

방사능동위원소 P-32를 이용한 작물 인산 영양 진단법

유장걸 · 송성준

Phosphorus-status diagnosis of the crop plant using
P-32 bioassay technique

Zang-Kual U., and Sung-Jun Song

Summary

P-32 bioassay for determining P-nutritional status of plant is based on the uptake rate of P-32 labelled phosphorus by roots. This study was carried out to investigate the possibility of its applicability in diagnosing the phosphorus nutritional status of crop plants.

The method was examined using barley grown in the sand culture and in the pot culture supplied with the different P levels. There was a negative exponential relationship between phosphorus uptake by barley root and the concentration of phosphorus supplied previously in the sand culture and in the pot culture. P-32 uptake by barley root was markedly inhibited by $5 \times 10^{-3} M$ KCN in the bioassay solution, indicating that uptake was metabolically mediated.

P-32 uptake by barley root showed a good correlation with dry matter, fresh weight, shoot length and P content of shoot while soil available P did not. This fact suggested that the determination of soil available P was not suitable for the P-status diagnosis of plant.

The results showed that the P-32 bioassay could be applied for the phosphorus nutrition diagnosis of the annual crop like barley and had some advantages: being more rapid and easier than the chemical analysis of leaves or soils.

서론

작물의 영양상태를 신속, 정확하게 파악하는 것은 작물의 비배관리를 위해서 제일 중요

한 것이며, 수량과 경제성 제고에 가장 근본적 요소가 된다. 작물의 영양진단 방법으로 현재까지 사용되고 있는 것은 경험에 의한 달관법, 엽분석 및 식물체 분석법 그리고 토양중의 유효한 양분을 정량하는 방법 등을 들

수 있다. 그러나 달관법은 오랫동안 경험과 기술을 요구하면서도 정확도가 낮으며 식물조직의 화학분석은 시간이 걸릴 뿐 아니라 식물체내의 함량이 저하된 상태에서는 이미 양분 결핍에 의한 손상을 입은 후가 되기 때문에 예방에는 별 도움이 안된다. 또 토양분석의 경우도 분석치와 식물체내 영양상태의 상관성에서 불명확한 점이 많기 때문에 신뢰도가 문제되고 있다. 이같은 점을 감안해서 최근에는 식물의 생리적인 반응(양분 stress, 광합성능, 효소 활성)을 이용하여 영양상태를 진단하는 방법이 많이 시도되어 지고 있다 (1). 특히, Harrison 등이 산림의 영양진단을 위해 개발한 P-32 bioassay법(3, 4, 5, 6, 7)은 인산양분의 영양상태(stress)에 따라 뿌리를 통해서 흡수되는 P-32 양이 다르다는 점을 이용했기 때문에 생리적인 양분 요구도를 파악할 수 있다는 장점이 있고 진단법이 간편 신속하므로 시기 적절한 양분공급도 가능하다는 특징이 있다.

따라서 본 실험에서는 P-32 bioassay 방법을 작물의 인산영양진단에 응용하고자 인산수준을 달리하여 사경과 토경에서 재배한 맥주 보리를 공시 재료로 하여 처리한 인산수준과 식물 뿌리에 의한 흡수력, 식물체내 인산 함량 그리고 토양중의 유효인산함량 간의 상관관계를 조사했다.

재료 및 방법

1. 사경재배

제주도 농촌진흥원으로부터 공급받은 맥주 보리(*Hordeum distichum*) 종자를 0.5% 차아 염소산나트륨용액에 넣어 15분간 표면 살균을 하고 증류수로 3회 세척한 뒤, petri dish에 넣어 25°C 항온기에서 발아시켰다. 발아가 잘된 것만을 골라 석영모래를 담은 플라스틱 pot에 이식하여 growth cabinet

(25°C, 50,000 lux)에서 5주간 사경재배를 한 뒤 그 뿌리를 채취하여 P-32 bioassay를 실시하였다. 영양액은 Knop 수경용액(15)을 기본으로 하여 P의 수준만 0, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ppm으로 달리하여 3일 간격으로 공급하였다.

2. 토경재배

사경재배방법과 동일하게 보리종자의 표면 살균을 시킨 후 발아가 양호한 개체만을 골라 제주대학교 근처의 화산회 갈색 토양(오라동) (14) 1kg이 담긴 플라스틱 pot에 옮겨심어 야외에서 12주간 재배하였다. 이 때 질소와 가리는 관용시비량(4kg N/10a, 6kg K₂O/10a)으로부터 pot당(1kg 토양함유) 소요되는 시비량을 계산하여 질소인 경우 33.3mg N/pot을 가리인 경우 50.0mg K₂O/pot을 각각 공급하였다. 인산의 경우는 처리구별로 시비수준을 달리해서 0, 22, 43, 64, 86, 117, 159, 269, 477, 807 mg P/pot을 공급하였다.

3. P-32 bioassay

사경 또는 토경에서 재배된 보리 뿌리를 채취하여 수돗물에서 뿌리 표면에 부착된 모래 또는 흙을 잘 씻었다. 뿌리의 보관 또는 세척으로 인하여 약해진 원형질막의 안정성을 높이고, 자유공간내의 인을 제거키 위해 fig.1과 같이 5×10^{-4} M CaSO₄ 용액에 30분 동안 담갔다. 그런 다음, 뿌리를 꺼내어 5×10^{-4} M CaSO₄, 5×10^{-6} M KH₂PO₄와 P-32(60 uCi)용액이 들어 있는 비이커로 옮겨 정확히 15분 동안 P-32를 흡수시켰다. 그 후 뿌리 표면에 있는 P-32를 제거키 위해 흐르는 수돗물에서 정확히 5분간 뿌리를 세척하였다. 여기서 약 200mg 정도의 세균을 위해 증류수 15ml를 포함하는 계측병에 넣고 액체섬광계수기(BF 8000, Berthold)를 사용(Cerenkov effect)하여 방사능을 측정(측정치=X₁)하였다. 그 후 P-32를 흡수시킨 뿌리의

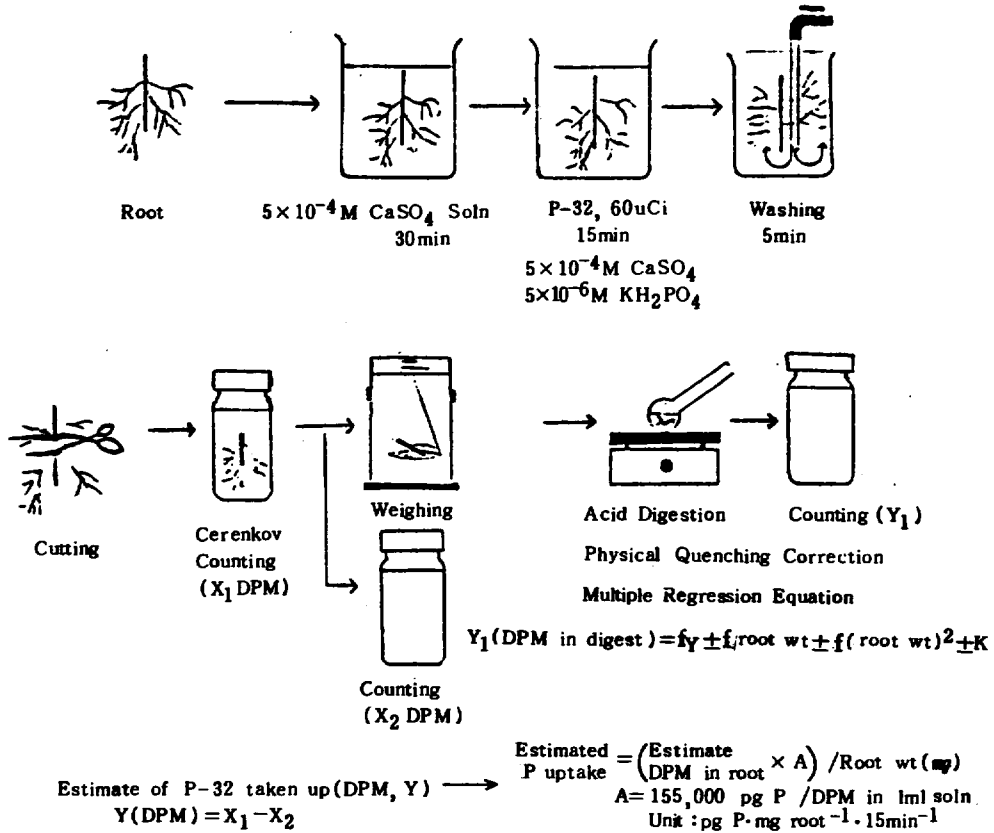


Figure 1. Flow Diagram of P-32 Bioassay

자유공간내에 들어 있는 P-32의 양 (대사적으로 흡수되지 않는 양)을 산정키 위해 상기 뿌리와 증류수를 함유한 계측병을 상온에서 12~16 시간 방치시킨 후 계측병 속에 있는 뿌리를 핀셋으로 꺼낸 뒤 다시 방사능을 계측 (측정치= X_2) 하였다. 또한, 꺼낸 뿌리는 그 표면에 묻어 있는 수분을 흡습지로 제거한 뒤 생체중 (생체중= X_3)을 달았다. 한편, 뿌리에 흡수된 방사능을 측정하기 위해서는 매 시료마다 산분해를 시켜야 되므로 시간, 노력, 시약의 소모가 워낙 크다. 따라서 상기 방법은 뿌리를 분해시키지 않고 측정한 뒤 뿌리 때문에 생기는 방사능의 소멸 (physical quenching)

을 보정하여 줌으로써 실제 뿌리내에 흡수된 방사능 양을 알아내는 것이다. 즉 뿌리내에 흡수된 방사능 양 (DPM)과 biomass 등이 다양한 범위에 들도록 명량된 뿌리를 취하여 켈 달플라스크에 넣고 산분해 (H_2SO_4 와 H_2O_2)시킨 후 이를 계측병에 옮겨 방사능을 측정 (측정치= Y_1) 하였다. 그런 다음, 뿌리를 산분해시킨 후 측정된 방사능의 양 (Y_1), 뿌리를 분해시키지 않은 채 측정한 방사능의 양 ($X_1 - X_2$), 뿌리의 생체중 (X_3), 뿌리의 생체중의 계급 (X_4) 간에 다중회귀를 구하여 이를 보정 하였다. [$Y = X_3 - 7764 + 1.18 (X_1 - X_2) + 195 X_3 - 0.43 X_4$ ($R^2 = 84.0\%$)] 또한, 뿌리에

의해 대사적으로 흡수된 P 양 (amount of P uptake)은

$$= \frac{\text{대사적으로 흡수된 P-32 양} (X_1 - X_2) \times A}{\text{뿌리 생체중} (X_3)} \quad \left(\text{단위: pg P/mg root/15min.} \right)$$

(여기서, A = 155,000 pg P/DPM in P-32 labelled solution) 으로 나타내었다 (7).

4. 화학분석

1) 식물체중 인산 함량: 80°C에서 건조된 보리의 지상부를 1.0mm 크기로 분쇄한 뒤 1g을 취하여 H₂SO₄와 H₂O₂로 분해시킨 뒤 ammonium molybdate 법으로 비색 정량하였다 (16).

2) 토양 유효 인산: 풍건한 후 1mm체를 통과시킨 토양 3g과 Bray No.1 침출액 (0.03 N NH₄F + 0.025 N HCl) 21ml를 가하여 정확히 1분을 진탕한 후 여과하여 여액을 SnCl₂와 ammonium molybdate 용액으로 발색시킨 후 비색 정량하였다 (13).

5. 대사저해제의 영향

P-32 bioassay 법이 생리적 대사에 의해서만 흡수되는 것을 고려한다는 증거를 조사하기 위해 5 × 10⁻³ M cyanide를 처리하여 시간 별로 흡수된 P의 양을 조사하였다 (12).

결 과

1. P-32 bioassay 실험조건 검토

Harrison 등에 의해 개발된 P-32 bioassay 법을 작물의 영양진단에 도입하고자 우선 사경에서 재배된 맥주보리 뿌리를 이용하여 bioassay 실험조건 (P-32 흡수시간, 대사저해제의 영향 및 채취후 뿌리의 보관시간)에 대해 검토하였다.

Fig. 2는 흡수경과시간에 따른 P-32 흡수량을 나타낸 것이다. 시간이 지남에 따라 P-32 흡수량은 점점 증가되는 경향이나 인을 전혀 공급하지 않은 상태에서 재배한 보리에서 채취한 뿌리가 50ppm 공급한 것보다 훨씬 많이 흡수되고 있다. 또한, 흡수시간을 20분이 상 주었을 때 흡수된 P-32 양간의 반복 차가 커지고 있다. 따라서 보리의 bioassay를 위한 적정흡수시간은 20분 이내로 택하는 것이 타당하다고 생각된다. Harrison 등의 경우도 lodgepole pine과 sitka spruce stands 등에서 그 흡수시간을 15분으로 정하여 실험한 바 있다 (3).

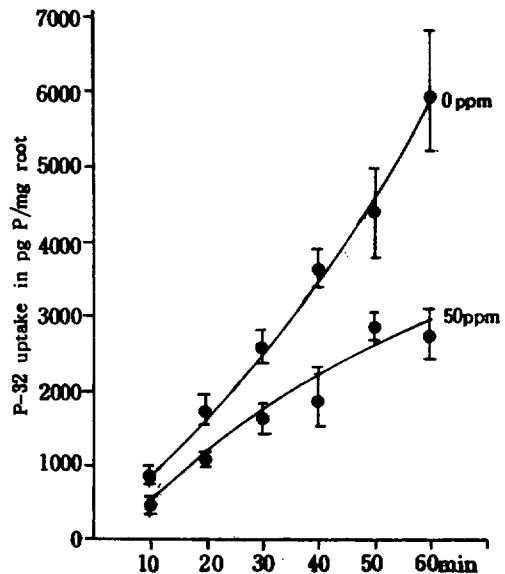


Figure 2. The kinetics of P-32 uptake by excised roots of *Hordeum distichum* according to time course.

The P concentration in the sand culture was 0 and 50ppm respectively.

P-32 bioassay 법은 식물의 생리대사적 요구에 의해 흡수 (능동흡수) 되는 양을 산정하는 것이다. 따라서 자유공간내로 확산되는 양

을 알아보고자 $10^{-3}M$ KCN을 처리하였다. table 1에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 도 불구하고 물리적인 흡수(수동흡수)는 거의 증가되지 않았고 능동흡수되는 양의 3-4.5%에 불과하므로 bioassay 법은 능동흡수 되는 양만을 고려한다는 것을 알 수 있다(12).

Table 1. Effect of potassium cyanide on the P-32 uptake of the roots excised from *Hordeum distichum* grown in the sand culture. The P concentration level in the sand culture was 20ppm.

Reaction time (min)	P-32 uptake in pg P/mg root /15min \pm SE	
	Control	KCN addition
15	1,231 \pm 105	55.3 \pm 13.1
30	1,669 \pm 77	72.6 \pm 14.3
50	3,783 \pm 473	106.5 \pm 4.5

한편, P-32 bioassay를 하기 위한 뿌리시료는 포장에서 채취 즉시 마르지 않도록 젖은 가아제 등으로 잘 싸서 실험실로 운반한 뒤 bioassay를 실시하게 된다. 포장에서 채취한 절단근은 시간이 경과함에 따라 세포의 생존력이 떨어져 bioassay에 영향을 줄 것이라 생각되었으나 시료 채취후 48시간이 경과될 때까지도 흡수되는 P-32 양은 거의 비슷하였다 (fig.3). 그러므로 시료채취 장소가 멀고 채취할 시료양이 많은 경우에는 시료 채취 일과 bioassay 실험 수행일을 나누어 행하여도 bioassay에 크게 영향을 주지 않는다고 생각 된다.

2. 맥주보리의 사경재배와 뿌리의 bioassay

인 공급수준을 달리하여 맥주보리를 5주간 사경재배한 결과 사경액중의 인 농도가 증가함에 따라 보리의 초장, 생체중, 그리고 건물

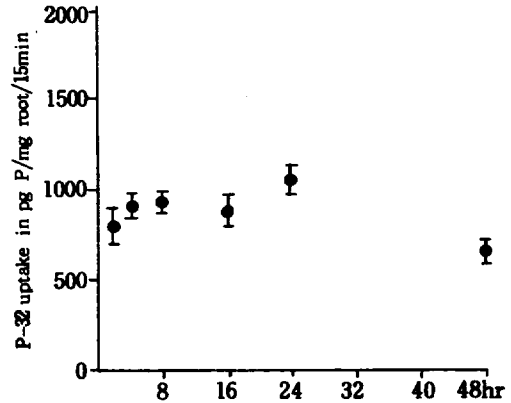


Figure 3. P-32 uptake by root excised from *Hordeum distichum* influenced by the elapsed time after root sampling. The P concentration in the sand culture was 50ppm.

중이 모두 증가함을 보였다 (table 2). 또한, 이와 같은 조건에서 재배된 뿌리를 채취하여 bioassay한 결과를 보면 (fig.4) 인 공급수준과 흡수된 P-32 양 간에는 지수적 역상관($R^2=86.5\%$)을 보였다. 또한, P-32 흡수량은 식물체의 화학분석을 통해 얻은 인 함량($R^2=86.5\%$) (fig.5)과 건물량($R^2=92.2\%$) (fig.6)간에도 지수적인 역 상관을 나타내었다.

Table 2. Effect of P-concentration levels on the growth of *Hordeum distichum* in the sand culture.

Treatments	Shoot length (cm)	Fresh weight (g per shoot)	Dry weight (mg per shoot)
0 ppm	25.22	1.05	128
2.5 ppm	25.69	1.22	134
5 ppm	28.89	1.37	162
10 ppm	27.50	1.56	186
20 ppm	30.56	1.78	212
30 ppm	30.26	1.79	226
50 ppm	29.19	1.86	240
100 ppm	31.48	2.53	280
200 ppm	32.81	2.95	324

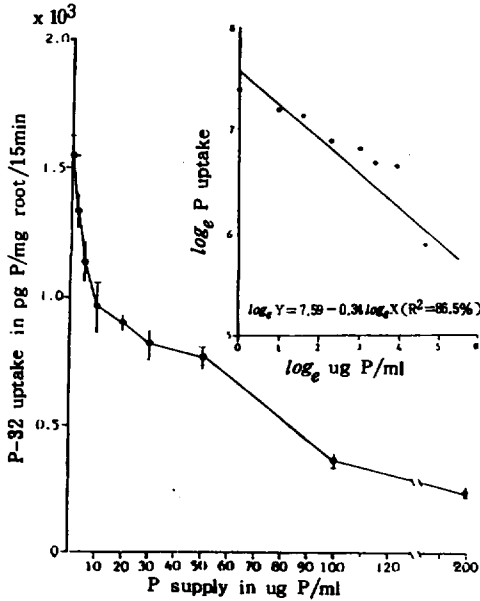


Figure 4. The relationship between P-32 uptake by the excised roots and the phosphorus concentration of the culture solution in which *Hordeum distichum* had previously

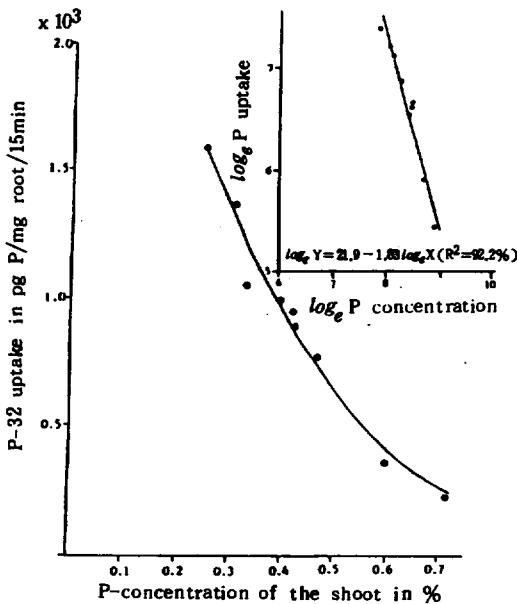


Figure 5. The relationship between P-32 uptake by the excised roots and the phosphorus concentration of the shoot of *Hordeum distichum*.

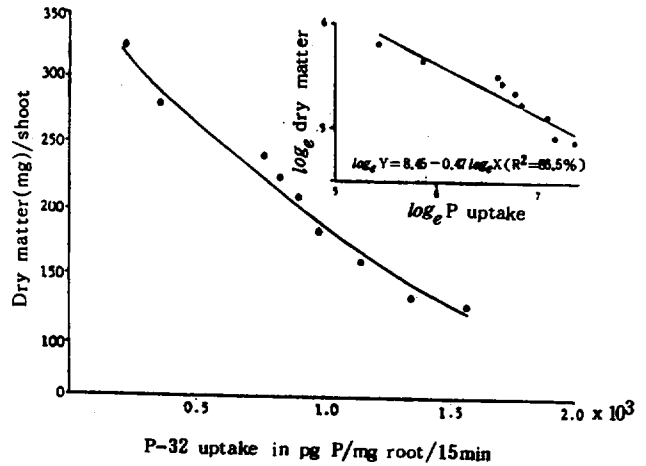


Figure 6. The relationship between the dry matter of *Hordeum distichum* and the phosphorus uptake by excised roots.

이러한 결과는 Harrison 등이 birch를 사경제배한 뒤 bioassay 하여 얻은 결과와 비슷한 양상을 띠고 있으나 그 흡수되는 양은 다소 차이를 보이고 있다. 이것은 식물의 종에 따라 이온흡수 특성이 다르기 때문인 것이다.

3. 맥주보리의 토경재배와 뿌리의 bioassay

사경제배에서처럼 토경재배인 경우도 공급된 인산수준이 높아짐에 따라 초장, 생체중, 건물중이 모두 증가하였다 (table 3). 또한, 공급한 인 수준과 P-32 흡수량간에는 사경제배의 결과에서처럼 지수적 부의 상관관계를 보였다 ($R^2 = 81.3\%$), 토양내의 유효인산함량과 P-32 흡수량 사이에는 뚜렷한 경향을 보이지 않았고 그 상관계수 (R^2)도 48.5%였다 (fig.7). 한편, 시용된 인 수준이 증가함에 따라 보리지상부의 인 농도는 증가하였다 ($R^2 = 97.4\%$) (fig.8). 또한, P-32 흡수량은 식

물체의 인 함량과 높은 상관관계를 보이고 있었다 (fig.9). 그리고, 보리의 건물중은 토양내 유효인산함량보다 P-32 흡수량과 더 높은 상관관계를 나타내었다 (fig.10,11).

Table 3. Effect of the different treatments of P-fertilizer on the growth of *Hordeum distichum* on Cheju dark brown soil in the pot.

Fertilizer added(mg P/pot)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/pot)	Dry weight (g/pot)
0	11.7	0.51	0.16
22	13.6	0.86	0.29
43	17.9	1.01	0.30
64	22.9	2.30	0.65
86	30.2	2.90	0.78
117	34.6	4.64	1.13
159	50.8	12.0	3.19
269	56.6	16.2	6.45
477	58.5	23.5	8.06
807	54.8	28.2	9.67

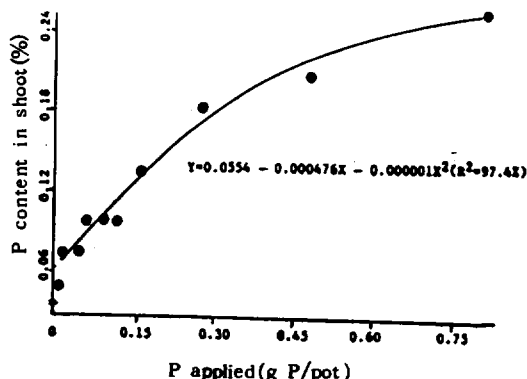


Figure 8. Relationship between the P content of shoot of *Hordeum distichum* and the rates of P application on Cheju dark brown soil.

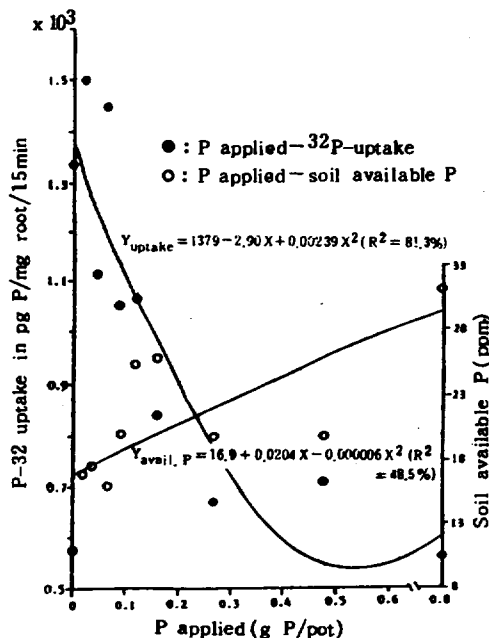


Figure 7. A comparison of P-32 uptake by *Hordeum distichum* roots and soil available P influenced by the different treatments of P-fertilizer on Cheju dark brown soil in the pot.

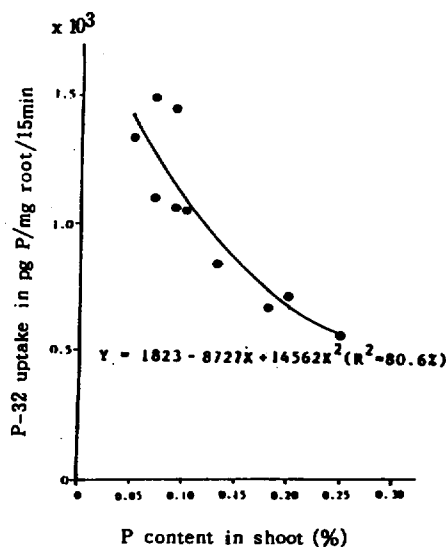


Figure 9. The relationship between P-32 uptake by the excised roots and the P content of shoot of *Hordeum distichum* grown at the different P fertilizer levels on Cheju dark brown soil in the pot.

고찰

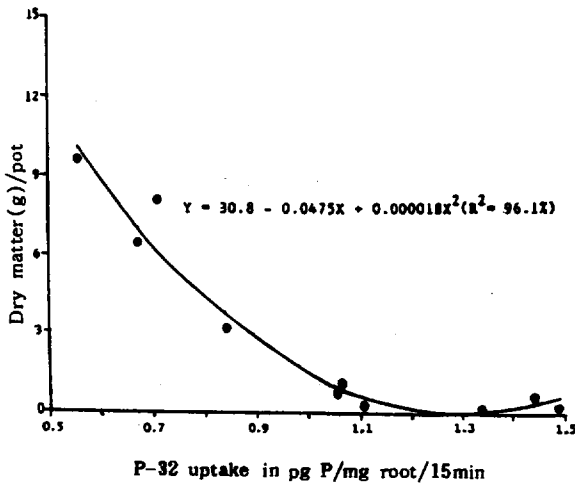


Figure 10. Relation between the dry matter and P-32 uptake by excised roots of *Hordeum distichum* grown at the different P fertilizer levels on Cheju dark brown soil in the pot.

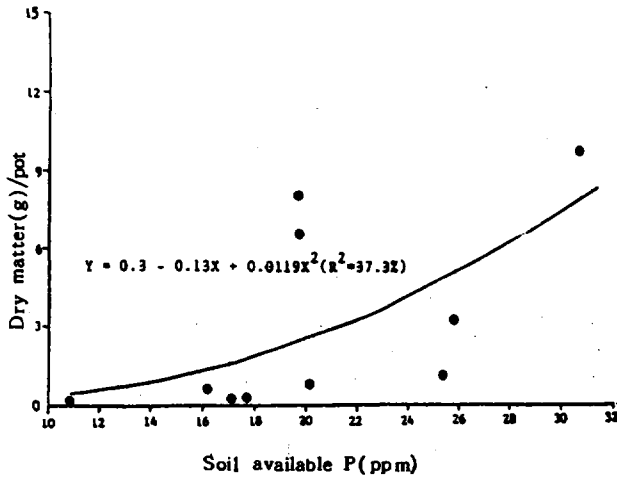


Figure 11. Relation between the dry matter of *Hordeum distichum* and the soil available P.

식물뿌리는 토양용액속에 매우 낮은 농도로 존재하는 인을 흡수하여(9) 토양용액보다 100-1,000 배 높게 세포내에 축적할 수 있다(14). 이것은 인이 농도구배에 대응하여 세포내로 흡수되는 능동흡수물 의미한다. 본 실험에서도 저해제인 KCN을 처리했을 때 수동흡수는 4% 내외에 불과하였다. 또한 인산의 흡수는 매우 신속하고 10분 후에 흡수된 인산의 80%가 식물체내 대사작용에 연루되어 유기태 인으로 변한다고 보고되고 있다(8). 한편, Loughman은 보리뿌리에 의해 흡수된 인(10 uM KH_2PO_4 로부터)의 1/3이 5초 이내 nucleotide phosphates, nucleotide diphospho-sugars와 hexose phosphates으로 변한다고 보고하였다(10). 이러한 연구 결과를 미루어 볼 때 P-32 흡수시간은 20분 이내로 정합이 좋다고 생각된다.

인 농도가 다르게 공급된 사경 또는 토경에서 재배된 보리의 뿌리 bioassay는 공급된 인 수준에 따라 흡수되는 P-32 양도 지수적 역상관을 보여 Harrison 등(3)의 lodgepole pine와 sitka spruce strands 경우에서와 같은 경향을 나타내고 있으나 흡수되는 양은 서로 달랐다. 따라서 본 방법을 작물이나 파수 등에 이용하기 위해서는 그 종 또는 품종마다 공급된 시비량에 따라 P-32 흡수 양상을 조사하여야 할 것으로 사료된다.

또한, 인 공급수준과 보리지상부내의 인 함량 그리고, P-32 bioassay 간에도 높은 상관성을 보이고 있다. 따라서 보리와 같은 일년생 작물인 경우 엽분석법이나 bioassay 중 어느 한 방법을 사용해서 영양진단을 실시해도 그 결과는 비슷할 것으로 기대된다.

반면에, 영년생 작물의 경우 가지에 이미 많은 양분을 함유하고 있기 때문에 토양에 비료를 시비해도 엽중의 그 함량 증가가 잘 관찰되지 않아서 엽분석법만으로는 수체의 영

양상태를 알아내기가 매우 힘든 편이라고 알려져 있다. 따라서, bioassay 법과 같이 직접 양분흡수에 관여하는 뿌리를 가지고 그 양분 요구도를 조사하면 좀더 구체적인 양분영양 상태(생육단계별 등)를 확인할 수 있으리라 생각된다.

또한, 열분석은 분석 과정에서 P-32 bioassay 보다 시간, 시약, 노력이 많이 소요된다는 단점도 있다.

한편, 토양중의 유효인산측정법과 본 bioassay 법을 비교하면 토경배시 pot에 시비된 인 수준이 증가함에 따라 토양내 유효인산량은 뚜렷한 증가를 보이지 않는 반면에 P-32 흡수량은 점점 감소되는 경향을 보였다. 또한, 식물의 건물중은 토양의 유효인산 함량보다 bioassay 결과와 더 좋은 상관성을 보였다.

따라서 토양중의 유효인산함량을 측정하여 식물에 대한 인공급 여부를 결정하는 방법은 개선해야 될 것으로 사료된다.

적 요

P-32 bioassay 는 식물체의 인산영양상태와 뿌리에 의한 인산흡수속도가 지수적인 상관성을 갖는다는 원리를 이용한 것이다. 따라서 본 연구는 이러한 P-32 bioassay 법을

작물의 인산영양상태를 진단하는 방법으로 응용하기 위해 요구되는 여러가지 조건을 검토함과 동시에 필요한 기초 자료를 얻기 위해 수행되었다.

1. 인산수준을 달리하여 공급한 사경에서 6주 동안 재배한 맥주보리의 뿌리를 채취하여 P-32 로 표지한 $5 \times 10^{-6} \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ 에서 15분 동안 반응시켰을 때 대사적으로 흡수된 양과 공급된 인산 수준과는 지수적인 역상관을 나타내었다.

2. 10^{-3} M KCN 을 처리했을 때 인산흡수량이 현저히 감소되는 것으로 보아 인산흡수가 능동적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

3. 인산수준을 달리 공급한 토경에서 재배된 맥주보리의 뿌리에서도 대사적으로 흡수된 양과 공급된 인산 수준간에 지수적인 역상관을 보였다.

4. 수준을 달리하여 공급한 인산 양은 P-32 bioassay 와 열분석 결과와 높은 상관성을 나타냈으나 토양유효인산과는 비교적 낮은 상관성을 보였다.

따라서 이상의 결과를 볼 때 P-32 bioassay 는 현재까지 널리 이용되고 있는 열 또는 토양분석에 비해 비교적 단시간내에 적은 노력을 가지고 작물의 생리적인 인산 요구도를 정확히 알 수 있는 방법이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bouma, D. 1983. Diagnosis of mineral deficiency using plant tests. *Encyclopedia of plant physiology*. Volume 15A. pp.120~146.
2. Bowen, G.D., and C. Theodorou. 1967. Study on phosphate uptake by mycorrhizae. XIV IUFRO-Congr., Sect. 24, München, 116~138.
3. Dighton, J., and A. F. Harrison. 1983. Phosphorus nutrition of lodgepole pine and sitka spruce stands as indicated by a root bioassay. *Forestry* 56(1) : 33~43.
4. Harrison, A. F. 1985. Effects of environment and management on phosphorus cycling in terrestrial ecosystems. *J. of Environmental Management* 20 : 163~179.
5. Harrison, A. F., and D. R. Helliwell. 1979. A bioassay for comparing phosphorus availability in soils. *J. of Applied Ecology*. 16 : 497~505.
6. Harrison, A. F., and D. J. Dighton. 1986. A root bioassay of determination of P-deficiency in commercial forest stands. *J. Sci. Fd. Agric.* 37 : 16~17(1986).
7. Harrison, A. F., J. Dighton and M. R. Smith. 1984. The phosphorus deficiency bioassay : sample and date handling procedures. Merelewood research and development paper no. 103. Grange-over-Sands : Institute of Terrestrial Ecology.
8. Jackson, P. C., and C. E. Hagen, 1960. Products of orthophosphate absorption by barley roots. *Plant physiol.* 35 : 326-332.
9. Logergan, J. F., and C. H. Asher, 1967. Response of plants to phosphate concentration in solution culture. II. Role of phosphate absorption and its relation to growth. *Soil. Sci.* 103 : 311~318.
10. Loughman, B. C. 1978. Metabolic factors and the utilization of phosphorus by plants. In: Porter, R. and Fitzimaons, D. W. (eds.) *Phosphorus in the environment : its chemistry and biochemistry*. Ciba Foundation Symposium No. 57. Elsevier, Amsterdam, pp. 155~174.
11. Mengel, K., and E. A. Kirkby, 1987. *Principle of plant nutrition*, International Potash Institute, Bern, Switzerland p. 414.
12. Michalik, I. 1974. The role of the root system in phosphorus uptake and metabolism In: Kotek, J. (ed.) *Structure and function of primary root tissue*, Slovak Acad. pp. 447~453.
13. 농촌진흥청. 토양화학분석법. pp. 99~101.
14. 농촌진흥청. 1976. 농업기술연구소. 정밀토양도. p. 7.
15. 심상철. 1975. 토양·비료, 선진문화사, pp. 107~180.
16. Yoshida, S., D. A. Forno, and J. H. Cook. 1972. *Laboratory manual for physiological studies of rice*, 2nd ed., IRRI, Philippine, pp. 13~14.