goar, G.L. 1934. Vetches and related crops for forage. U. C. Coop. Ext. Berkeley.

Jeon, W.T., Hur, S.O., Seong, K.Y., Oh, I.S., Kim, M.T., and Kang, U.G. 2011. Effect of green manure hairy vetch on rice growth and saving of irrigation water. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **44**, 181−186.

Kim, J.G., Chung, E.S., Lim, Y.C., Seo, S., Kim, M.J., and Kim, J.D. 2004. Studies on the comparison of agronomic characteristics and productivity in induced vetch cultivar. *K. Grassl. Sci.* **24**, 177−182.

Kim, S.J., Kim, I.S., and Lee, J.S. 2007. Effect of autumn seeding date on the productivity and feed values of hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.) varieties. *Kor. J. Organic Agric.* **15**, 59−69.

Ku, J., Kim, M., Son, B., Lee, J., Kim, J., Hwang, J., Beak, S., Moon, J., and Kwon, Y. 2012. Change of seed yield, germination rate and hard seed rate with harvest time in hairy vetch (*Vicia villosa* Roth). *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* **32**, 157−164.

Lim, K.H., Choi, H.S., Na, Y.G., Song, J.H., Cho, Y.S., Choi, J.J., Choi, J.H., and Jung, S.K. 2012. Nutrient contribution and growth of "Niitaka" pear trees as affected by mix-seeding and single-seeding of rye and hairy vetch. *Korean J. Intl. Agri.* **24**, 70−75.

Long, S.R. 1996. Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885−1898.

Mayfield, A. 1999. Namoi woolly pod vetch dynamic spring pasture. Kondinin Group, Australia.

Mueller, T. and Thorup-Kristensen, K. 2001. N-fixation of selected green manure plants in an organic crop rotation. *Biol. Agric. Hort.* **18**, 345−363.

Ott, T., van Dongen, J.T., Gnther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation on legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* **15**, 531−535.

Provorov, N.A. and Tikhonovich, I.A. 2003. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genet. Resour. Crop Evol.* **50**, 89−99.

Ryoo, J.W. 2008. Growth characteristics and green manure productivities of hairy vetch and woolly pod vetch under different sowing seasons in the highland area. *Kor. J. Organic Agric.* **16**, 409−420.

Seo, J.H. and Lee, H.J. 1998. Study on no-tillage silage corn production with legume hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) cover. *J. Kor. Grassl. Sci.* **18**, 43−48.

Shin, C.N., Kim, D.A., Ko, K.H., and Kim, Y.W. 2000. Forage performance of introduced vetch cultivars and Korean native vetch. *J. Kor. Grassl. Sci.* **20**, 251−258.

Shin, C.N. and Ko, K.H. 2003. Comparison of forage performance of introduced vetch cultivars and Korea wild vetch. *J. Kor. Grassl. Sci.* **23**, 223−228.

Stewart, B.A. 1987. Advances in soil sciences. *In* Smith, M.S., Frye, W.W., and Varco, J.J. (eds.), Legume winter cover crops, Vol. 7, pp. 95−139. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.

Walton, G. 1991. Vetches. Farmnote (No. 56/91).

Yang, C.H., Lee, J.H., Beak, N.H., Jeong, J.H., Cho, K.M., Lee, S.B., and Lee, G.B. 2012. Incorporation effect of green manure crops on improvement of soil environment on Saemangeum reclaimed land during Sorghum x Sudangrass hybrid cultivation. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **45**, 744−748.