

우리나라 토着大豆根瘤菌의 分布狀態와 生理 및 生態學的 特性 第Ⅲ報 土着大豆根瘤菌의 窒素固定効率 및 Nitrate reductase 特性

柳震彰 · 徐壯善 · 李相奎 · 朴俊奎 · 趙武濟*

Physiological and Ecological Characteristics of Indigenous Soybean Rhizobia Distributed in Korea

III. Symbiotic Effectiveness and Nitrate Reductase Characteristics of Indigenous Soybean Rhizobia

Jin-Chang Ryu, Jang-Sun Suh, Sang-Kyu, Lee, Jun-Kyu Park and Moo-Je Cho*

Summary

In order to improve effectiveness of rhizobia- legume symbiotic nitrogen fixation, ecological and physiological characteristics of indigenous rhizobia distributed in Korea, that is, symbiotic effectiveness of indigenous soybean rhizobia, nitrate reductase activities of the soybean bacteroid from five different soils, and differences of host-infection abilities among the soybean cultivars under population densities of the same indigenous soybean rhizobia, were investigated. The results were summarized as follows:

1. The number of indigenous soybean rhizobia was ranged from 9.2×10^2 cells per gram of soil in calcareous soil II to 42.4×10^3 cells per gram of soil in calcareous soil I in Danyang.
2. The symbiotic effectiveness of indigenous soybean rhizobia from five different soils was high in the case of soybean continuously cultivated, and calcareous soil I that population densities of indigenous soybean rhizobia were observed highly.
3. Inverse relationship was observed between total nitrogenase activity (TNA) and nitrate reductase activity (NRA) from the soybean bacteroids ($r = -0.502^*$), but the correlation between nitrate reductase and specific nitrogenase activities (SNA) could be divided into two groups. It was classified into group I which is high in SNA and low in NRA, and group II which is low in SNA and high in NRA.
4. The infection ability of the indigenous soybean rhizobia in the same soil conditions showed the reciprocal difference among each soybean cultivars. In Kwangkyo and Jangyeup, the symbiotic effectiveness appeared by infection of indigenous soybean rhizobia was higher than it of the other soybean cultivars.

農業技術研究所 (Institute of Agricultural Sciences, Suweon 170, Korea)

* 慶尙大學校 農科大學 (College of Agriculture, Gyeong Sang National University, Jinju, Korea)

緒 言

大氣圈중에 70% 이상 存在하는 不活性의 N_2 gas 를 NH_3 로 還元할 수 있는 根瘤菌-豆科作物과의 共生的인 關係는 農業生産에 있어서 窒素가 不足한 土壤條件의 경우 그 重要性이 날로 高潮되고 있다.

그러나 豆科作物을 栽培함에 있어서 根瘤菌에 의한 窒素固定力の 發現은 여러가지 要因에 의해서 支配되는 것으로 알려져있다. 특히 土壤중에서 腐生生活을 하다가 宿主植物이 栽培될때 豆科作物의 根系에 選擇의 으로 感染되어 根瘤를 形成할 수 있는 有效土着根瘤菌과 根瘤를 形成할 수 없는 無效土着根瘤菌의 密度를 根瘤菌의 人工接種에 있어서 가장 큰 成敗 要因이 되고 있다.⁴⁾

wilson 등³⁹⁾ 에 의하면 土着根瘤菌의 密度는 豆科作物의 栽培興否와 栽培年數에 支配된다고 하였으나 Nutman 등²⁵⁾ 은 非豆科作物을 長期間 連續的으로 栽培한 圃場에서도 土着根瘤菌을 檢出한바 있다.

豆科根瘤菌의 nitrate reductase에 관한 研究는 最初로 1954年 Evans⁹⁾ 가 大豆根瘤의 bacteroid 內에 nitrate reductase가 含有하고 있음을 發見한 以來 nitrogenase와 nitrate reductase에 관한 研究에 關心이 集中되었다.

Evans 등⁹⁾ 은 根瘤의 bacteroid 內에서 nitrate reductase와 nitrogenase의 兩 酵素는 相互共存 構成要素로서 根瘤가 老衰했을 때 酵素의 活性이 減少하고, 특히 根瘤의 hemoglobin과 植物體의 窒素含量이 兩 酵素의 活性을 支配한다고 하였으며, $NO_3^- - N$ 와 $NH_4^+ - N$ 를 施用하면 根瘤의 nitrate reductase 活性과 hemoglobin의 含量을 減少시키고, 특히 Fe와 Mo이 缺如하였을때에는 더욱 顯著하다고 하였다.

Manhart 등²⁰⁾ 은 根瘤의 bacteroid 內에서 nitrate reductase의 活性과 窒素固定力과의 相互關係를 調査한 結果, *R. japonicum*과 cowpea rhizobia의 bacteroid에서 nitrate reductase의 活性이 높을수록 窒素固定能이 높았으나, *R. trifolii*, *R. leguminosarum* 및 *R. phaseoli*의 bacteroid에서는 兩 酵素의 活性이 同伴되지 않음을 提示하였다. 또한 Kennedy 등¹⁵⁾ 은 *R. japonicum*의 bacteroid에서 nitrate reductase의 産物인 nitrite는 0.1 mM의 낮은 濃度에서도 nitrogenase의 活性을 強하게 抑制한다고 하였다. 한

편 kamberger 등¹⁴⁾ 은 nitrate의 低濃度가 알팔과 根瘤의 아세틸렌 還元力을 抑制함을 報告하였다.

Trinchant 등³⁵⁾ 은 大豆 bacteroid의 nitrogenase 活性에 미치는 nitrite의 效果를 nitrogenase component I과 II를 各各 分離 調査한 結果, 精製한 酵素는 nitrite가 0.1 mM보다 낮은 濃度에서도 強하게 抑制되었다. 이들 抑制效果는 nitrogenase의 component II인 Mo-Fe蛋白質의 component에 nitrite가 結合되므로서 나타나며, Fe蛋白質의 component에도 抑制效果를 나타내나, nitrogenase의 活性에 있어서 nitrite가 選擇의 養質은 아니라고 報告하였다.

本 研究는 豆科作物과 根瘤菌과의 相互共生關係에서 일어나는 窒素固定效率 增大方法의 基礎資料로 活用코져 우리나라 土着 大豆根瘤菌의 生理 및 生態學的 特性에 관한 一聯의 實驗을 連續的으로 遂行하였든바 土着 根瘤菌의 窒素固定力과 生理의 特性에 관한 研究에 이 第3報로 土壤別 土着 大豆根瘤菌의 分布, 窒素固定效率 및 nitrate reductase 活性을 비롯하여 同一한 土壤條件에서 大豆品種別 土着 大豆根瘤菌의 親和性을 調査한 結果를 報告코져 한다.

材料 및 方法

本 實驗에 使用한 土壤은 콩 連續栽培地土壤外 4個 土壤(表 1)으로서 '85年 4月 4日부터 4月 7日間에 걸쳐 現地圃場에서 採取하여 溫室로 옮겨 10mesh 篩로 通過시켰다.

이들 5個土壤에 대한 土着 大豆根瘤菌의 菌數測定은 M PN計數法⁵⁾에 의하여 大豆 2個品種(短葉콩, H-25)을 供試하여 實施하였다. 大豆栽培는 Wecek 및 Brill 등³⁶⁾의 變法으로 vermiculite 50g과 大豆營養液 20 ml를 2중 종이컵에 넣고 殺菌하였다. 大豆種子는 95% alcohol과 4% calcium hypochlorite에 種子表面을 消毒하여 2% water agar가 含有한 petri dish 상에 넣어 25°C 恒溫器에서 48時 暗條件으로 發根시켜 殺菌한 2중 종이컵에 1本씩 심은 後, 濕土 30g을 殺菌한 0.15 M phosphate buffer saline (NaCl, 8.5g; Na_2HPO_4 , 21.3g; KH_2PO_4 , 20.4g/l) 溶液 270 ml에 넣고 10分間 振盪한 다음 懸濁液 3 ml를 27 ml PBS溶液^{5,7)}에 10^{-1} 부터 10^{-7} 까지 殺釋한 懸濁液 1 ml를 各各 接種하고 殺菌한 polypropylene film (12 cm

Table 1. Chemical properties of the soil used

Soil source	pH (1 : 5)	OM (%)	Av. P ₂ O ₅ (ppm)	Exch. (me / 100 g)				Act. Fe (%)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)
				Ca	Mg	K	Na				
<u>Soybean cultivated</u>											
Soybean continuously cultivated soil (Chungbuk Danyang)	6.95	2.64	31	8.50	1.18	0.92	0.07	3.55	2.45	1.68	479
Calcareous soil 1 (Chungbuk Danyang)	6.36	3.10	68	3.55	0.74	0.84	0.09	0.91	2.65	5.60	90
Calcareous soil 2 (Chungbuk Danyang)	6.68	2.12	46	14.30	4.56	0.27	0.25	2.81	4.96	1.99	607
Newly reclaimed soil (Gyeonggi Hwaseong)	6.06	1.19	15	1.05	1.21	0.28	0.07	2.47	3.04	1.17	68
<u>Soybean un-cultivated</u>											
Saline soil (Gyeonggi Hwaseong)	6.94	1.29	44	1.01	2.58	1.16	2.18	0.71	3.68	2.32	178

× 29 cm)으로 컵을 덮었다. 이들 종이컵은 溫室로 옮겨 5週栽培한後 Brockwell等⁵⁾의方法에準하여菌數를計測하였다.

土壤別土着大豆根瘤菌의窒素固定效率및nitrate reductase活性調査를위한大豆栽培는表1에表示한5個土壤을各各30kg씩4角pot(35×45×35cm)에充填하고2~3cm로切斷한殺菌벗짚1%와反當磷酸8kg,加里8kg의該當量을熔成磷肥및鹽化加里를各各施用하여土壤과混合하였다.그리고消毒한短葉콩을4月13日에pot當50粒씩播種하였다.本葉이2~3枚出現하였을때20本씩確保하고,殺菌蒸溜水를1~2日間隔으로供給하면서大豆를溫室에栽培하면서實驗에使用하였다.

根瘤의窒素固定力測定은四週間大豆를栽培한後,뿌리部位를採取하여100ml三角flask에넣어serum stopper로密閉시킨다음全體容積에서10%空氣를아세틸렌으로置換하여28°C에서2時間反應시켜gas chromatograph로測定하였다.³¹⁾

大豆根瘤菌의bacteroid狀態에서nitrate reductase活性는Manhart²⁰⁾와streeter等^{33,34)}의方法에準하였다.即bacteroid分離는大豆播種後5週째에着生한根瘤1g을採取하여0.05M potassium phosphate buffer(pH 7.0)溶液5ml를加하여분쇄하고4重層가제에서여과한여액을3分間遠心分離(500rpm)한後상등액을다시10分間遠心分離(1,200rpm)하였다.얻어진bacteroid pellet에potassium phosphate buffer溶液2ml를加하여bac-

teroid懸濁液를만들었다.

bacteroid懸濁液0.2ml를17ml test tube에取하고,50mM Na succinate 및嫌氣의條件으로30°C에서1時間振盪恒溫하였다.嫌氣的條件은純粹He gas로30初間4回反覆하여置換하였다.

培養한各試料는1M acetate 0.2ml를加하여反應을中止시켜10分間遠心分離(15,000rpm)한上登液에대해서nitrite定量은0.02% N-(1-naphthyl) ethylenediamine과1.0% sulfanilamide를使用한比色法^{21,24)}으로spectrophotometer의550nm波長에서測定하였다.그리고菌體蛋白質定量은Goa⁴²⁾의方法에準하였다.nitrate reductase의活性單位는時間當蛋白質mg當生成된NO₂⁻의nmole單位로表示하였다.

同一한土壤條件에서土着大豆根瘤菌과大豆品種別親和性에다른根瘤形成量및窒素固定力測定試料는3年間大豆를連續栽培한農業技術研究所內의大豆種子採種圃場에서採取하여實驗에使用하였다.

結果 및 考察

1. 土壤別土着大豆根瘤菌의分布

大豆作付型 및土壤의特性이서로다른5個土壤에서土着根瘤菌의菌數를調査한結果는表2와같다.

大豆栽培地4個土壤중에서土着大豆根瘤菌의分布密度를보면晩生種인短葉콩을供試한경우는石灰岩

Table 2. Most probable number of indigenous *R. japonicum* in soybean cultivated- and un-cultivated soils

Soil source	Cultivar	Most probable number (g ⁻¹ soil)	
		Estimate	Confidence limits (95%)
Soybean cultivated			
	Dan - yeup		
Soybean continuously cultivated soil		14.7 × 10 ³	4.1 - 52.1 × 10 ³
Calcareous soil 1		42.4 × 10 ²	10.4 - 172.7 × 10 ³
Calcareous soil 11		14.7 × 10 ²	4.1 - 52.1 × 10 ²
Newly reclaimed soil		42.4 × 10 ³	10.4 - 172.7 × 10 ³
Soybean un - cultivated			
Saline soil		0 × 0	0 × 0
Soybean cultivated			
	H - 25		
Soybean continuously cultivated		91.8 × 10 ²	22.9 - 367.2 × 10 ²
Calcareous soil 1		42.4 × 10 ²	10.4 - 172.5 × 10 ²
Calcareous soil 11		9.2 × 10 ²	2.3 - 66.7 × 10 ²
Newly reclaimed soil		42.4 × 10 ²	10.4 - 372.5 × 10 ²
Soybean un - cultivated			
Saline soil		0 × 0	0 × 0

(忠北 丹陽)에 由來한 石灰岩 I 土壤과 花崗片麻岩에 由來한 赤黃色土로서 大豆를 2年栽培한 經歷이 있는 新開墾地에서 42.4 × 10³ cells/g soil의 菌數로서 제일 많았고, 石灰岩 I 土壤과 同一한 母岩에 由來한 石灰岩 II (忠北 堤原) 土壤에서는 14.7 × 10² cells/g soil로 顯著히 낮은 土着大豆根瘤菌數를 보였다. 反面에 早生種인 H-25 品種을 供試하였을때는 大豆를 5年以上 連作한 花崗片麻岩에 由來한 赤黃色 土壤에서 91.8 × 10² cells/g soil로 가장 많았고 제일 작았던 土壤은 역시 石灰岩 II 土壤으로 나타났다. 同一한 土壤이라도 土着大豆根瘤菌은 短葉의 콩 品種에서는 1.5 ~ 42.4 × 10³ cells/g soil에 비해 H-25 品種의 경우는 9.2 ~ 91.8 × 10² cells/g soil의 菌數密度로 品種間에 土着大豆根瘤菌의 感染力이 相異함을 알 수 있었다.

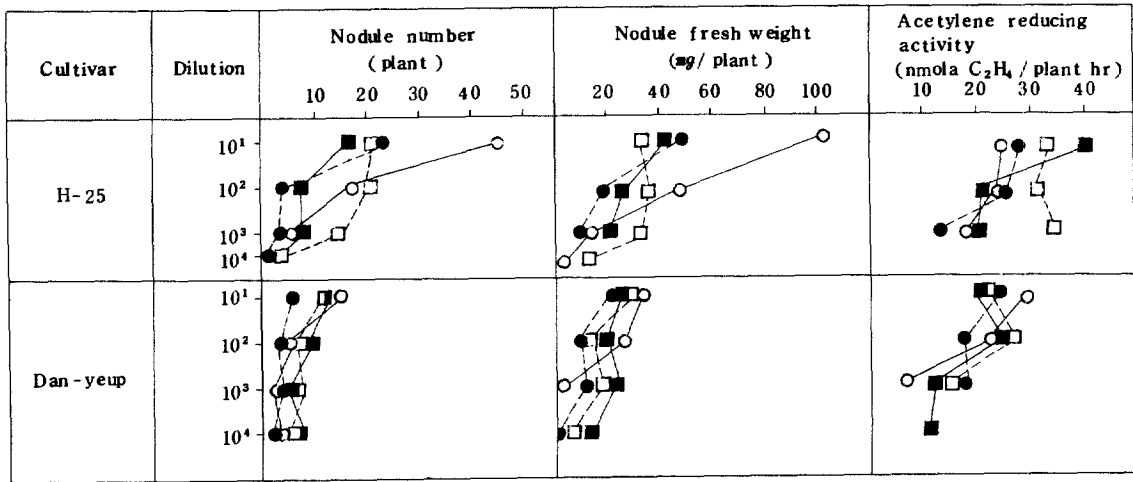
大豆를 栽培한 적이 없는 干拓地에서는 土着大豆根瘤菌이 전혀 棲息하지 않았음을 알 수 있었다. 干拓地에서 土着根瘤菌이 棲息할 수 있는 能力은 宿主植植의 栽培與否보다도 土壤의 酸度를 비롯한 置換性나트륨 등 土壤化學性的 影響이 더욱 컸을 것으로 생각된다.

Hiltbold 등¹³⁾은 土壤의 肥沃도가 낮은 圃場에 石灰, 磷酸, 加里를 適切히 施用하므로써 土着大豆根瘤菌의 菌數는 10⁴ ~ 10⁵ cells/g soil였으나, 磷酸, 加里가 缺乏한 土壤에서는 10³ ~ 10⁴ cells/g soil로 土着大豆根瘤菌數가 顯著히 減少한 反面, 酸도가 4.6程度

인 酸性土壤에서는 10² cells/g soil 以下로 菌數의 減少가 컸음을 밝힌바 있다.

Moawad 등²³⁾은 大豆栽培 土壤에서 根瘤形成力에 미치는 土着大豆根瘤菌의 serogroup 間에 競爭要因으로 根圈의 反應을 調査한 結果 全體 土着大豆根瘤菌數는 1.7 ~ 40 × 10⁴ cells/g soil로서 serogroup 123이 10 ~ 50%로 優點하였으나 試料를 採取한 季節間에 多少 相異하였다고 한다. 本 實驗 結果 品種間에 土着大豆根瘤菌數가 相異한 點은 앞에서 言及한 것처럼 品種의 遺傳的 表現型에 따른 serogroup의 感染力에서 온 差異로 解析할 수 있다.

土壤間에 土着大豆根瘤菌數의 差異는 土壤의 肥培管理를 비롯하여 土壤의 理化學的 特性에서 온 것으로 解析되며, 特히 石灰岩 II의 경우는 土壤의 理化學的 沮害成分이 關聯되었을 것으로 생각되나, 土壤의 各種毒素物質 및 微生物이 生成하는 毒素物質 등이 土着大豆根瘤菌의 密度를 低下시킨 것으로 생각된다.²²⁾ 土着大豆根瘤菌數가 根瘤形成量 및 窒素固定量에 미치는 影響을 土壤稀釋 系列別로 보면 그림 1에서와 같이 土壤의 稀釋系列이 높아질수록 根瘤菌數 및 根瘤무게가 顯著히 적어짐을 알 수 있었다. 即 10¹ 系列의 土壤稀釋液을 接種媒體로 使用하였을때 土着大豆根瘤菌에 의해 感染着生한 根瘤數는 晚生種의 短葉콩에서는 本當 20 ~ 40 個體였으나, 早生種 H-25는 5 ~ 15 個體의 根瘤形成量을 보였던 點으로 보아 同一한 土着大豆根瘤菌數가 있



Soil ; ○—○ Soybean continuously cultivated soil
 source ●—● Calcareous soil I
 □—□ Calcareous soil II
 ■—■ Newly reclaimed soil

Fig. 1. Effects of soil dilution on number of nodule, nodule mass, and total nitrogenase activity in a plant-infection test.

라도 토착大豆根瘤菌과 大豆品種間에는 親和性 程度가 相異한 것으로 나타났다.

이것은 豆科作物의 根瘤效果에서 나온 것으로서 大豆品種間에 根分泌物이 다른 可能性이 있기 때문에 토착大豆根瘤菌의 增殖 및 感染力의 差異에 基因된 것으로 생각된다. 根瘤菌의 宿主植物에 感染되는 特異性으로는 polygalacturonase 및 lectin 說이 알려져 있지만²⁶⁾, 同一한 宿主에서도 이와같은 說이 適用될지 疑問이 간다. 그러나 本 實驗에서 根瘤의 形成力이 大豆品種間에 相異한 것은 根瘤着生에 有效한 物質로 알려져 있는 myo-inositol, pyridine-3-sulfanate 등의 物質이 同一宿主內에서도 品種間에 다를것으로 생각된다.²⁶⁾

土壤稀釋溶液의 接種媒體 濃度間에 根瘤形成量은 큰 差異를 볼 수 있었으나 아세틸렌 還元力은 顯著한 差異를 볼 수 없었다. 土壤稀釋溶液의 10¹, 10², 및 10³ 系列의 接種 媒體間에 根瘤形成量의 變化에 比해서 顯著하지 못함을 알 수 있었다. 아세틸렌 還元力은 根瘤形成의 絕對量에 支配 된것이 아니고, 根瘤의 質的變動, 即 bacteroid 內에서 nitrogenase 活性을 갖는 根

瘤의 比率差異에서 온 것으로 解析된다. 同族性 土着 根瘤菌은 根瘤를 形成할수 있는 homologous 菌株(nod⁺ gene)와 根瘤를 形成할 수 없는 heterogous 菌株(nod⁻ gene)로 區分 될뿐만 아니라, 비록 homologous 菌株과 할지라도 機能上的 分類에서 nif⁺ gene과 nif⁻ gene 으로 나누고 있는 點으로 보아^{11,19)} 本 實驗에서 토착大豆根瘤菌중 nod⁺ gene 을 갖인 菌은 많았지만 nif⁺ gene 을 갖인 토착大豆根瘤菌이 적었음을 間接的으로 그림 1에서 나타내고 있다. 이것은 土壤溶液稀釋 系列에 따른 根瘤形成量과 아세틸렌 還元力에서 推定할 수 있을것 같다.

土壤의 理化學的 性質 및 토착大豆根瘤菌數가 相異한 土壤條件에서 大豆의 共生效率 및 根瘤의 bacteroid 內에서의 窒酸還元酵素의 活性을 調査한 成績은 表3와 같다.

根瘤形成量은 大豆連續栽培地 및 石灰岩 II 土壤에서 705 ~ 718 mg/ plant로 제일 많았고 植物體當 着生根瘤에 依한 窒素固定力(total nitrogenase activity)은 大豆連續栽培地에서 제일 높았고 反面 新開墾地에서 낮은 傾向을 보였다. 根瘤單位當 窒素固定力(specific ni-

Table 3. Effectiveness of indigenous rhizobia from different sample soils

Soil source	Host Plant	Fresh nodule mass (mg / plant)	TNA	SNA	Protein in bacteroid (mg/g nodule)	Nitrate reductase activity	
			(nmole C ₂ H ₄ /g fresh nodule /hr)	(nmole C ₂ H ₄ /g fresh nodule /hr)		Aerobic assay (μ mole NO ₂ ⁻ /mg protein/hr)	Araerobic assay
Soybean continuously cultivated soil	Soybean	718 ± 34 ^{a/}	185 ± 36. 2	327. 1 ± 74. 4	440. 7 ± 84. 7	9. 7 a*	7. 2 a
Calcareous soil I	"	705 ± 194	151. 8 ± 14. 5	150. 9 ± 19. 4	372. 3 ± 17. 8	9. 5 bc	4. 0 b
Calcareous soil II	"	599 ± 74	111. 2 ± 29. 3	200. 0 ± 75. 3	313. 7 ± 59. 4	6. 0 b	4. 6 b
Newly reclaimed soil	"	295 ± 12	61. 1 ± 20. 3	237. 7 ± 45. 9	292. 8 ± 29. 3	3. 7 c	3. 7 b
Bean cultivated soil	Bean	277 ± 25			215. 2 ± 5. 2	5. 9 b	7. 5 a

a/ Values ± standard error of the mean of three replicates.

* Duncan's Multiple Range Test, 5% level.

trogenase activity)은 150 ~ 325 mole/g fresh nodule/hr의範圍로서 大豆 連續栽培 > 新開墾地 > 石灰岩 II > 石灰岩 I 土壤의 順位도 窒素固定力이 높게 나타났다.

表 2 과 表 3 에서 土着大豆根瘤菌數와 根瘤着生量 및 窒素固定力을 서로 比較해 보면 土着根瘤菌數가 많았던 土壤에서 根瘤形成量이 많았음을 立證할 수 있었으나, 特히 新開墾地에서는 土着大豆根瘤菌數는 다른 土壤에 비해 相當히 많았으나(表 2), 根瘤形成量 및 sp-specific nitrogenase activity는 제일 낮았음을 알 수 있었다(表 3). 土壤중에서 宿主가 있는 條件에서 根瘤形成 및 窒素固定力은 土着根瘤菌의 生菌數 以外에 土壤의 理化學的 性質에 따라 支配됨을 알 수 있었다. 그 原因으로 新開墾地土壤은 pH가 6.1로서 다른 土壤의 pH 6.4 ~ 7.0보다 낮았을 뿐만 아니라 特히 磷酸含量이 15 ppm 程度로서 顯著히 낮아 大豆生育 不良에 基因된 것으로 생각할 수 있다.

根瘤菌을 接種하지 않은 條件에서 土着大豆根瘤菌과 宿主와의 共生的인 側面에서 土着根瘤菌의 菌數와는 거의 相關關係가 없고³⁷⁾ 土着根瘤菌의 感染에 影響을 주는 宿主의 栽培條件인 土壤肥沃度³⁸⁾, 卽 土壤의 pH를 비롯한 置換性 칼슘 및 磷酸含量에 크게 支配된 것으로 생각된다. 宿主가 없는 條件에서 土着大豆根瘤菌數는 無效菌과 有效菌²⁶⁾으로 區分할 수 있을 뿐만 아니라, 비록 有效菌이라 하더라도 nif⁺ gene 과 nif

gene³⁹⁾으로 存在하기 때문에 土着根瘤菌의 密度가 높아도 이들 菌의 遺傳的 및 生化學的 特性에 따라 根瘤形成 및 窒素固定力 發現 樣相이 다른 것으로 생각된다.

土壤의 特性이 서로 다른 土壤에 大豆를 심은 後 30 日次 大豆根瘤 bacteroid의 窒酸還元酵素 活性을 表 4에서 보면 이들 酵素의 活性은 3.7 ~ 9.7 μ mole NO₂⁻ /mg protein hr의 範圍로서 根瘤의 分離源間에 多少 다르게 나타났다. 이들 活性이 제일 높게 나타난 分離源은 大豆 連續栽培地의 根瘤 bacteroid로서 9.7 μ mole NO₂⁻ /mg protein hr 였고 反面에 新開墾地의 根瘤 bacteroid는 3.7 μ mole NO₂⁻ /mg protein hr 로서 4 個 土壤의 根瘤分離源중 제일 낮게 나타났으며, 該의 bacteroid의 窒酸還元酵素活性 보다도 적었다. 이러한 現象은 酵素의 分析 條件과 無關하게 根瘤의 bacteroid 內에서 적었다. 이러한 現象은 酵素의 分析 條件과 無關하게 根瘤의 bacteroid 內에서 窒酸還元力은 같은 傾向으로 나타났다. 品種과 根瘤의 老齡이 同一하더라도 根瘤의 形成源 및 分離한 根瘤의 大豆栽培地 土壤特性이 다름에 따라 根瘤로부터의 이들 酵素의 活性이 相異함을 알 수 있었다. 高等植物의 여러 部位에서 窒酸還元酵素 活性은 植物의 種, 種內의 品種, 植物의 老齡을 비롯하여 培養條件에 따라 相異함이 報告된 바 있어, 本 實驗에서의 根瘤分離源間에 bacteroid 內에 含有된 構成物質의 相異와 宿主에 感染되어 着生

한 根瘤菌의 生理 및 生態의 推性에 따라서 다른것으로 推定할 수 있다.

表 4에서 nitrogenase (specific nitrogenase activity)와 nitrate reductase의 活性 關係를 보면 大豆 連續栽培地의 着生根瘤 bacteroid에서는 nitrogenase의 活性은 높았으나, nitrate reductase의 活性은 5個 分離菌源중에서 제일 낮게 나타났다. 卽 이兩5酵素의 活性은 根瘤菌과 宿主植物의 結合에 따라서 相異하다고 報告한 Manhart^{20,21)}의 結果와 같다. 만약 有效 根瘤의 bacteroid에서 높은 nitrate reductase의 酵素活性을 갖는다면 nitrogenase와 nitrate reductase間에는 正의 相關關係가 있을 것이다. 그러나 大豆 根瘤菌의 選擇面에서는 窒素源으로서 窒酸을 還元할 수 있는 大豆 連續栽培地의 分離菌보다 新開墾地의 分離菌을 利用함이 窒素固定의 收支面에서 有用할것으로 생각 된다.

2. 大豆 品種別 土着 大豆根瘤菌의 窒素固定效率 및 nitrate reductase의 活性

土壤의 特性과 土着 根瘤菌數가 同一한 土壤에서 大豆 品種別 窒素固定效率과 bacteroid內에서 窒酸還元 酵素의 活性을 調査한 成績은 表 4와 같다.

根瘤形成量은 短葉콩을 비롯하여 8個 供試品種에서 0.44 ~ 1.11 gr/plant 로 大豆 品種間에 顯著한 差異를 보였고, 光敎와 短葉은 1.0 gr/plant 以上으로 제일 많았으며, 남천과 水原 117號의 大豆 品種에서는 0.5 gr/plant 程度로서 제일 적은 根瘤形成을 보였으

나 中原밭에 比해서는 多少 많은 편이었다. TNA는 236 ~ 480 n mole C₂H₄/plant hr 로서 品種間에 多少 差異가 있었으나, 根瘤形成量이 많았던 品種에서는 TNA가 높은 傾向이었고, 短葉의 경우는 根瘤形成量에 比해서 다른 品種보다 TNA가 가장 낮게 나타났다. 그러나 SNA는 230 ~ 659 n mole C₂H₄/plant hr 로서 品種間에 顯著한 差異를 보였는데 特히 남천, 水原 117號 및 長葉 等の 大豆 品種에서 높았다. 宿主植物과 根瘤菌과의 共生關係 成立은 根瘤形成量도 많고 窒素固定量도 많아야만 大豆 種實 또는 乾物重의 絕對收量에 寄與도가 클 것이다. 그러나 豆科植物과 根瘤菌과의 共生 關係에서 窒素固定量은 豆科作物의 種間에 다르겠지만, 特히 Shibles等²²⁾은 種實收量을 300 kg/10 a을 얻기 위해서 全 生育期間중 28 ~ 32 kg/10 a의 窒素가 要求되는데 根瘤菌으로부터 供給받은 窒素量은 25 kg/10 a 程度로서 그 不足量을 人爲의으로 充足 시켜야 한다고 하였고, Kohl等¹⁷⁾은 肥沃한 土壤에서 大豆 成熟期에는 固定된 窒素의 約 20%만 利用할수 있지만 土壤중의 有效한 窒素含量을 人爲的으로 補給수 있으면 固定된 窒素의 利用量을 增加시킬수 있으나 豆科 根瘤菌의 窒素固定 效率을 增大하기 위해서는 土壤에서 오는 모든 阻害要因을 人爲的으로 排除함과 동시에 土着根瘤菌의 有效化와 根瘤菌의 接種 等 諸要因의 改善이 必要할 것으로 생각된다.

根瘤의 bacteroid에서 窒素固定力 發現은 Mo-Fe와 Mo蛋白質로 構成된 nitrogenase의 複雜한 生化學

Table 4. Comparison of the effectiveness of indigenous soybean rhizobia between soybean cultivars

Cultivar ^{c/}	Fresh nodule mass (g/plant)	TNA (nmole C ₂ H ₄ /plant/hr)	SNA (nmole C ₂ H ₄ /nodule/hr)	Nitrate reductase activity	
				Aerobic assay (μmole NO ₂ ⁻ /mg protein/hr)	Anaerobic assay
1. Dan-yeup	1.02 ± 0.03 ^{a/}	235.8 bc	231.1 a ^{b/}	5.3 d	4.8 e
2. Hwang-kum	0.73 ± 0.08	320.5 ac	443.3 a	11.5 bc	13.6 b
3. Hill	0.80 ± 0.05	347.9 ac	439.0 a	6.6 cd	8.4 cd
4. Jang-yeup	0.88 ± 0.05	488.9 a	555.6 a	4.7 d	6.2 de
5. Kwang-kyo	1.11 ± 0.30	423.6 ab	437.5 a	8.4 cd	10.7 bc
6. Kang-rhim	0.60 ± 0.19	241.7 bc	457.0 a	21.0 a	20.3 a
7. Nam-cheon	0.44 ± 0.00	288.6 bc	658.5 a	15.3 bc	12.8 b
8. Akisirome	0.74 ± 0.03	255.0 bc	341.1 a	15.1 b	13.1 b
9. Suweon-117	0.53 ± 0.20	267.8 bc	653.1 a	8.3 cd	7.2 be
10. Jung-weon	0.28 ± 0.04	197.0 c	765.3 a	12.5 bc	13.4 b

^{a/} Values ± standard error of the mean of two replicates.

^{b/} Cultivars followed by the same letter were not significantly different at the 0.005 level probability using Durcan's Multiple Range test.

^{c/} Cultivar # 1-9; soybean host plant, cultivar #10; bean host plant.

的 過程¹⁵⁾을 거쳐 大氣중의 不活性 窒素를 ammonia로 轉換시키므로서 植物이 利用하게 된다. kucas 等¹⁶⁾은 大豆 根瘤의 bacteroid 抽出液에서 nitrogenase의 活性은 還元前과 ATP-generating system 으로서 sodium hydrosulfite를 要求하나, 이것 代身에 β -hydroxybutylate, β -hydroxybutylate dehydrogenase, NAD⁺, benzylviologen 및 methy viologen을 電子供與體로서 使用할 수 있다고 하였다. 한便 Werner 等³⁸⁾은 大豆根瘤에서 窒素固定力의 活性이 가장 강한 時期에는 bacteroid의 細胞중에 amyloplast의 量이 增加하고, mitochondria가 커지면서 ATP 消費量이 增加되는 것을 볼수 있었다고 하였다. Fawcett¹⁰⁾은 높은 energy 轉換과 關聯하여 bacteroid에서 poly- β -hydroxybutylate의 蓄積을 確認한바 있고, Paou 等²⁹⁾은 根瘤 中央部의 bacteroid는 다른 部分의 bacteroid 것보다 8~10 배의 높은 아세틸렌 還元力과 hemoglobin의 含量도 많았다고 報告한바 있다.

以上の 報告等으로 미루어 보아 品種間의 共生效率이 다른것은 品種固有의 nod gene과 nif gene의 遺傳的 및 生化學的 特性의 差異에서 온 것으로 解釋되며 이 結果는 kucas 等¹⁶⁾의 報告와 一致하는 傾向이었다. 宿主植物의 品種 對 菌株間에는 特殊한 相互關係가 있음을 물론 大豆 品種間 菌株의 根瘤形成에 關한 親化性이 다르다는 點을 考慮하여 有效한 菌株를 選擇하여야 할 것으로 생각된다.

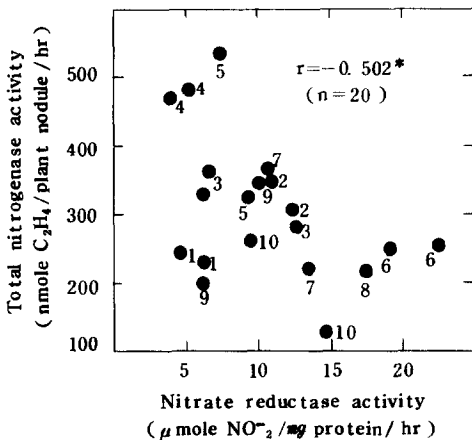


Fig. 2. The relationship between total nitrogenase and nitrate reductase activity of *Rhizobium* bacteroids under aerobic assay conditions.

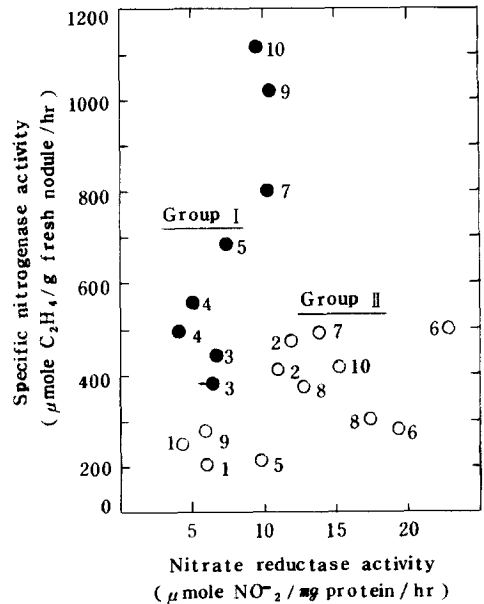


Fig. 3. The relationship between specific nitrogenase and nitrate reductase activity of *Rhizobium* bacteroids under aerobic assay conditions.

窒素固定力과 bacteroid의 窒酸還元酵素 活性과의 相互關係를 表 4 과 그림 2에서 보면 TNA와 窒酸還元酵素的 活性과는 有意한 負의 相關關係를 보이고 있어 植物體當 着生한 根瘤의 窒素固定力이 많았던 品種일수록 오히려 窒酸還元酵素的 活性은 낮게 나타났다.

그러나 SNA와 窒酸還元酵素的 活性은 一定한 相關關係를 볼수 없으나, 品種間에 2가지 型으로 分類할 수 있었다(그림 3). 卽 Group I는 specific nitrogenase 活性差異는 크지만 nitrate reductase 活性은 거이 一定한 型으로서, Hill, 長葉, 光敎 等の 大豆品種이 여기에 屬하였고, Group II는 SNA는 적으나 nitrate reductase 活性이 큰 大豆品種으로는 短葉, 黃金, Akisirome, 光林 等이 이 類型에 屬하였다. nitrate reductase는 bacteroid 내에서 顯著하게 볼수 있는 酵素로서 嫌氣的으로 增菌한 條件下에서는 이들 活性이 上昇한다고 報告된 以來, 豆科根瘤菌의 窒素固定力에 미치는 窒酸 및 窒酸還元の 中間產物인 亞窒酸의 效果에 關한 研究報告가 있다.^{21, 28, 30)} 이와 關聯하여 窒酸還元酵素的 活性과 豆科 根瘤菌의 窒素固定力과의 相互關係는 2가지로서 첫째는 地上部에서 NO₃⁻의 還元

에 의한 光合成 能力의 阻害, 들쭉는 bacteroid의 窒酸還元酵素에 의한 NO_2^- 의 生成으로 根瘤의 活成은 阻害하나, 根瘤菌을 純粹培養한 條件에서 窒酸이 直接的으로 影響을 주지 않지만 亞窒酸은 이들 酵素結合體와 hemoglobin의 作用을 阻害하여 窒素固定 過程을 防害하는 것으로 알려져 있다.^{6, 15, 20)} 根瘤菌의 窒素固定效率는 bacteroid와 hemoglobin 含量과 specific nitrogenase 活性과 關係가 있으며,²⁾ 이 酵素는 2가지의 蛋白質 構成體 Mo-蛋白質의 Subunit에서 發現되고, 또한 窒酸還元酵素도 窒素固定酵素와 같이 Mo-蛋白質의 Subunit에 共有할지도 모르기 때문에⁸⁾ 그림 3에서 SNA의 增加와 同時에 NRA의 增加를 수반하는 Group II의 反應이 正常的인 兩酵素의 活性反準일 것으로 생각되나 實際적으로 大豆根瘤菌과 宿主植物과의 窒素固定效率面에서 SNA는 높고 NRA는 낮은 Group I의 菌株選拔이 좋을 것으로 생각된다.

摘 要

前報에 이어 土壤別 土着大豆根瘤菌의 分布, 窒素固定效率 및 Nitrate reductase 特性을 비롯하여 同一한 土壤條件에서 土着大豆根瘤菌과 大豆品種別 親和性を 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 土着根瘤菌중 大豆根瘤를 形成할 수 있는 土着大豆根瘤菌은 $0.9 \sim 42.4 \times 10^3$ cells/g soil 範圍로서 土壤間에 相異하였고 特히 石灰岩土壤에서 菌密度가 높았다.
2. 土壤別 窒素固定效率는 大豆連續栽培地 및 石灰岩土壤에서 높았으며, 土着根瘤菌數가 많았던 土壤에서 窒素固定效率도 많은 傾向이 있다.
3. 大豆根瘤의 bacteroid에서 窒素固定酵素와 窒酸還元酵素와의 相互關係에서 TNA와 NRA間에는 有意한 負의 相關關係($r = -0.52^*$)를 보였으나 SNA와 NRA과는 大豆根瘤의 分離源間에 2個群으로 區分되었다.
4. 同一한 土壤條件에서 土着大豆根瘤菌과 大豆品種間 親和성은 品種間에 相異하였으며 窒素固定效率이 높았던 品種은 長葉 및 光敎로 나타났다.

引 用 文 獻

1. Beadle, N.C. 1964. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 893:

273.
 2. Bergersen, F.J. 1974. In the biology of nitrogen fixation. A. Quispel, ed. (North-Holland), Amsterdam, pp. 474-498.
 3. Bishop, P.E., and F.B. Dazzo. 1977. Intergenetic transfer for genes involved in the Rhizobium-legume symbiosis. Science 198: 938-940.
 4. Boonkerd, N., D.F. Weber, and D.F. Bezdicsek. 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybean grown in Rhizobia-populated soil. Agron. J. 70: 547-549.
 5. Brockwell, J., A. Grassia, and A.C. Robinson. 1975. Use of wild soybean as a test plant in dilution-nodulation frequency tests for counting *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem., 7: 305-311.
 6. Daniel, R.M., and C.A. Appleby. 1972. Anaerobic-nitrate, symbiotic, and aerobic growth of *Rhizobium japonicum*. Biochem. Biophys. Acta., 275: 347-354.
 7. Dughri, M.H., and P.J. Bottomely. 1984. Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *trifolium subterraneum* L. soil Biol. Biochem., 10: 405-411.
 8. Evans, H.J., and S.A. Russel. 1971. Physiological chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legume. In the chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. Edited by J.R. Postgate, Plenum Press. London. pp. 191-244.
 9. Evans, H.J. 1954. Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from soybean nodules. Plant Physiol., 29: 298-301.
 10. Fawcett, D.W. 1966. An atlas of fine structure, the cell, its organelles and inclusions. PLS.
 11. Fisher, R.F., J.K. Tu. and S.R. Long. 1985. Conserved nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. Appl. Environ. Microbiol., 19: 1432-1435.
 12. Goa, J. 1953. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5: 218.
 13. Hiltbold, A.E., R.M. Patterson, and R.B. Reed.

1085. Soil population of *Rhizobium japonicum* in a cotton-corn-soybean rotation. Soil Sci. Soc. Am. J., 49: 343-348.
14. Kamberger, W. 1977. Regulation of symbiotic nitrogen fixation in root nodule of alfalfa (*Medicago sativa*) infected with *Rhizonium meliloti*. Arch. Microbiol., 115: 103-108.
15. Kennedy Jr., J. Rigaud, J.C. Trinchant. 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: Enzyme characteristic and possible interaction with nitrogen fixation, Biochem. Biophys. Acta., 397: 24-35.
16. Klucas, R.V., B. Koch, S.A. Rusell, and H.L. Evans. 1968. Purification and some properties of nitrogenase from soybean (*Glycine max* M.) nodule. Plant Physiol., 43: 1906-1912.
17. Kohl, D.H., G. Shearer, and J.E. Harger. 1980. Estimates of N₂ fixation based on differences in the natural abundance of ¹⁵N in nodulating and non-nodulating soybean. Plant Physiol., 66: 66-75.
18. 廣田 幸敬. 1981. 生物窒素固定の遺傳工學. 講談社, サイエンスライブラリー p.77-79.
19. Long, S.R., W.E. Bulkma, and F.M. Ausubel. 1982. Cloning of *Rhizonium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. Nature 298: 485-488.
20. Manhart, J.K., and P.P. Wong. 1979. Nitrate reductase activities of Rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. Can. J. Microbiol., 25: 1169-1174.
21. Manhart, J.R., and P.P. Wong. 1980. Nitrate effect on nitrogen fixation (Acetylene reduction): Activities of legumes root nodules induced by Rhizobia with varied nitrate reductase activity. Plant. Physiol., 65: 502-505.
22. Middlebrook, J.L., and R.B. Dorland. 1984. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. Appl. Environ. Microbiol., 48: 199-221.
23. Moawad, H.A., W.R. Ellis, and E.L. Schmidt. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybean. Appl. Environ. Microbiol., 47: 607-612.
24. Nicholas, D.J.D., and A. Nason. 1957. In method in enzymology. Vol. 3. (ed) Colowick, S.P., and N.O. Kaplan. Acad. Press. New York. pp. 981-984.
25. Nutman, P.S. 1969. Symbiotic nitrogen fixation: legume nodule bacteria. pp. 179-181. Rothamsted Exp. Stn. Rep. for 1968. Part 2. Chaucer press, Suffolk, England.
26. 中村道徳. 1979. 生物窒素固定. 日本學會出版 センター pp. 165-174.
27. 中西弘. 1981. 微生物と資源. 日本微生物資源利用研究会 4: 7-16.
28. Oghorhorie, C.G.O., and J.S. Pate. 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). In T.A. Lie, E.G. Mulder, eds. Biological nitrogen fixation in natural and Agricultural habitats, Plant Soil Spc. Vol. Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 185-202.
29. Paau, A.S., J.R. Cowies, and D. Raveed. 1978. Development of bacteroids in alfalfa (*medicago sativa*) nodules. Plant Physiol., 62: 526-530.
30. Pagan, J.D., W.R. Scowcroft, W.F. Dudman, A.H. Gibson. 1977. Nitrogen fixation in nitrate reductase-deficient mutants of cultured rhizobia. J. Bacteriol., 129: 718-723.
31. 柳震彰, 李相奎, 李赫浩, 洪鍾雲, 趙武濟. 1982. 大豆根瘤菌の窒素固定에 관한 研究. 1. 大豆根瘤菌의 窒素固定量. 韓國土肥誌 15: 277-282.
32. Shibles, R.M., I.C. Anderson, and A.H. Gibson. 1975. Soybean, in crop physiology (edited by L.T. Evans) pp. 151-189. Cambridge Univer. Press, London.
33. Streeter, J.C. 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied in with nitrate. Plant Physiol., 69: 1429-1434.
34. Streeter, J.C., and P.J. Devine. 1983. Evaluation of nitrate reductase activity in *Rhizobium* activity. Appl. Environ. Microbiol., 46: 521-524.
35. Trinchant, J.C., and J. Rigand. 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids.

- Arch. Microbiol., 124: 49-54.
36. Wacek, T.J., and W.J. Brill. 1976. Simple, rapid assay for screening nitrogen-fixing ability in soybean. *Crop Sci.*, 16: 519-524.
37. Weaver, R.W., and L.R. Frederick. 1974. Effect of inoculum rate competitive nodulation of *Glycine max* (L.) marrill: II. Field studies. *Agron. J.*, 66: 233-236.
38. Werner, D., and E. Morschel. 1978. Differentiation of *Glycine max.*: Ultrastructural studies of plant cells and bacteroids. *Planta.*, 141: 169-177.
39. Wilson, J.K., and T.L. Lyon. 1926. Growth of certain microorganisms in planted and unplanted soil. Cornell Univer. Agric. Exp. Stn. Memoir. 103. Ithaca, NY.