

Article

<https://doi.org/10.7745/KJSSF.2017.50.6.562>

pISSN : 0367-6315 eISSN : 2288-2162

Population, Symbiotic Effectiveness, and Protein Profile Patterns of Indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to Korean Soils

Ui-Gum Kang*, Min-Tae Kim, Bong-Choon Lee, Chang-Hoon Lee¹, and Chung-Mok Yang

National Institute of Crop Science, RDA, Wanju 55365, Korea

¹National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

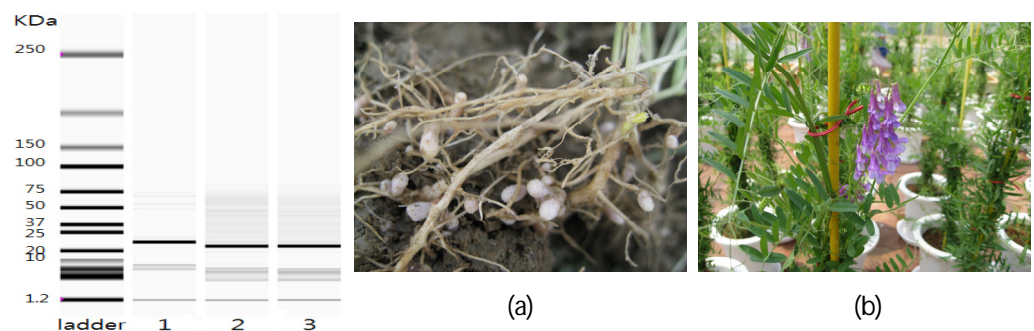
*Corresponding author: kangug@korea.kr

ABSTRACT

Received: October 24, 2017**Revised:** November 15, 2017**Accepted:** November 15, 2017

Some symbiotic characteristics of native Korean *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* were analysed to get some informations desirable for cultivation of hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) using its symbiont in Korea. The size of indigenous populations of *R. leguminosarum* biovar *viciae* was higher in seven upland soils showing $1.7 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^4$ cells $\text{g} \cdot \text{soil}^{-1}$, which appeared to be 10% and 37% higher for cultivated and uncultivated soils of hairy vetch, respectively, than seven paddy soils with $1.7 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ cells $\text{g} \cdot \text{soil}^{-1}$. In symbiotic potentials, however, the yields of hairy vetch treated with 10-fold-diluted (10^{-1}) inoculum and 1000-fold-diluted (10^{-3}) one was 11.2% and 8.8% more, respectively, in paddy than upland. Hairy vetch inoculated with either strain KHR 106 from Sacheon or strain KHR 120 from Yesan among native Korean *R. leguminosarum* biovar *viciae* isolates was of similar yield increment of 16% ($p < 0.05$) in upland soils with native *R. leguminosarum* biovar *viciae* of 5.8×10 cells $\text{g} \cdot \text{soil}^{-1}$. In case of coinoculation of the two strains, however, the yields was not significantly increased. In especial, isolate KHR 106, KHR 120, and KHR 122 from Suwon, which has also good symbiotic effectiveness, showed different protein profile patterns each other. As a result, hairy vetch is possibly able to use atmospheric nitrogen through symbiotic relationship with diverse native *R. leguminosarum* biovar *viciae* in Korean arable lands. For safe and good production of hairy, however, the use of superior strains with high symbiotic effectiveness and competitiveness will be desirable.

Keywords: Hairy vetch, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, Population, Symbiotic effectiveness, Protein profile



Protein profile patterns of three *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolates in the automatic gel electrophoresis using Experion Pro260 (Bio-Rad). Here strain for lane 1 is KHR 106; lane 2 for KHR 120; lane 3 for KHR 122, which were isolated from hairy vetch nodules (a) and examined for the symbiotic ability (b).



Introduction

1900년대 풋거름용으로 도입된 (RDA, 2002) 헤어리베치 [hairy vetch (*Vicia villosa* Roth)]는 유럽과 서아시아가 원산지인데 (Undersander et al., 1990), 추위에 강하고 (Campiglia et al., 2010) 산성토양에서도 잘 자라 (Dastikaitė et al., 2009) 전 세계의 온대와 아열대지역에서 우수한 질소공급원으로 이용되고 있다 (USDA, 2016). 헤어리베치가 근류균 *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*와의 공생관계를 가지면서 생산하는 질소량은 연간 58-257 kg N ha⁻¹ 범위인 것으로 알려져 있고 (Cherr et al., 2006; Parr et al., 2011; Waggener, 1989), 식물체의 C:N 구성비가 8:1-15:1 범위로 낮기 때문에 식물체 조직이 흙속에서 쉽게 분해되어 (USDA, 2016) 뒷그루작물에 필요한 질소를 성장초기부터 공급할 수 있는 장점을 지니고 있다 (Kang, 2007; Samson, 1990). 뿐만 아니라, 헤어리베치는 피복작물로 이용되어 토양의 침식을 줄이면서 (Lee et al., 2005; Maul et al., 2011) 잡초발생억제와 (Abdul-Baki and Teasdale, 2007; Choi et al., 2011; Mischler et al., 2010) 토양의 물리성 개선 및 수분증대 기능이 우수하여 (Clark et al., 1995; Jeon et al., 2011) 농업환경을 보전하면서 작물을 지속적으로 생산할 수 있는 지속농업이나 유기농업용 생물농자재로도 높이 평가된다 (Abdul-Baki and Teasdale, 2007; Maul et al., 2011; Rochester and Peoples, 2005; USDA, 2016). 이에 따라 헤어리베치의 생육에 중요한 공중질소 공급원인 질소고정근류균의 이용연구는 근류균의 생리, 유전성, 접종반응 등의 측면에서 다양하게 이루어지고 있는 추세이다 (Andrade et al., 2002; Chemining'wa and Vessey, 2006; Mothapo et al., 2013; Palmer and Young, 2000; Tumbure et al., 2013; Yuan et al., 2016). 그러나 우리나라에서의 헤어리베치 이용연구는 공생근류균인 *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Laguerre et al., 2003)를 적극적으로 활용하기보다 헤어리베치의 토양피복효과와 농경지투입효과 위주로 수행되면서 (Choi et al., 2011; Jeon et al., 2011; Lee et al., 2005; Seo et al., 2000) 이를 위한 신품종까지 육성하기에 이르렀다 (Ku et al., 2014). 그러므로 우리나라의 지속농업 발전을 위한 생물농자재의 이용측면에서 볼 때, 헤어리베치 공생근류균 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 토착화 정도와 함께 토착화 된 균주의 헤어리베치 공생효과 등 헤어리베치-*R. leguminosarum* bv. *viciae* 공생관련 연구가 필요한 상황이다 (Ballard et al., 2004; Kang, 2007; Kang and Somasegaran et al., 1991; Kitou et al., 2010; Mothapo et al., 2013). 이에 따라 본 연구에서는 헤어리베치 공생근류균인 *R. leguminosarum* bv. *viciae*를 대상으로 우리나라 주요 논, 밭 토양에서의 서식밀도와 질소고정잠재능을 분석하고, 헤어리베치 증산에 이로울 것으로 예상되는 우수 균주를 선발하여 포장접종효과를 검토하였다.

Materials and Methods

시험용 농경지토양의 채취 헤어리베치 공생 근류균인 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도와 질소고정잠재능 분석 그리고 공생효과 우수균주 분리를 위해서 전국의 주요 논토양 7곳과 밭 토양 7곳을 대상으로 표토를 2012년 3월에 채취하였다. 채취한 농가포장의 위치와 헤어리베치 재배여부에 따른 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도는 Table 1과 같았다. *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 밀도조사는 Kang and Somasegaran et al. (1991)의 방법에 따라 무균상태에서 발아시킨 ‘청풍보라’ (Ku et al., 2014) 유묘를 질소가 결재된 양액을 넣은 ‘growth pouch’에 1본 (plant)씩 치상한 다음, 멸균수로 10배부터 10⁶배까지 희석한 토양시료 현탁액 1 mL 씩을 4반복으로 접종하여 4주간 재배한 뒤 뿌리혹이 형성된 ‘growth pouch’의 개수로서 최확치법 (Most probable number method)으로 조사하였다 (Vincent, 1970). 그 결과 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도는 논토양 ($1.7 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ cells g · soil⁻¹)보다

밭토양에서 ($1.7 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^4$ cells g · soil⁻¹), 헤어리베치가 재배되지 않는 토양 (논, $1.7 \times 10^2 \sim 6.0 \times 10^3$ cells g · soil⁻¹; 밭, $1.7 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^3$ cells g · soil⁻¹)보다 재배되는 토양에서 (논, 1.7×10^4 cells g · soil⁻¹; 밭, $1.7 \times 10^4 \sim 5.8 \times 10^4$ cells g · soil⁻¹) 각각 더 높은 것으로 나타났다.

농경지토양의 질소고정잠재능 분석 Table 1의 농경지에 분포한 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 질소고정잠재능 분석은 Kang (1998)과 Kang and Somasegaran et al. (1991)의 방법에 준했다. 먼저 질석을 넣은 1 L 들이 광구병에 무균상태로 발아시킨 헤어리베치 ‘청풍보라’의 유묘 2분을 치상한 다음, 작부처리 토양을 멸균증류수로 10배와 1000배 희석한 토양현탁액을 각각 1 mL씩 4반복으로 접종하여서 질소가 결재된 양액으로 개화기까지 6주간 재배한 후 헤어리베치의 지상부와 뿌리혹을 수확하였다. 이렇게 수확한 식물체와 뿌리혹 성적을 대상으로 해서 분석한 주요 농경지 서식 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 질소고정효과를 토양의 질소고정잠재능으로 평가하였다. 그리고 농경지토양 접종구의 대조구로 질소 6 kg 10a⁻¹ 시용구를 두어서 토양현탁액 대신 멸균증류수를 넣어 헤어리베치를 재배하였다.

Table 1. Location and size of associated indigenous populations of *R. leguminosarum* bv. *viciae* of fourteen Korean soils.

Land use	Soil sample no. (location)	Hairy vetch cultivation	No. of <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> . (cells g · soil ⁻¹)
Paddy	1 (Godeok-myeon, Yesan)	Uncultivated	1.0×10^3
	2 (Dongsong-up, Cheorwon)	Uncultivated	1.7×10^2
	3 (Seodun-dong, Suwon)	Cultivated	1.7×10^4
	4 (Seodun-dong, Suwon)	Uncultivated	1.0×10^3
	5 (Sandong-myeon, Namwon)	Uncultivated	6.0×10^3
	6 (Gosung-up, Gosung)	Cultivated	1.7×10^4
	7 (Gosung-up, Gosung)	Uncultivated	6.0×10^3
Upland	8 (Seodun-dong, Suwon)	Cultivated	5.8×10^4
	9 (Seodun-dong, Suwon)	Uncultivated	1.0×10^4
	10 (Sandong-myeon, Namwon)	Uncultivated	1.7×10^3
	11 (Gosung-up, Gosung)	Uncultivated	1.7×10^3
	12 (Sangdong-myeon, Miryang)	Cultivated	1.7×10^4
	13 (Sangdong-myeon, Miryang)	Uncultivated	5.8×10^3
	14 (Imha-myeonm, Andong)	Uncultivated	1.7×10^2

헤어리베치 공생효과 우수 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 선발 우수 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 선발 대상 균주는 농경지토양의 질소고정잠재능 분석에서 헤어리베치 지상부의 건물무게가 높고 뿌리혹의 무게가 비교적 낮은 토양의 헤어리베치 뿌리혹과 (Table 3), 추가적으로 헤어리베치가 서식하고 있는 사천 곤명면 마곡리 밭토양과 대구 북구 금호강변 토양의 헤어리베치 뿌리혹을 각각 채취하여 Kang and Somasegaran et al. (1991)과 Vincent (1970)의 방법에 따라 YEM 배지 (Yeast extract 1g, Mannitol 10g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, NaCl 0.2g, FeCl₃ · 6H₂O 2 mg, Agar 15 g, 증류수 1 L, pH 6.8-7.0) 위에서 토양단위별로 7균주씩 분리하였다. 분리한 균주는 Korean Hairy Rhizobium의 머리글자를 딴 KHR을 균주의 일련번호 앞에 붙여 명명하였다. 이들 균주의 헤어리베치 공생효

과 시험은 15 cm (내경) × 20 cm (높이)의 백색 Pot에 *R. leguminosarum* bv. *viciae*가 없는 질석을 600 g 담은 뒤 포장용수량의 물을 800 mL 넣었을 때의 Pot 내용물 무게인 1.4 kg을 기준으로 비료를 10 a 당 질소(N) 3, 인산(P_2O_5) 3, 칼리(K_2O) 3.4 kg 상당량 사용하여 4반복으로 추진하였다. 헤어리베치 재배는 ‘청풍보라’ 종자를 소독하여 무균상태에서 발아시킨 유묘를 Pot 당 4본씩을 이식하였다가 1주 후에 건전한 것 2본씩만 남겨 재배하였다. 분리한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주의 접종은 한천을 뺀 YEM 배지에서 균주를 10^8 cells 수준으로 진탕배양한 후 헤어리베치 유묘 개체 당 1 mL씩 접종 실시하였다. 재배한 헤어리베치는 개화기에 수확하여 지상부 생육량과 함께 지하부 뿌리혹의 수와 무게 성적을 종합적으로 검토해서 공생효과가 우수한 *R. leguminosarum* bv. *viciae*를 선발하였다.

***R. leguminosarum* bv. *viciae*의 헤어리베치 접종효과 포장시험** Pot 시험에서 헤어리베치와의 공생효과가 우수한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주 2종을 대상으로 한 포장접종시험은 경북 상주의 해발 285 m에 위치한 국립식량과학원 상주출장소 밭 포장에서 실시하였으며 시험된 밭토양의 이화학적 특성은 Table 2와 같았다. 시험토양은 양토였고 pH가 약알칼리성을 띠었으며 유기물은 적정수준이었으나 유효인산과 치환성 칼리, 칼슘, 마그네슘이 적정수준보다 높은 경향이였다. 그리고 시험지에는 *R. leguminosarum* bv. *viciae*가 토양 1 g 당 5.8×10^6 cells 서식하고 있었다. *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주의 접종은 250 mL 삼각플라스크 속에 과산화수소수로 멸균 처리한 헤어리베치 ‘청풍보라’ 종자 60 g을 넣고, 한천을 뺀 YEM조성물의 액체배지에서 mL 당 333×10^7 cells 농도로 배양한 균주 배양액 7 mL를 그 종자 위에 마이크로피펫으로 조금씩 떨어뜨리면서 역시 멸균 처리한 질석가루 (200 mesh 크기) 5 g도 소량씩 넣어 손으로 플라스크를 세게 돌리는 방법으로 종자에 코팅 접종하였다. 접종된 헤어리베치 종자는 플라스크 속에 남아있는 질석과 함께 $2 \times 5 \text{ m}^2$ 크기의 시험구에 흩어 뿌리고 흙으로 코팅된 종자가 보이지 않게 덮어 주었다. 시험구는 우수균주 2종을 각각 단독으로 접종 처리한 2개 구와 혼합접종 처리한 1개 구, 그리고 대조구로서 균주배양액 대신 멸균 증류수로 질석을 종자에 코팅하여 처리한 1개 구로 구성된 총 4개 처리구를 두어서 단구제로 시험하였다. 시험된 헤어리베치는 일체의 비료를 주지 않고 개화기까지 75일간 재배하여 수확하였다.

Table 2. Physicochemical properties of upland soils used for hairy vetch cultivation by Korean *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolates.

Soil texture	pH	T-N	O.M.	C:N	Av. P_2O_5	Av. SiO_2	Ex. cations		
							K	Ca	Mg
	1:5	%	g kg^{-1}	ratio	mg kg^{-1}	mg kg^{-1}	----- $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ -----		
Loam	7.3	0.17	22	7.4	810	76	0.9	12.6	2.5

***R. leguminosarum* bv. *viciae*의 단백질 전기영동분석** 헤어리베치에 대해서 공생효과가 우수한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주의 동질성을 구분하기 위해 (Kang et al., 1996) 시도한 단백질 전기영동분석은 Experion Pro260 (Bio-Rad, Hercules, CA) 분석키트를 사용하였다. 먼저 균주를 YMB 배지에서 10^8 cells mL^{-1} 이상으로 배양한 배양액 5 mL를 12,000 rpm 조건으로 10분간 원심분리한 후 침전물에 10 mM tris-HCl 5 mL을 가하여 같은 조건으로 다시 원심분리한 다음, 침전물에 LDS sample buffer와 10 mM tris-HCl의 1:1 혼합액 0.2 mL에 현탁시켜 3분간 끓이고 이것을 얼음상자에 보관하면서 30초간 Vortex 처리하여 전기영동하였다. 그리고 단백질의 분자량 규명을 위해서 분자량 10~250 kDa 범위의 recombinant proteins을 포함한 Experion Pro260 ladder를 사용하였다.

통계분석 SAS 프로그램 9.1.3 버전 (2006)으로 시험 성적을 상관분석과 분산분석 하였다.

Results

농경지토양의 질소고정잠재능 우리나라 남부의 경남 고성에서부터 중부의 강원도 철원에 이르기까지 주요지역 논토양과 밭토양의 (Table 1) 질소고정잠재능은 Table 3과 같았다. 헤어리베치의 초장과 근류수, 근류무게는 시험 토양을 10배 희석하여 접종했을 때와 1000배 희석해서 접종했을 때 모두 토양 간에 유의적인 차이가 없었다. 헤어리베치의 건물량은 토양을 10배 희석접종한 경우 가장 높은 토양이 남원의 논토양이었고 ($p < 0.05$) 두 번째는 고성의 밭토양이었으며 가장 낮은 토양은 남원의 밭토양이었는데, 남원 논토양과 고성 밭토양의 성적은 질소비료를 요소로 ha 당 60 kg 시용했을 때의 성적보다 더 높았다. 토양을 1000배 희석접종했을 때의 헤어리베치 건물량은 서로 유의적인 차이가 없는 고성의 논토양과 밀양의 밭토양을 제외한 모든 토양이 이들 두 토양보다 높았다. 1000배 희석접종 토양 중에서 헤어리베치 건물량의 절대치는 헤어리베치를 재배하지는 않지만 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도가 토양 1g 당 6.0×10^3 cells 수준인 예산 논토양과 6.0×10^3 cells 수준인 남원의 논토양이 다 같이 가장 높았는데, 이들 토양이 보인 성적은 헤어리베치가 재배되면서 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도가 5.8×10^4 cells 수준으로 높았던 수원 밭토양과 1.7×10^4 cells 수준인 수원과 고성의 논토양 및 밀양의 밭토양보다도 높았다. 그런데 토양별로 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주들의 헤어리베치 공생효과 정도를 파악하기 위해 헤어리베치의 건물량 값을 뿌리혹무게 값으로 나눠서 본 결과 (Kang and Somasegaran et al., 1991), 공생효과가 우수한 균주를 내포한 토양 3곳은

Table 3. Symbiotic potentials of native Korean *R. leguminosarum* bv. *viciae* populations in whole-soil inoculum inoculated on Hairy vetch.

Soil sample no. [†]	10-fold-diluted (10^{-1}) inoculum			10-fold-diluted (10^{-3}) inoculum		
	No. of nodule plant ⁻¹	Nodule dry wt mg plant ⁻¹	Shoot dry wt g plant ⁻¹	No. of nodule plant ⁻¹	Nodule dry wt mg plant ⁻¹	Shoot dry wt g plant ⁻¹
1	92 b [‡]	131 a	6.25 abc	88 b	111 a	6.13 ab
2	114 b	151 a	5.75 bc	120 b	140 a	5.13 ab
3	118 b	132 a	5.75 bc	96 b	124 a	5.50 ab
4	150 b	131 a	6.00 bc	113 b	119 a	5.88 ab
5	163 b	163 a	7.63 a	128 b	136 a	6.13 ab
6	128 b	138 a	6.13 abc	87 b	106 a	5.63 ab
7	107 b	133 a	6.00 bc	117 b	107 a	4.38 b
8	109 b	108 a	6.25 abc	163 b	137 a	4.88 ab
9	75 b	138 a	5.50 bc	121 b	121 a	5.25 ab
10	75 b	147 a	5.13 c	101 b	90 a	5.13 ab
11	167 b	114 a	6.88 ab	110 b	112 a	5.50 ab
12	119 b	129 a	5.25 bc	134 b	115 a	4.75 b
13	110 b	124 a	5.63 bc	158 b	111 a	5.25 ab
14	174 b	133 a	5.50 bc	125 b	90 a	4.88 ab
60 kg N ha ⁻¹	332 a	147 a	6.75 abc	332 a	147 a	6.75 a

[†] See foot notes to Table 1.

[‡] Numbers followed by the same letter within a column are not significantly different (Duncan test, $p < 0.05$).

10배 희석접종과 1000배 희석접종한 성적을 볼 때 헤어리베치가 자라는 고성 논토양(10배 희석접종 44.4; 1000배 희석접종 53.1), 헤어리베치를 재배하지 않는 예산 논토양(10배 희석접종 47.8; 1000배 희석접종 55.2)과 수원 논토양(10배 희석접종 45.8; 1000배 희석접종 49.4)으로 압축할 수 있었다.

헤어리베치 공생효과 우수 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 선발 Table 3에서 질소고정잠재능이 우수한 것으로 확인된 예산, 수원, 고성의 논토양에서 분리한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 각 7균주와 사천의 밭토양과 대구 금호강변 토양에 자생하는 헤어리베치의 뿌리혹에서 분리한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 각 7균주 중에서 토양단위별로 헤어리베치 공생효과가 우수한 상위 3균주를 선별하여 정리한 성적은 Table 4와 같았다. 이들 가운데 뿌리혹 수는 대구의 KHR 113, 고성의 KHR 130 접종구에서 가장 높았고 ($p < 0.05$), 뿌리혹 무게는 사천의 KHR 107, 대구의 KHR 113, 수원의 KHR 128 접종구에서 가장 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 그리고 헤어리베치의 건물생산에 가장 큰 기여를 한 ($p < 0.05$) 전체토양의 상위 3균주는 사천의 KHR 106 (6.4 g plant⁻¹ 생산), 예산의 KHR 120 (6.4 g plant⁻¹ 생산), 수원의 KHR 122 (6.2 g plant⁻¹ 생산)이었다. 이를 토대로 해서 분석한 뿌리혹무게 대비 헤어리베치의 건물생산량 값, 즉 공생효과가 우수한 균주 2종은 헤어리베치를 재배하고 있는 사천 곤명면 마곡리의 KHR 106 (66.0)과 헤어리베치를 재배하지 않는 예산 고덕면 사리의 논토양에 분포한 KHR 120 (73.6)이었다.

Table 4. Effect of some Korean isolates of *R. leguminosarum* bv. *viciae* on the growth and root nodule development of hairy vetch in pot.

Soils [†]	Isolates	No. of nodule plant ⁻¹	Nodule dry wt mg plant ⁻¹	Shoot fresh wt Shoot dry wt	
				g plant ⁻¹	
Sacheon soils	KHR 104	211 b	101 ab	28.8 ab	5.9 ab
	KHR 106	195 ab	97 ab	33.2 a	6.4 a
	KHR 107	142 ab	117 a	28.8 ab	6.1 a
Daegu soils	KHR 111	132 ab	63 b	28.8 ab	5.8 ab
	KHR 113	234 a	115 a	26.8 ab	5.3 ab
	KHR 114	154 ab	93 ab	31.8 a	6.0 ab
Yesan soils	KHR 115	158 ab	92 ab	29.0 ab	5.9 ab
	KHR 118	199 ab	115 a	28.8 ab	6.0 ab
	KHR 120	184 ab	87 ab	31.8 a	6.4 a
Suwon soils	KHR 122	148 ab [‡]	99 ab	30.0 ab	6.2 a
	KHR 124	206 ab	106 ab	27.6 ab	5.4 ab
	KHR 128	151 ab	115 a	29.0 b	5.4 b
Gosung soils	KHR 129	154 ab	93 ab	30.8 ab	5.8 ab
	KHR 130	229 a	106 ab	30.9 ab	5.6 ab
	KHR 135	157 ab	92 ab	28.9 ab	5.5 ab

[†] Suwon soils from No. 4; Yesan soils from No. 1; Gosung soils from No. 6 in Table 1

[‡] Numbers followed by the same letter within a column are not significantly different (Duncan test, $p < 0.05$).

***R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주의 헤어리베치 접종효과** Table 4의 Pot시험에서 공생효과 우수균주로 선별된 *R. leguminosarum* bv. *viciae* KHR 106과 KHR 120의 포장시험 결과는 Table 5와 같았다. 단독 접종한 헤어리

베치의 건물 생산량은 Table 4의 성적과 마찬가지로 KHR 106 균주와 KHR 120 균주 간에 유의적인 차이가 없었지만 각각 5.19 t ha⁻¹과 5.18 t ha⁻¹으로 나타났다. 그러나 이들의 값은 무접종구의 것보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 균주를 혼합 접종한 헤어리베치는 건물생산량이 단독접종 성적의 95% 수준으로 낮았으나 무접종구의 헤어리베치보다는 11% 증수되었고, 다른 처리구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 5. Shoot yields of hairy vetch inoculated with Korean *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolates in upland soils.

Strains	Shoot dry wt. t ha ⁻¹	Yield index %
KHR 106	5.19 ± 0.25 a	100
KHR 120	5.18 ± 0.19 a	99.8
KHR 106 + KHR 120	4.91 ± 0.39 ab	94.6
Uninoculated	4.34 ± 0.34 b	83.6

***R. leguminosarum* bv. *viciae*의 단백질 전기영동 양상** Table 4에서 헤어리베치의 건물생산량이 높았던 *R. leguminosarum* bv. *viciae* KHR 106, KHR 120, KHR 122의 3균주에 대해서 단백질 전기영동을 한 결과는 Fig. 1과 같았다. 단백질의 분자량 분포는 사천 곤명면 마곡리의 KHR 106 균주 (Lane 1)의 경우 22.41 kDa의 단백질이 83.3% 이었고, 예산 고덕면 사리의 KHR 120 균주 (Lane 2)는 21.19 kDa의 것이 60.5% 이었으며, 수원 서둔동의 KHR 122 균주 (Lane 3)는 21.25 kDa의 것이 68.0% 이었다. 그러므로 이들 3균주는 단백질의 특성 측면에서 서로 다른 균주임을 알 수 있었다.

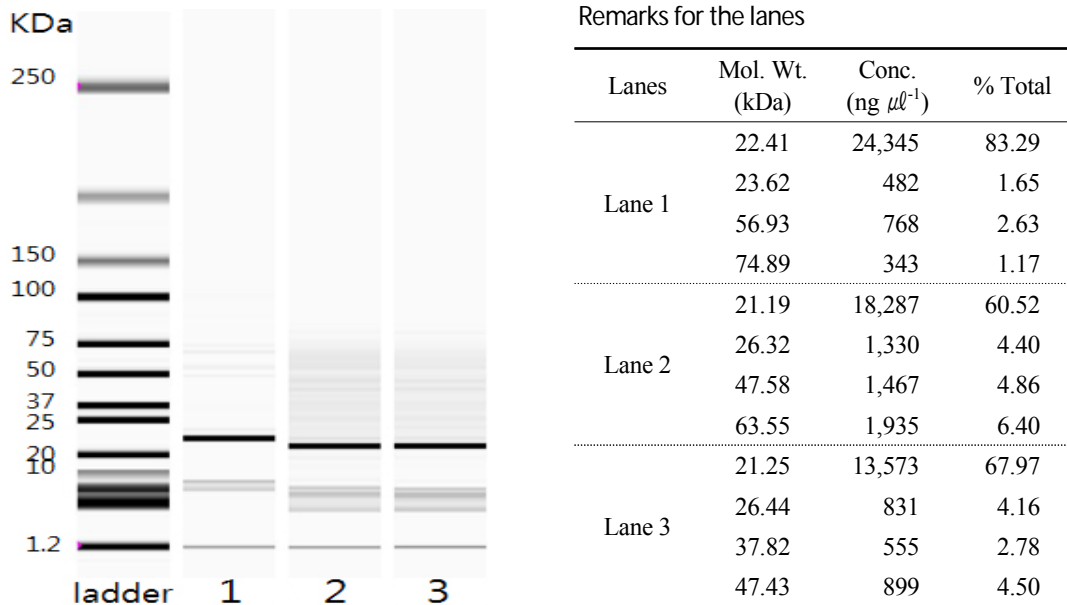


Fig. 1. Protein profile patterns of three *R. leguminosarum* bv. *viciae* isolates in the automatic gel electrophoresis using Experion Pro260 (Bio-Rad). Here strain for lane 1 is KHR 106; lane 2 for KHR 120; lane 3 for KHR 122.

Discussion

일반적으로 콩과식물의 생육은 공생관계를 갖는 질소고정 근류균의 토양서식 정도와 (Kang and Somasegaran et al., 1991; Kang et al., 1992), 숙주뿌리 감염 (Kang and Somasegaran et al., 1991; Lima et al., 2009) 그리고 질소고정력의 발현 정도에 (Chemining'wa and Vessey, 2006; Kang et al., 1991; Kitou et al., 2010; Yuan et al., 2016) 영향을 받는다. 본 시험에서 조사된 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식 밀도는 발토양이 논토양보다 헤어리베치 재배지에서 10%, 무재배지에서는 37% 가량 더 높았다 (Table 1). 토양의 질소고정잠재능으로 본 헤어리베치 건물생산량은 이와 반대로 10배 희석한 토양을 접종했을 때 논토양이 발토양보다 11.2% 높았고 1000배 희석접종했을 때는 8.8% 더 높았다 (Table 3). 이렇게 논토양의 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주들이 발토양 균주보다 수적으로 약간 열세에도 불구하고 높은 헤어리베치 건물생산량을 보인 것은 그만큼 질소고정력이 우수한 균주가 많음을 뜻하는 것으로 해석되었다 (Kang, 1998; Kang and Somasegaran et al., 1991). 그리고 Table 3의 질소고정잠재능 성적을 바탕으로 하여 예산과 수원, 고성, 논토양에서 분리한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주들의 헤어리베치 건물생산량 평균값은 (Table 4) 각각 6.1 g plant^{-1} , 5.7 g plant^{-1} , 5.6 g plant^{-1} 으로 계산되었는데, 이러한 순위경향은 Table 3의 10배 희석토양의 접종구 건물성적경향과 일치하였다. 토양별 최고 건물생산량 역시 예산 6.4 g plant^{-1} (KHR 120 균주), 수원 6.2 g plant^{-1} (KHR 122 균주), 고성 5.8 g plant^{-1} (KHR 129 균주)으로서 이들과 마찬가지로 경향을 보였다. 이런 점에서 토양을 희석접종해서 근류균의 공생효과를 알아보는 질소고정잠재능 시험은 우수균주의 보유정도를 나타내는 기준이 될 수 있음을 확인할 수 있었다 (Kang and Somasegaran et al., 1991).

보고에 의하면 (Kang and Somasegaran et al., 1991; Mothapo et al., 2013) 근류균의 서식밀도는 숙주식물의 재배에 영향을 받는 경향인데, 우리나라 콩 근류균 *Bradyrhizobium japonicum*의 농경지 서식경향을 (Kang, 1998) 참고할 때 *R. leguminosarum* bv. *viciae*가 논토양에서보다 발토양에 많이 분포한 것은 (Table 1) 숙주식물인 헤어리베치가 국내에 도입된 이후 물에 잠기지 않는 발토양 주변에서 쉽게 증식할 수 있었기 때문이 아닌가 생각되었다. 그런데 발토양에 서식한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주보다 최근에 헤어리베치를 재배하지 않았고 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 밀도가 $1.0 \times 10^3 \text{ cells g} \cdot \text{soil}^{-1}$ 수준으로 낮은 예산과 수원의 논토양은 헤어리베치의 건물생산을 증가시킨 균주를 많이 포함한 경향이었는데 (Table 3, 4), 이는 *Bradyrhizobium japonicum* 밀도가 높은 토양에서 콩의 건물생산량이 많았다고 한 강 (1998)의 보고와 달랐으며 서식하고 있는 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 다양성 측면에서도 헤어리베치의 재배품종 (Mothapo et al., 2013), 재배 작부 (Depret et al., 2004; Grossman et al., 2011), 무경운 재배 여부 (Kaschuk et al., 2006), *R. leguminosarum* bv. *viciae* 접종재배 여부 (de Fatima et al., 2007) 등에 대한 검토의 여지가 있음을 뜻하는 것으로 판단되었다. 한편, Table 1의 철원 동송읍 논토양과 안동 임하면의 발토양에서는 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 서식밀도가 최확치법으로 $1.7 \times 10^2 \text{ cells g} \cdot \text{soil}^{-1}$ 수준이었는데도 이들 토양을 1000배 희석접종한 헤어리베치에서 뿌리혹이 다수 발견되었다 (Table 3). 이러한 결과는 Kang and Somasegaran et al. (1991)의 시험에서도 확인되었는데, 질소고정 잠재능시험 과정에서의 먼지오염 또는 'Growth pouch'를 이용한 최확치법의 분석한계 (Turk and Keyser, 1993; Woome et al., 1988) 때문이 아닌가 생각되었다. 그리고 Table 4에서 헤어리베치 공생효과가 우수한 균주로 확인된 *R. leguminosarum* bv. *viciae* KHR 106과 KHR 120, KHR 122는 단백질 전기영동에서 서로 다른 유형을 보였는데 (Fig. 1), 이러한 현상은 헤어리베치의 재배역사에서 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 접종여부는 알 수 없지만 이들 균주가 *Bradyrhizobium japonicum* 처럼 우리나라에 토착화 되는 과정에 다양화된 결과로 해석되었다. 특히 설득력을 얻는 것은 아마도 다양한 헤어리베치 품종의 도입재배 가능성이었다. Mothapo

et al. (2013)은 다양한 헤어리베치 품종을 재배하면 근류균의 유전적 다양성이 높아진다고 하였고, Zhang et al. (2001)은 토착화된 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주는 숙주식물이 없어도 서로간에 유전자 이동이 일어나면서 다양해진다고 하였다. Yuan et al. (2016)은 토착 *R. leguminosarum* bv. *viciae*가 다양하게 분포하는 일본에서 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 헤어리베치 접종효과를 확인하였는데, 본 시험에서도 선발한 KHR 106 균주와 KHR 120 균주를 토착 *R. leguminosarum* bv. *viciae*가 5.8×10^4 cells \cdot soil⁻¹ 서식하는 토양에서 헤어리베치에 접종하여 16%의 유의적인 헤어리베치 증수효과를 확인할 수 있었다. 그러나 두 균주를 혼합해서 접종했을 때는 헤어리베치의 건물생산량이 증가되는 효과는 있었지만 단독접종한 것보다 뒤졌고 관행의 접종하지 않은 것에 비해서도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러므로 질소성분이 높은 풋거름 생산효과가 우수한 헤어리베치의 안정적인 증산을 위해서는 유전형질이 다양한 재배예정지 토착근류균과의 근류형성 경합력이 높으면서 상가적인 공생효과를 기대할 수 있는 질소고정력이 우수한 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 균주들을 이용하는 것이 바람직 할 것으로 판단되었다 (Ballard et al., 2004; Chemining'wa et al., 2006; Kang and Somasegaran et al., 1991; Lima et al., 2009).

Conclusions

우리나라에서 풋거름 작물인 헤어리베치를 재배할 때 질소고정 근류균 *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*의 활용 가능성을 검토할 목적으로 농경지에 분포하는 토착 *R. leguminosarum* biovar *viciae*의 몇 가지 특성을 분석한 결과는 다음과 같다. *R. leguminosarum* biovar *viciae*의 서식밀도는 논토양 7곳에 $1.7 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$ cells \cdot soil⁻¹, 밭토양 7곳에서는 $1.7 \times 10^2 \sim 5.8 \times 10^4$ cells \cdot soil⁻¹로 밭에서 논보다 10% (헤어리베치 재배지)~37% (헤어리베치 무재배지) 가량 더 높았다. 그러나 토양을 10배와 1000배 희석해서 접종한 헤어리베치의 건물생산량은 논토양이 밭토양보다 각각 11.2%, 8.8% 더 높았다. 토양에서 분리한 *R. leguminosarum* biovar *viciae* 균주 가운데 경남 사천시 곤명면 마곡리의 KHR 106과 충남 예산군 고덕면 사리의 KHR 120을 접종한 헤어리베치는 토착 *R. leguminosarum* biovar *viciae*가 5.8×10^4 cells \cdot soil⁻¹ 서식하는 밭에서 각각 5.19 t ha^{-1} 과 5.18 t ha^{-1} 의 건물생산량을 보이면서 16% 증수되었다 ($p < 0.05$). 그러나 이들을 혼합 접종한 헤어리베치의 건물생산량은 단독 접종한 경우보다 유의적인 차이 없이 5% 가량 낮았다. 그리고 KHR 106 균주는 22.41 kDa의 분자량을 가진 단백질이 전체 단백질의 83.3%, KHR 120 균주는 21.19 kDa의 것이 60.5% 이었으며, 이들보다 공생효과가 낮은 수원 서둔동의 KHR 122 균주는 21.25 kDa의 것이 68.0% 이었다. 이상의 결과로 볼 때, 우리나라 농경지에서 헤어리베치를 재배할 경우 다양한 토착 *R. leguminosarum* biovar *viciae*에 의한 공중질소 공급효과가 기대되지만, 보다 좋은 생육을 위해서는 질소고정력이 높고 근류형성 경합력이 우수한 균주의 접종이용이 바람직할 것으로 판단되었다.

Acknowledgement

This research was supported by Rural Development Administration (Project No. PJ010164032015), Republic of Korea.

References

Abdul-Baki, A.A. and J.R. Teasdale. 2007. Sustainable production of fresh-market tomatoes and other vegetables

- with cover crop mulches. Farmers' bulletin; FB-2280, U.S. Dep. of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC.
- Andrade, D.S., P.J. Murphy, and K.E. Giller. 2002. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4025-4034.
- Ballard, R.A., N. Charman, A. McInnes, and J.A. Davidson. 2004. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 36:1347-1355.
- Campiglia, E., F. Caporali, E. Radicetti, and R. Mancinelli. 2010. Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.) cover crop residue management for improving weed control and yield in no-tillage tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) production. *Eur. J. Agron.* 33:94-102.
- Chemining'wa, G.N., and J.K. Vessey. 2006. The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biol. Biochem.* 38:294-302.
- Cherr, C.M., J.M.S. Scholberg, and R. McSorley. 2006. Green Manure approaches to crop production: A synthesis. *Agron. J.* 98:302-319.
- Choi, B.S., C.G. Kim, K.Y. Seong, D.Y. Song, W.T. Jeon, H.S. Cho, K.H. Jeong, and U.G. Kang. 2011. Change of weed community in no-till corn with legume cover crops as living mulch. *Korean J. Weed. Sci.* 31:34-40.
- Clark, A.J., A.M. Decker, J.J. Meisinger, F.R. Mulford, and M.S. McIntosh. 1995. Hairy vetch kill date effects on soil water and corn production. *Agron. J.* 87:579-585.
- Dastikaitė, A., A. Sliesaravičius and N. Maršalkienė. 2009. Sensibility of two hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes to soil acidity. *Agron. Res.* 7:233-238.
- de Fatima, L.M., G. Kaschuk, O. Alberton, and M. Hungria. 2007. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biol. Fert. Soils* 43:665-674.
- Depret, G., S. Houot, M.R. Allard, M.C. Breuil, R. Nouaim, and G. Laguerre. 2004. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:87-97.
- Grossman, J.M., M.E. Schipanski, T. Sooksanguan, S. Seehaver, and L.E. Drinkwater. 2011. Diversity of rhizobia in soybean [*Glycine max* (Vinton)] nodules varies under organic and conventional management. *Appl. Soil Ecol.* 50:14-20.
- Jeon, W.T., S.O. Hur, K.Y. Seong, I.S. Oh, M.T. Kim, and U.G. Kang. 2011. Effect of green manure hairy vetch on rice growth and saving of irrigation water. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44:181-186.
- Kang, U.G. 1998. Symbiotic potential of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to arable land in southern parts of Korea. *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol.* 41:247-252.
- Kang, U.G. 2007. Enhancement of soil productivity by soybean cultivation. *Korea Soybean Digest* 24:1-13.
- Kang, U.G., H.S. Ha, Y.T. Jung, H.W. Kang, H.D. Yun, and Y.L. Ha. 1996. Diversity of *Bradyrhizobium japonicum* with different colony morphology in intrinsic antibiotic resistance, serological property, and protein profile. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 29:60-66.
- Kang, U.G., J.H. Choi, J.S. Lee, and Y.T. Jung. 1991. Studies on the development of acid tolerant and superior nitrogen fixation symbionts for pasture on hilly land. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 24:219-224.
- Kang, U.G., P. Somasegaran, H.J. Hoben, and B.B. Bohlool. 1991. Symbiotic potential, competitiveness, and serological properties of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to Korean soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1038-1045.
- Kang, U.G., Y.T. Jung, S.K. Lee, and H.S. Ha. 1992. *Rhizobium meliloti* population and alfalfa yields due to nitrogen fertilization and inoculation methods at cultivated upland soil. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 23:275-280.

- Kaschuk, G., M. Hungria, D.S. Andrade, and R.J. Campo. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 32:210-220.
- Kitou, M., G.Y. Jayasinghe, F. Nagumo, F. Anugroho, and K. Kinjo. 2010. Potential growth of hairy vetch as a winter legume cover crops in subtropical soil conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56:254-262.
- Ku, J.H., M.T. Kim, W.T. Jeon, K.Y. Seong, H.S. Cho, C.G. Kim, U.G. Kang, Y.U. Kwon, I.S. Choi, I.S. Oh, and T.S. Kim. 2014. A new hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) variety, 'Cheongpoongbora' for green manure. *Korean J. Breed. Sci.* 46:318-322.
- Laguerre, G., P. Louvrier, M.R. Allard, N. Amarger. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2276-2283.
- Lee, J.T., G.J. Lee, C.S. Park, S.W. Hwang, and Y.R. Yeoung. 2005. Effect of hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) sod culture on reducing soil loss and providing nitrogen for Chinese cabbage in highland. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 38:72-78.
- Lima, A.S., R.S. Abrahao Nobrega, A. Barberi, K. da Silva, D.F. Ferreira, D.F., and F.M. de Souza Moreira. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil* 319:127-145.
- Maul, J., S. Mirsky, S. Emche, and T. Devine. 2011. Evaluating a germplasm collection of the cover crop hairy vetch for use in sustainable farming systems. *Crop Sci.* 51:2615-2625.
- Mischler, R., S.W. Duiker, W.S. Curran, and D. Wilson. 2010. Hairy vetch management for no-till organic corn production. *Agron. J.* 102:355-362.
- Mothapo, N.V., J.M. Grossman, J.E. Maul, W. Shi, and T. Isleib. 2013. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *Appl. Soil Ecol.* 64:201-213.
- Palmer, K.M. and J.P.W. Young. 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2445-2450.
- Parr, M., J.M. Grossman, S.C. Reberg-Horton, C. Brinton, C. Crozier. 2011. Nitrogen delivery from legume cover crops in no-till organic corn production. *Agron. J.* 103:1578-1590.
- RDA (Rural Development Administration). 2012. Cultivation and use of leguminous green manure crop. Chart 2 Hairy vetch. pp.29-84. Rural Development Administration. Suwon, Korea.
- Rochester, I. and M. Peoples. 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: inputs of fixed N, N fertiliser savings and cotton productivity. *Plant and Soil*, 271:251-264.
- Samson, R. 1990. Hairy vetch helps solve nitrogen problems with conservation tillage. Available at: <https://www.reap-canada.com/online-library/Magazine%20Articles/Crops/17%20Hairy%20vetch.pdf>. Accessed in Sept. 2017.
- Seo, J.H., H.J. Kim, and S.J. Kim. 2000. Change of green manure and nitrogen yield of hairy vetch according to seeding date in autumn. *Korean J. Crop Sci.* 45:400-404.
- Tumbure, A, M. Wuta, and F. Mapanda. 2013. Preliminary evaluation of the effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in nodulating hairy vetch (*Vicia villosa*) in the sandy soils of Zimbabwe, S. Afr. *J. Plant Soil* 30:233-239.
- Turk, D. and H.H. Keyser. 1993. Accuracy of most-probable-number estimates of rhizobia for tree legumes. *Soil Biol. Biochem.* 25:69-14.
- Undersander, D.J., N.J. Ehlke, A.R. Kaminski, J.D. Doll, and K.A. Kelling. 1990. Hairy vetch. *Alternative Field Crops Manual*. University of Wisconsin-Madison and University of Minnesota. Available at: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/vetch.html>. Accessed in Sept. 2017.
- USDA National Institute of Food and Agriculture. 2016. Hairy vetch for cover cropping in organic farming. Available

at: <http://articles.extension.org/pages/18570/hairy-vetch-for-cover-cropping-in-organic-farming>. Accessed in Sept. 2017.

- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule-bacteria. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Wagger, M.G. 1989. Cover crop management and nitrogen rate in relation to growth and yield of no-till corn. *Agron. J.* 81:533-538.
- Woomer, P.L., P.W. Singleton, and B.B. Bohlool. 1988. Reliability of the most-probable-number technique for enumerating rhizobia in tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1494-1497.
- Yuan, K, H. Miwa, M. Iizuka, T. Yokoyama, Y. Fujii, and S. Okazaki. 2016. Genetic diversity and symbiotic phenotype of hairy vetch rhizobia in Japan. *Microbes Environ.* 31:121-126.
- Zhang, X.X., B. Kosier, and U.B. Priefer. 2001. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol. Ecol.* 10:2297-2305.