

알팔파根瘤菌의 分離 및 窒素固定能力的 比較*

崔 宇 永 · 金 聖 烈

忠南大學校 農科大學

(1978년 9월 21일 수리)

Isolation of Alfalfa Nodule Bacteria and Assesment of their Nitrogen Fixing Capacities

Woo-young Choi and Seung-yeol Kim

College of Agriculture, Chungnam University

Summary

A series of experiments was planned for practical application of *rhizobia* in grass lands in Korea. This is the report for the studies mainly on the isolation and characterization of alfalfa nodule bacteria, and on the assessment of their nodulation abilities and nitrogen fixation capacities.

1. Total number of 47 strains was isolated from nodules which were taken from alfalfa grown in Daekwanyong, Cheju and other places.

2. Morphological and cultural characteristics of the strains were studied, and attempts were also made to investigate their antigenic properties and to demonstrate lysogenic strains. The results were; i) the isolates varied in their cultural characteristics on yeast mannitol broth and agar, and in degree of congo red absorption; ii) similarities in their antigenic properties were found between the strains: SU 47/M-11, M-13/M-15, and M-3/M-5; iii) no lysogeny was found in the strains.

3. Plant infection test by test tube method in light room were carried out to elucidate the ability of the strains to nodulate Luna alfalfa and of the capacity of such nodules to fix atmospheric nitrogen. The isolates were grouped into non-invasive, ineffective, or effective to the legumes. Those strains which produced effective nodules, supporting similar/higher level of growth as nitrate control were: M-8, 9, 14, 20, 21, 25 and 34.

緒 論

根瘤菌을 純粹分離한 以來, 根瘤의 構造 및 形成過程에 미치는 物理化學的 要因 및 窒素固定機構에 관한 多數의 研究⁽¹⁴⁾와 根瘤菌의 大量生産方法⁽¹²⁾ 및 種子接種法⁽⁸⁾ 등의 研究을 通하여 荳科作物의 栽培에 應用되고 있으며 또한 根瘤菌을 長期保存할 경우에 活性的 低下 및 抗原性的 消失⁽²⁰⁾

이 憂慮되고 土壤 등의 環境條件에 따라 適應性이 크게 左右되므로 여러 나라에서는 各已 이의 生産 및 普及體制를 갖추고 있다. 筆者 등은 國內에서의 荳科牧草用 根瘤菌의 實用化를 위한 基礎研究로서 全國 各 地方으로부터 알팔파群의 根瘤菌을 分離하고 이들과 導入菌株의 根瘤形成 및 窒素固定能力을 比較하는 한편 免疫學的 性質을 檢討하고 lysogeny與否를 確認하여 그 結果를 報告하는 바이다.

*本研究은 1977年度 文敎部 學術研究助成費에 依한 것임.

實驗材料 및 方法

1. 根瘤菌의 分離

分離源: 試驗場과 牧場에서 栽培되는 알팔파에 着生한 開花期 前後의 根瘤를 分離源으로 하였다.

分離用 培地: yeast mannitol broth (YMB로 略稱)⁽¹³⁾ 및 yeast mannitol agar (YMA로 略稱)를 使用하였고 YMB plate에는 雜菌과의 識別을 容易하게 하기 爲하여 congo red⁽¹³⁾를 添加하였으며 그 400倍 水溶液을 別途로 調製하여 殺菌한 다음 培地와 混合하였다.

分離方法: Vincent의 方法⁽¹⁹⁾에 準하여 分離하였다. 即, 먼저 洗滌한 根群으로부터 上下 0.3cm 內外의 뿌리가 볼도록 切斷한 根瘤를 나일론網으로 一端을 막은 硝子管(18×180mm)속에 넣어 充分히 水洗한 後 95% ethanol에 잠시 담갔다가 다시 0.1%酸性 昇汞水(HgCl₂ 1g, conc. HCl 5ml, H₂O 1l)에 3~8分間 浸漬하여 殺菌한 後 滅菌水로 6回 以上 反復洗滌하여 表面에 殘留하는 HgCl₂를 除去하고 無菌의으로 破碎한 汁液을 YMA plate에 띄고 26°C에서 數日間 培養하면서 典型的인 根瘤菌의 single colony를 얻을 때까지 2~3回 restreaking하였다.

2. 標準菌株

호주의 C.S.I.R.O.에서 導入한 *Rhizobium meliloti* SU47을 抗體形成 및 比較 試驗에 使用하였다.

3. 生菌數의 測定

Miles & Misra의 drop plate法⁽¹¹⁾에 따랐으며 必要한 操作은 無菌의으로, 또 이에 使用한 器具 및 稀釋液은 미리 殺菌한 것을 使用하였으며 稀釋液으로서 0.85% NaCl을, 稀釋操作에는 flash mixer(東洋, Model D-7-SK 1801)를 使用하였다.

4. 抗原 抗體反應

Vincent의 方法⁽¹⁷⁾에 따랐으며 抗原과 抗體의 調製法 및 凝集反應은 다음과 같이 實施하였다.

抗原: 前述한 標準菌株을 各各 YMB에 過量 接種하여 24~28時間 培養한 다음 遠沈(2,000rpm, 4 min)시켜 不均一한 沈澱物을 除去하고 다시 遠心 沈澱시킨 後 0.85% NaCl에 均一하게 懸탁시켜 1~3×10⁹/ml의 生菌數가 되도록 調整하였다.

抗血清: 2首의 成長한 家兔(Japanese White)에 準備된 懸濁液을 1, 2, 3 및 3.5ml씩 繼續 4日

間 漸增의으로 靜脈注射한 다음 最終 注射日로부터 10日이 經過하였을때 靜脈에서 豫備的으로 少量의 血液을 採取하여 確實한 陽性反應을 나타내는 것을 다시 4日 經過後, heart puncture하여 10~15ml의 血液을 採取하였고, 採取한 血液은 37°C에서 約 1時間 靜置하여 凝固시킨 것을 細切하여 4°C에서 1夜間 靜置한 後 그 上澄液을 遠心 分離하여 얻은 澄澄血清을 2°C에서 保管하였다.

凝集反應(long agglutination test): 抗血清에 0.85% NaCl을 加하여 50, 100, 200, 400, 800, 1, 600, 3, 200 및 6, 400倍로 稀釋하여 1ml Dreyer 試驗管에 各各 0.5ml씩 分注한 다음 여기에 100°C에서 30分間 加熱하여 얻은 somatic antigen⁽¹⁰⁾ 0.5ml을 加하여 52°C의 水槽中에서 保溫하면서 經時的으로 凝集形態를 saline control과 比較 觀察하였다.

5. Lysogeny 試驗

Schwinghamer⁽¹⁶⁾ 등의 變法에 準하였으며 供試菌株을 yeast sucrose (phage) broth⁽¹⁹⁾에 培養한 것을 注射器에 連結한 millipore filter (Sartorius, 0.4μ)로 濾過하고 그 濾液을 他菌株과 交互的으로 yeast sucrose agar plate 當 8株씩 cross-streaking하여 26°C에서 培養하면서 交叉點 以後의 lysis與否를 確認하였다.

6. 根瘤形成試驗

種子處理: *Medicago sativa* var. Luna의 精選한 種子를 水洗하고 95% ethanol에 잠시 담갔다가 꺼낸다음 0.2% 酸性昇汞水 중에 3~8分間 浸漬, 殺菌한 後 滅菌水로 充分히 洗滌하여 殘留의 HgCl₂를 除去하고 滅菌해준 petri dish內의 젖은 濾紙上에 無菌의으로 옮겨 18°C에서 發芽시켜 크기가 均一한 것을 2本씩 培養容器內의 培養基上에 移植하였다.

培地(seedling agar): Jensen⁽⁵⁾의 處方에 따라 調製하였으며 CaHPO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 0.2g, Mg SO₄·7H₂O 0.2g, NaCl 0.2g, FeCl₃ 0.1g, water 0.1l에 寒天 9.0g 을 添加하였고 微量元素로서는 B(H₃BO₃로서 0.05%), M₀(Na₂M₀O₄·2H₂O로서 0.005%), Zn(ZnSO₄·7H₂O로서 0.005%), Mn(MnSO₄·H₂O로서 0.05%) 및 Cu(CuSO₄·5H₂O로서 0.002%)를 含有하는 原液⁽²⁾을 別途로 調製하여 Jensen培地 1l當 1ml씩을 添加하였으며 窒素施用無接種區에는 KNO₃를 0.05%(窒素로서 約 70ppm) 添加하였고 培地의 最終 pH는 6.5~7.0 이 되도록 調整하였다.

培養用器 : aluminium cap을 덮은 25×250mm의 試驗管에 40ml의 培地를 注入하여 使用하였으며 反復數는 5個以上이 되도록 하였다.

菌株의 接種 : 抗原調製時와 同一한 方法으로各 菌株를 液體培養하여 植物의 移植과 同時에 0.5ml씩을 接種하였다.

培養條件 : 溫度調節 및 照明施設을 具備한 室內에서 培養하였으며 各 反復容器는 任意로 分散配置하여 24時間 間隔으로 그 位置를 循環시켰다. 螢光燈, 水銀燈 및 白熱燈을 混用하여 1,800~2,000 lux의 光度와 主로 400~700m μ 의 波長⁽¹⁹⁾을 얻을 수 있도록 施設하였으며 1日中 照明 時間은 16時間 室內溫度는 18~20°C(lit)/13~15°C(dark)로 調節하였다.

結果 및 考察

1. 根瘤菌의 分離

根瘤菌은 土壤으로부터 分離하는 方法⁽¹⁹⁾도 있으나 이러한 境遇에는 宿主의 種類 및 品種을 모르기 때문에 本試驗에 있어서와 같이 多數의 菌株를 對象으로 그 活性을 比較하기에는 不便이 隨伴되므로 既知의 宿主에 形成된 根瘤, 特히 leghemoglobin⁽⁴⁾의 含量이 比較的 많은 開花期 前後의 根瘤로부터 根瘤菌을 分離하였으며 採取場所는 氣候 및 土壤條件의 差異를 감안하여 大關嶺高冷

地試驗場을 中心으로한 低溫地帶, 濟州地域, 京畿, 慶南, 및 全南地域을 對象地域으로 하였다. 分離한 根瘤菌의 菌株數 및 蒐集場所는 表 1에 나타낸 바와 같다.

Table 1. Source and number of rhizobial isolates

Location	Luna	var. unknown
Pyongchang		5
Suwon	10	
Exp. farm	5	
Kwangsan		4
Chinju		15
Yangsan		4
Cheju		4
Total	15	32

2. 根瘤菌의 菌學的性質 및 抗原의 特性

分離菌株에 대하여는 YMB, YMA 및 litmus milk 培地上에서의 形態의 및 培養의 性質을 檢討하는 同時에 抗原의 性質을 比較하여 性質이 重複되지 않는 菌株를 根瘤形成試驗用 菌株로 選定하였으며 選定菌株에 對한 菌學的 特性 및 抗原의 特性을 檢討한 結果는 表 2에 나타낸 바와 같다.

Table 2. Cultural characteristics and antigenic properties of alfalfa nodule bacteria

Stock No.	Isoln. No.	Growth on YMB	Growth on YMA	Litmus milk*	Antisera dilution (SU47)				
					400	800	1600	3200	0
M-1	N-M 1	F, T	L,mc,rd	acid(+)	-	-	-	-	-
M-2	N-M 2	F, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-3	N-M 4	F, T	L,mc,rd,CR	"	×	×	-	-	-
M-4	N-M 6	F, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-5	M 1-1	F, T	O,mc,rd	"	×	×	-	-	-
M-6	M 1-2	F, T	O,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-7	M 1-31	M, C	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-8	M 1-4	M, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-9	M 1-5	F, C	P,mc,rd,CR	"	×	×	×	-	-
M-10	M 3-1	F, C	O,mc,rd	"	×	×	-	-	-
M-11	M 3-21	F, T	P,mc,rd	"	×	×	×	×	-
M-12	M 3-22	F, T	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-13	M 3-3	F, T	P,mc,rd	"	×	×	×	×	-
M-14	M 4-1	F, C	O,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-15	M 4-2	M, C	O,mc,rd	"	×	×	×	×	-
M-16	M 5-1	M, C	O,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-18	M 5-12	F, T	O,mc,rd	"	×	×	-	-	-

M-20	M 5- 2	F, C	L,mc,rd	acid(+)	-	-	-	-	-
M-21	M 6- 1	F, C	O,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-22	M 6- 1	F, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-23	M16- 3	F, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-24	M 6- 4	F, C	L,mc,rd	"	×	-	-	-	-
M-25	M 8- 1	F, C	O,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-26	M 8- 2	F, C	L,mc,rd	"	-	-	-	-	-
M-27	M 9- 1	F, C	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-28	M 9- 2	F, C	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-29	M10- 1	F, C	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-30	M11- 1	F, T	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-31	M11- 2	F, C	L,mc,rd,CR	"	-	-	-	-	-
M-32	M13- 2	F, C	NT	NT				NT	
M-33	M14- 1	F, C	L,mc,rd	acid(+)	-	-	-	-	-
M-34	M14- 2	F, T	L,mc,rd	"	×	-	-	-	-
M-35	M14- 4	F, T	O,mc,rd	"	-	-	-	-	-
SU 47	SU 47	F, T	O,mc,rd	"	×	×	×	×	-

Abbreviations: S, slow growth; M, moderate growth; F, fast growth; C, clotting; T, turbid; P, transparent; L, translucent; O, opaque; gm, gummy; mc, mucilous; sl, slimy; rd, raised; ft, flat; CR, congo red absorbtion; *, serum zone; +, positive and -, negative formation of serum zone; ×, minimal detectable agglutination; ××, intermediate agglutination; ×××, complete agglutination; NT, not tested.

大部分이 液體 및 固體培地에서 良好한 生育을 보였으며 flask內의 YMB培地에서 36~48時間의 靜置培養으로 $1\sim 5\times 10^8$ cells/ml 水準의 生菌數를 나타내었다. 多數의 菌株가 液體培地에서 生育中 菌體덩이를 形成하였고 그 形態는 綿狀 片狀 등으로 菌株에 따라 差異가 있었으며 時間이 經過함에 따라 점차적으로 器底에 沈澱되었다. 또한 YMB培地에서는 生育中에 培養液의 粘性을 增加시키는 것이 一般적인 傾向이었으나 色素를 形成하는 菌株는 전혀 發見되지 않았다.

分離菌株의 somatic antigen⁽¹⁰⁾을 對象으로 long agglutination test에 의하여 그 性質을 比較한 結果, *R. meliloti* SU47의 抗血清에 對하여 6,400倍稀釋液에서는 供試한 alfalf 根瘤菌 모두가 아무런 反應을 나타내지 않았으나 3,200倍稀釋液에서는 M-11, M-13, M-15, 및 SU-47등이 凝集 反應을 나타내었고 그 凝集形態는 M-11과 SU-47, M-13과 M-15가 各各 類似하였다. 이밖에 800倍稀釋液까지 若干의 凝集反應을 나타낸 M-3 M-5, M-10 및 M-18中에서는 M-3과 M-5가 凝集形態上的 相互近緣性を 보였다. 本 實驗에서는 1個標準菌株만으로 抗血清을 調製하였고 somatic antigen을 使用한 反應結果를 菌株의 培養의 및 形態의 特性과 比較하였으므로 圃場試驗中 菌株

의 識別에 應用할 수 있을 것으로 考慮되며 抗血清은 長期間 保存⁽¹⁹⁾이 可能하고 여러 菌株에 對하여 交互적으로 調製하여 使用할 境遇에는 結果의 分析을 더욱 明確히 할 수 있으므로 특히 대두根瘤菌에 對하여는 Wright등⁽²¹⁾, Koontz와 Faber⁽⁶⁾등에 의하여 somatic antigen에 의한 serogroup의 區分이 試圖되었고 Means⁽¹⁰⁾ 등은 이를 대두 및 동부(*Vigna sinensis*)에 直接 適用한 바 있다.

3. Lysogeny 試驗

分離過程中 根瘤表面의 殺菌時에 virulent phage의 混入은 排除되었을 것으로 생각되나 latent phage에 관하여는 多數의 報告^(9,17)가 있으므로 選定된 根瘤菌에 對한 根瘤形成試驗을 遂行하기 以前에 lysogeny 與否를 檢査하였으며 더욱 phage induction을 爲하여 供試菌株의 YSB培養에 致死率 80% 以上이 되도록 紫外線을 照射한 다음 YMA plate에 cross-streaking하여 培養하면서 plate 上的 交叉點 또는 交叉點 以後에 있어서의 lysis 發現與否를 觀察하였던 바 全供試菌株에 있어서 cell lysis 또는 plaque의 形成을 發見할 수 없었으므로 選定된 菌株는 phage에 汚染되지 않은 狀態임을 確認하였다.

4. 根瘤形成試驗

分離한 菌株의 圃場試驗 以前에 宿主植物에 對한 親和力을 調査하고 無効菌株을 除去하기 위하여 前述한 方法에 依하여 無窒素培地上에 있어서의 根瘤의 形成 및 植物體의 生育狀態를 比較하

였으며 無窒素無接種區, 窒素施用無接種區 및 無窒素菌接種區別로 栽植 12週後에 植物體의 地上部 乾物重⁽¹⁾을 測定하여 統計의 方法으로 分析한 結果는 表 3에 나타낸 바와 같다.

Table 3. Analysis of Variance.

Source of variance	df	Ms
Strains	35	95.67**
Nd. vs non-nd.	1	3.22
Nd group	31	94.19**
Non-nd group	3	141.64**
Error	180	2.41

Abbreviations: Nd, nodulated; Non-nd, non-nodulated; df, degree of freedom; Ms, mean square.

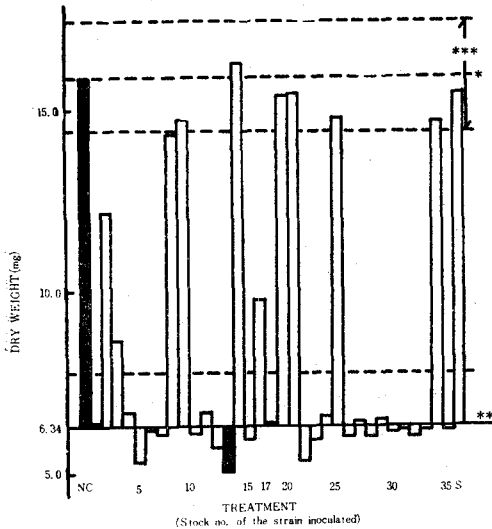


Figure 1. Variation in dry weight of alfalfa due to effectiveness of rhizobial strains.

NC, nitrate control; *, level of nitrate control; **, level of control; ***, range of non-significant difference from NC level; □, nodulated; ■, non-nodulated; S, standard strain, *Rhizobium meliloti* SU47.

표 3 및 그림 1에 表示한 바와 같이 無窒素無接種區, 窒素施用無接種區 및 各菌株接種區間에 高度의 有意差를 나타내었고 이를 根瘤着生群과 非着生群으로 나누어 函數 分析해본 結果 兩群間에 有意差가 認定되지 않았는데 이것은 非着生群中에 乾物量이 많은 窒素處理區가 包含되어 있고非

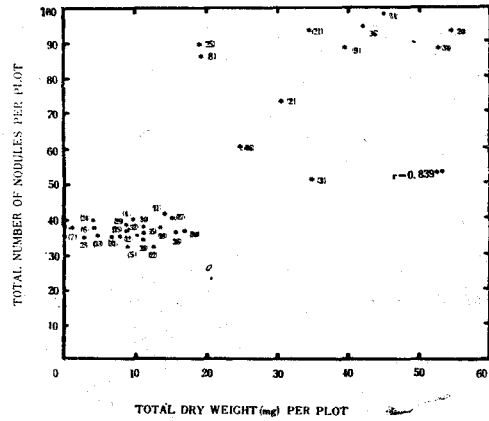


Figure 2. Correlation between dry weight of alfalfa and number of nodules.

着生群이 4個群 밖에 안되었기 때문이라고 推定된다.

따라서 窒素處理區를 除外하면 非着生群은 着生群에 比해서 乾物重이 顯著히 가벼운 傾向이 있었다. 한편 着生群內 및 非着生群內에 있어서의 各處理區間에 高度의 有意差를 보였는데 非着生群內의 差異는 窒素施用無接種區와 其他非着生區間의 差異에 依하여 나타난 結果이며, 着生群內의 差異는 M-4菌株接種區와 같이 根瘤가 多少 着生되었어도 乾物重이 增加하지 않은 境遇, M-8菌株接種區와 같이 着生根瘤數는 많지 않으나 乾物重이 크게 增加한 境遇 및 菌株接種區와 같이 根瘤着生數는 많아도 乾物重이 別로 增加하지 않은 境遇가 있었으며 이는 根瘤着生能力 및 着生된 根瘤의 窒素固定能力에 顯著한 差異가 있었기 때문이라고 생각된다. 또한 根瘤着生數와 平均乾物

重間에 高度의 正의 有意相關이 認定되었으며 根瘤의 數가 많을수록 乾物重이 높은 傾向을 나타내었다(그림 2).

Luna種 alfalfa에 對하여 M-4를 비롯한 21個 菌株는 無効菌株, M-2를 비롯한 11個 菌株는 有效菌株, M-1 및 M-13은 親和力이 없는 菌株로 밝혀졌으며 有效菌株中 M-8, 9, 14, 20, 21, 25, 및 34 菌株接種區에서는 窒素施用無接種區와 同一水準의 平均乾物重을 나타내었고 特히 M-8 및 25는 着生根瘤數에 比하여 窒素固定活性이 큰 것으로 認定되었으며 M-2, 3 및 16 菌株接種區는 窒素施用無接種區에 比하여 낮은水準의 生長效果를 나타내었다. 이같은 結果는 植物體의 乾物重을 比較한 것이므로 窒素固定能力의 差異는 더욱 顯著할 것⁽¹⁵⁾으로 分析된다.

根瘤를 形態的으로 比較하였을때 無効根瘤는 外貌가 둥글고 輪郭이 뚜렷하지 못하며 白色이 強하고 主根과 側根의 分岐點에 主로 着生되는 反面에 有效根瘤는 長橢圓形으로서 分岐點이 아닌 側根上에 形成되었다. 임⁽⁷⁾은 大豆에 있어서 뿌리의 끝이 鈍化되면서 根瘤가 形成되지않는 現象을 볼 수 있었다고 報告하였는데 本 試驗(plate 1)에 있어서는 M-8과 9 特히 M-8 接種區에서 側根의 膨化現象이 뚜렷하였음에도 不拘하고 正常的으로 根瘤가 形成되고 窒素固定能力도 良好한 結果를 나타내었다. 이와 같은 現象에 對하여는 膨化된 側根部의 組織學的 觀察이 隨半되어야 할 것

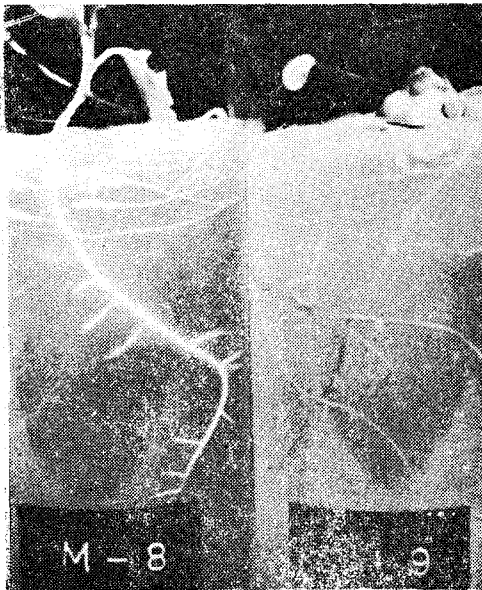


Plate 1. Swelling of root branches in M-8 & 9 tubes.

으로 考慮된다.

要 約

荳科牧草의 增産과 窒素肥料의 消費節約을 爲하여 根瘤菌의 實用化를 爲한 一連의 研究를 試圖하고 그 基礎研究로서 알팔파群을 對象으로 根瘤菌을 分離하고 優秀菌株를 選拔하였다.

1. 大關嶺, 濟州道 및 其他地域에서 蒐集한 根瘤로부터 47株의 根瘤菌을 分離하였다.

2. 分離菌株에 對하여 形態의 및 培養의 性質을 檢討하는 同時에 抗原의 特性을 比較하고 lysogeny 與否를 確認한 結果: (1) yeast mannitol broth 및 agar 上에서의 生育形態 및 增殖速度를 달리하였으며 congo red에 의한 着色程度에도 差異가 있었고 (2) 抗原性의 相互 近緣性이 認定되는 菌株는 M-11/SU47, M-13/M-15 및 M-3/M-5 이었으며 (3) latent phage의 感染菌株가 發見되지 않았다.

3. 恒溫照明室內에서 行한 試驗管法에 의한 植物接種試驗을 通하여 分離菌株의 根瘤形成 및 窒素固定能力을 比較한 結果, 供試宿主植物에 對하여 根瘤를 形成하지 못하는 即 親和力이 없는 菌株, 根瘤는 形成하나 宿主植物의 生育에는 影響을 주지 못하는 無効菌株 그리고 宿主植物의 生育을 크게 促進하는 有效菌株 등으로 區分할 수 있었으며 特히 有效菌株中에서 M-8, 9, 14, 20, 21, 25 및 34 菌株等은 窒素施用區 水準 또는 그 以上으로 宿主植物의 生育에 有效한 結果를 나타내었다.

References

- (1) Brockwell, J., Hely, F.W. and Neal-Smith, C.A.: *Austral. J. Agr. An. Husb.* **6**, 365~370(1966)
- (2) Gibson, A.H.: *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 28~42(1963)
- (3) Hahn, N.J.: *Austral. J. Biol. Sci.* **10**, 1 (1966)
- (4) Hardy, R.W.F. and Burns, R.C.: *Ann.Rev. Biochem.* **37**, 331~358(1968)
- (5) Jensen, H.L.: *Proc. Lin. Soc. N.W.* **66, 98**, 1~22(1942)
- (6) Koontz, F.P. and Fader, J.E.: *Soil Sci.*

- 91, 228~232(1961)
- (7) 임선옥 : 한국농화학회지, 13(1), 51~57(1970)
- (8) Lonergan, J.E., Meyer, D., Fawcett, R.G. and Anderson, A.J.: *J. Austral. Inst. Agr. Sci.* 21, 264~265(1955)
- (9) Marshall, K.C.: *Nature* 177, 92(1956)
- (10) Means, U.M., Johnson, H.W. and Date, R.A.: *J. Bacteriol.* 87, 547~553(1964)
- (11) Miles, A.A. and Misra, S.S.: *J. Hyg.Camb.* 38, 732~749(1938)
- (12) Nandi, P. and Sinha, H.: *Proc. Ind. Natl. Sci.* 40, 479~481(1974)
- (13) Napoli, C.A. and Hubbel, D.H.: *Abst. Annu. Meet.* (1976)
- (14) Raggio, M. and Raggio, N.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13, 109~128(1962)
- (15) Schiffman, J.: *Min. Agr., Israel Agr. Res. Sta.* 9, 57~67(1958)
- (16) Scwinghamer, E.A. and Reinhart, D.J.: *Austral. J. Biol. Sci.*, 16, 597~605(1963)
- (17) Takahashi, I. and Qualding, C.: *Can. J. Microbiol.* 7, 455~465(1961)
- (18) Vincent, J.M.: *Proc. Linn. Soc(N.S.W.)* 66, 145~154(1941). (19) Vincent, J.M.: A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburg(1970)
- (20) Wilson, M., Humphrey, B.A, and Vincent, J.M.: *Arch. Microbiol*, 103, 151~154(1975)
- (21) Wright, W,H., Sarles, W,B, and Holst, E.G.: *J. Bacteriol*, 19, 39(1930)