

根瘤菌의 種子 接種方法의 차이가 根瘤形成 및 Alfalfa 幼苗의 生長에 미치는 影響

李 光 會 · 李 浩 鎮 *

Effects of Seed Inoculation Methods on the Nodulation and the Growth of Alfalfa Seeding

Lee, K. H. and H. J. Lee*

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Luna) seeded in agar was inoculated with two strains of *Rhizobium meliloti* isolated from root nodules of alfalfa for assessment of nodulation. The seedling growth after six weeks was remarkably increased by adding each rhizobia strains into agar media and also by nitrate application (70ug N/ml), but there was no significant difference among them. Nodulations started one week after inoculation and increased its numbers and sizes as seedling grew. Therefore, the two strains isolated from alfalfa root were concluded to be effective strains.

For determining seed inoculation method the same cultivar was inoculated with both rhizobia strains using different inoculation methods such as broth-vacuum, peat-adhesive, peat & lime pelleting. They were seeded in pots of river sand and supplied with culture solution excluded nitrogen. The peat & lime pelleting was recognized the best method in both of nodulation and seedling growth after eight weeks growth. There were significant correlations between the weight of nodules and the shoot or root dry weight of alfalfa in both rhizobia strains.

緒 言

豆科作物에 대한 根瘤菌 接種의 효과는 菌株의 유 효성, 근류균의 接種方法, 식물체의 영양상태 그리고 환경조건 등 여러가지 要因에 의해 크게 좌우되게¹⁾ 되는데 그 중에서도 窒素固定能力이 높은 菌株와 寄主 品種과의 조합을 選定하는 것은 가장 基本的이고 또한 重要한 일이다.⁴⁾

한편 실제 栽培에 있어서는 선발된 有效菌株가 寄主 植物體에 의해 效果의인 根瘤形成을 할 수 있도록 土壤이나 種子表面에서 유지되어야 하는데 Burton⁵⁾에 의하면 接種 후 種子에 살아남는 根瘤菌의 수는

처리된 菌數에 直接的으로 關聯이 되므로 接種菌數를 增加시키는 것이 根瘤菌의 生存, 增殖 그리고 초기의 根瘤形成에 有利하다고 하였으며 Burton과 Culey³⁾는 Peat - base inoculant 가 liquid inoculant 보다 接種效果가 우수하다고 보고하였다. 그밖에 接種效果를 높이기 위한 여러가지 方法들이 고안되었는데 Brockwell¹⁾은 Peat - base inoculant와 함께 접촉제로 使用한 gum arabic 이 根瘤菌의 生存에 매우 效果의이었음을 보고하였으며 Waggoner¹²⁾ 등도 접촉제의 使用이 接種效果를 높인다고 보고하였다. 接種效果를 높이기 위한 또 하나의 方法으로 Loneragan 등⁶⁾은 酸性土壤에서 clover 種子를 liquid inoculum 으로 接種한 후 석회로 피복하여 播種함으로써 根瘤

* 서울大學校 農科大學

* Department of Agronomy, Seoul National Univ., Suweon Korea 170

形成이 현저히 增大되었음을 보고하였고 Brockwell²⁾은 Subterranean clover의 根瘤形成에 대한 여러가지 物質의 영향을 조사하였는데 接着劑와 被覆物質을 사용한 것이 Peat inoculant 만으로 接種한 것 보다 根瘤形成이 현저히 增大되었음을 보고하였으며 Radcliffe 등⁷⁾은 被覆物質의 種類, 物理的 特性, 純度 그리고 土壤條件에 따라서 그 效果가 다르게 나타난다고 하여 여러가지 被覆物質의 장단점을 보고하였다. 본 實驗은 Alfalfa의 재배보급을 위한 기초실험으로本校 實驗 農場에서 生育중인 Alfalfa의 根瘤에서 根瘤菌을 分離하여 이들의 有效性을 判定한 후 根瘤菌의 種子接種方法에 따른 接種效果를 比較하려고 실시하였던 바 몇가지 結果를 얻었기에 이를 보고한다.

材料 및 方法

서울大學校 農科大學 實驗農場 飼料作物 展示圃에 生育중인 Alfalfa (*Medicago Sativa* L. CV. Luna)의 뿌리에 着生되어 있는 健實한 根瘤로부터 Vincent의 方法¹¹⁾에 準하여 몇가지 菌株을 分離하여 gram stain에 의한 현미경 관찰과 Yeast mannitol agar 培地上에서의 培養特性을 比較하여 그중 대표적인 2가지의 菌株 A₁과 A₃ strain을 선별하여 供試菌株로 사용하였으며 供試品種은 Alfalfa 品種 Luna로 하였다. 이들 菌株의 보관은 Agar culture 方法에 따라 4°C에서 보관하였으며 菌數의 측정은 Agar-plate method에 따라 실시하였다.¹¹⁾

1. 根瘤形成實驗

供試菌株의 根瘤形成과 窒素 固定能力의 평가는 Gibson의 方法에 準하여 실시하였는데 處理는 2種의 菌株 接種區와 窒素處理區 및 無處理區로 各處理當 5반복으로 하여 根瘤菌 接種區는 Yeast manitol broth에서 배양한 各 菌株을 시험관 배지상에 無菌的으로 發芽시킨 幼苗를 1個體씩 이식한 후 4일에 各各의 시험관당 1ml씩 接種하여 A₁ strain은 2×10^7 rhizobia/plant, A₃ strain은 1×10^9 rhizobia/plant으로 處理하였으며 窒素處理區는 이식후 12일 0.05% KNO₃ (N로서 약 70 ppm) 수준으로 하였다. 幼苗는 試驗管에 이식한 후 곧 온도조절 및 조명시설을 갖춘 生育箱에 옮겨서 生育期間중 주간온도 19~22°C 야간온도 13~15°C 그리고 日長은 16시간을 유지하였다. 生育調査는 根瘤數에 대해 接種후 7일

간격으로 調査하였으며 葉數, 草長, 根長, 地上部 및 뿌리무게 그리고 根瘤무게는 接種 7주 후에 식물체를 수확하여 조사하였다.

2. 根瘤菌의 種子接種方法에 관한 比較實驗

본 實驗에 사용된 根瘤菌의 種子接種方法은 아래 표에 表示된 3가지 方法이며 實驗設計는 두 菌株와 3가지 接種方法을 細分하여 6가지 根瘤菌 接種區와 하나의 無接種 對照區를 두어 各處理當 3反復으로 完全任意 配置하였다.

Inoculation methods used in this experiment.

Inoculation methods	Descriptions	Treatment rate (/g seed)
Broth - vacuum	Inoculated with broth inoculum, under vacuum condition for 5 minutes	1ml of broth inoculum
Peat - adhesive	Inoculated with peat inoculum suspended in 45% (W/V) gum arabic as adhesive	0.006 g of peat inoculum 0.03 ml of gum arabic
Peat & Lime pelleting	Inoculated with peat-adhesive method, and pelleted with CaCO ₃	0.006 g of peat inoculum 0.03 ml of gum arabic 0.309 g CaCO ₃

Peat inoculum과 Broth inoculum은 菌數가 10^8 Rhizobia/ml 정도되는 Broth inoculum을 Peat 50g에 10ml, Yeast mannitol broth 50ml에 1ml씩 無菌的으로 加하여 만들었으며 26°C에서 9日동안 增殖保存한 후 接種하였는데 各 Inoculum의 菌數는 아래 表와 같았다.

Mean number of rhizobia in inoculants at inoculation time.

Strain	Broth inoculum (rhizobia/ml)	Peat inoculum (rhizobia/g)
A ₁	3.5×10^8	1.5×10^9
A ₃	3.0×10^8	1.3×10^9

播種當日 種子를 Alcohol (95%)과 승홍수(0.1%)로 消毒한 후 根瘤菌을 接種하였으며 接種지부 各處理別로 강변 모래를 담은 plastic pot (15×6×10cm)에 24粒씩 播種하여 polyethylene film으로 피복하여 비를 피할 수 있도록 준비된 網室로 옮겨놓고 生育期

間 증 질소(N)를 변 modified Hoagland's solution 을 下部로부터 공급하여 주었다. 그리고 密植에 따른 生育障害를 방지하기 위하여 播種 후 17일에 pot 당 10개씩 남기고 솎아주었다.

生育調査는 播種 4주 후부터 매주 草長을 조사하였고 地上部 및 뿌리의 무게 그리고 根瘤의 數 및 무게는 播種 8주 후 pot 당 6個體씩 수확하여 調査하였다.

結果 및 考察

1. 根瘤形成 實驗

根瘤의 數 및 무게; 根瘤菌 接種 후 根瘤의 形成은 두 菌株 모두 接種 후 1주일까지는 外觀상으로 根瘤着生이 없었고 接種 후 2주부터 보이기 시작하

여 그후 계속적인 數의 增加를 보였는데 두 菌株들 간에는 거의 동일한 경향으로 뚜렷한 차이가 없었다. 또한 接種 후 7주 후에 調査된 根瘤의 무게에 있어서도 역시 두 菌株 간에 차이가 없었는데 이와같은 결과에서 볼 때 본 實驗에 使用된 두 菌株의 根瘤形成 能力은 같다고 볼 수 있었다.

幼苗의 生育; 接種 7주에 調査한 幼苗의 生育을 보면 葉數, 草長, 地上部 乾物重은 對照區에 비해 窒素處理區와 根瘤接種區가 현저히 크게 나타났으며 이들 처리 간에는 有意한 차이가 인정되지 않았다(표 1). 한편 幼苗의 根長은 地上部와 正반대로 對照區가 가장 길어 窒素處理區 및 根瘤菌 接種區에 비해 10~16cm 가 더 길었으나 根重은 處理 間에 뚜렷한 차이가 없었으며 단지 A₃ strain 接種區만이 窒素處理區보다 무거운 것으로 나타났다(표 1).

Table 1. Growth of alfalfa seedling according to nitrogen addition and inoculation with two strains of *Rhizobium meliloti* at 7 weeks after inoculation.

Treatment	Trifoliolate leaf No.	Plant height (cm)	Shoot D. W. (mg/plant)	Root length (cm)	Root D. W. (mg/plant)	Nodule No./plant
Control	2.4 a	4.1 a	5.9 a	30.6 b	8.0 ab	0
Nitrate	6.2 b	10.8 b	21.8 b	14.6 a	4.9 a	0
A ₁ strain	6.5 b	15.0 b	24.4 b	19.2 a	8.9 ab	7.9
A ₃ strain	7.1 b	15.6 b	27.8 b	18.9 a	12.6 b	7.0

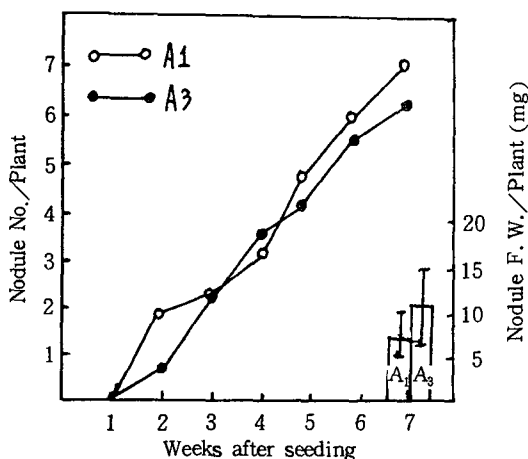


Fig. 1. Alfalfa seedling nodulation as related to inoculation with two strains of *Rhizobium meliloti*. Bars indicate \pm one standard error of the mean. A₁, A₃; strain.

일반적으로 根瘤菌接種의 效果는 植物體의 生育, 體內全窒素含量 그리고 根瘤菌形成 등에 의해서 판단되는데⁽¹⁾ 본 實驗의 結果에서 Alfalfa의 有效生育

은 根瘤의 數 및 무게가 增加함에 따라 增大되어 實驗期間 중 적어도 窒素處理區(70 μ g N/ml)에 해당되는 窒素를 固定한 것으로 추정되며 有效菌株로서 다음 實驗에 供試될 가치가 있는 것으로 評價되었다.

2. 根瘤菌의 種子接種方法에 관한 比較實驗

根瘤의 數 및 무게; 幼苗의 뿌리에 形成된 根瘤數는 根瘤菌의 種子接種方法에 따라 현저한 차이를 보였는데 두 菌株 모두 Peat inoculum 으로 種子를 接種한 후 석회로 피복하는 Peat & lime pelleting 方法은 Broth-vacuum 方法에 비해 3배 이상이나 많은 根瘤가 形成되었다. 그리고 Peat-adhesive 方法은 A₁ strain의 경우에는 Broth-vacuum 方法보다 根瘤數가 많았으나 A₃ strain의 경우에는 有意差가 인정되지 않아 菌株에 따라 그 效果가 다소 다르게 나타났다(표 2). 한편 根瘤의 무게에 있어서도 菌株에 따라 接種方法 間의 차이가 다르게 나타났는데 전체적으로 볼 때는 Peat-adhesive 方法과 Peat & lime pelleting 方法이 Broth-vacuum 方法에 비해 根瘤의 무게가 현저히 무거웠으며 根瘤數에서 본 것과 같은

Table 2. Alfalfa seedling growth and nodulation at 8 weeks after inoculation as related to the methods of inoculation with two strains of *Rhizobium meliloti*.

Strains added	Inoculation methods	Nodule No. /plant	Nodule D. W. (mg/plant)	Shoot D. W. (mg/plant)	Root D. W. (mg/plant)	Shoot/Root ratio
A ₁	Broth - vacuum	6.0 ab	4.3 a	41.6 ab	18.9 a	2.6 b
A ₁	Peat - adhesive	18.7 cd	17.1 cd	146.1 d	59.4 cde	2.5 b
A ₁	Peat & lime	24.3 d	12.0 bcd	124.4 cd	37.8 abcde	3.3 b
A ₃	Broth - vacuum	5.3 a	6.3 ab	65.5 abc	30.0 abc	2.2 b
A ₃	Peat - adhesive	12.3 abc	11.0 bc	87.8 bc	31.1 abcd	2.9 b
A ₃	Peat & lime	22.6 d	18.0 d	158.3 d	63.9 e	2.6 b
Noninoculated Control		-	-	18.3 a	21.7 abc	0.7 a

Means within columns followed by a same letter are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

Peat & lime pelleting 方法의 현저한 效果는 다소 감소되었다(표 2).

幼苗의 生長; 그림 2의 草長을 보면 幼苗의 草長은 無接種 對照區의 경우에는 草長의 增加가 거의 없었으나 나머지 모든 根瘤菌 接種區는 生育日數가 경과함에 따라 거의 直線的인 增加傾向을 보였다. 그러나 草長에 대한 根瘤菌 接種의 效果는 그 接種方法에

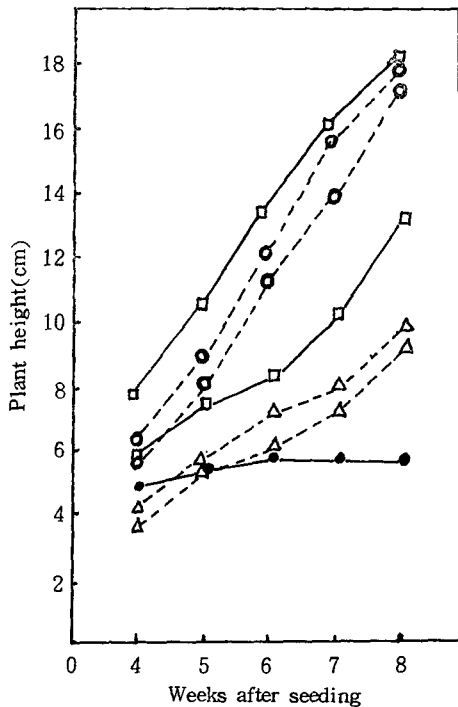


Fig. 2. Plant height of alfalfa seedling during the growth period.

(△); Broth - vacuum, (□); Peat - adhesive (○); Peat & lime pelleting, (●); Control

따라 차이가 있었는데 接種後 4주에서는 A₁ 菌株을 Peat - adhesive 方法으로 接種한 것만이 對照區보다 컸으며 接種後 8주에서는 두 菌株 모두 Peat - adhesive 方法과 Peat & lime pelleting 方法으로 처리한 것은 對照區보다 현저히 컸으나 Broth - vacuum 方法으로 처리한 것은 有意差가 인정되지 않았다(그림 2). 接種 8주후 幼苗의 地上部 乾物重은 草長에서 본 것과 마찬가지로 두 菌株 모두 Peat - adhesive 方法과 Peat & lime pelleting 方法으로 處理한 것은 對照區보다 현저히 무거워 對照區의 5~8배인 반면 Broth - vacuum 方法으로 처리한 것은 對照區와 有意差가 인정되지 않았다(표 2). 이와같이 地上部 生育에 대한 Broth - vacuum 處理의 效果가 인정되지 않는 것은 根瘤形成量이 현저히 적었던데 주로 기인되는 것으로 생각되며 地上部 乾物重과 根瘤무게 사이에는 高度의 正의 相關($r=0.934^{**}$)이 인정되었다. 한편 根重은 各 處理內의 변이가 매우 커서 處理間에 有意差를 보이는 것이 별로 없었다. 그러나 A₁ strain을 Peat - adhesive 方法으로 處理한 것과 A₃ strain을 Peat & lime pelleting 方法으로 處理한 것은 對照區보다 현저히 무거웠으며 특히 A₃ strain에 있어서는 Peat & lime pelleting 方法이 매우 效果의인 接種方法임을 알 수 있었다(표 2). 그리고 根重과 根瘤무게 사이에도 高度의 正의 相關($r=0.930^{**}$)이 인정되었다. Shoot/Root ratio는 菌株 및 接種方法에 관계없이 根瘤菌을 接種한 경우에는 2.5~3.3으로 有意한 차이가 없었으며 對照區의 0.7보다 현저히 높았다. 일반적으로 窒素의 施用은 Shoot/Root ratio를 높이는 데⁸⁾ 根瘤形成增大에 따른 窒素固定量的 增加는 이러한 效果가 없는 것으로 생각된다. 이상에서 살펴본 바와 같이 根瘤의 形成이나 幼苗生長에 대한

接種方法 간의 차이는 供試된 菌株에 따라 다소 다르게 나타나나 A₁ strain의 경우에는 Peat-adhesive 방법과 Peat & lime pelleting 방법이 모두 效果의 있었으며 A₃ strain의 경우에는 Peat & lime pelleting 방법만이 效果的이었다. 그러나 接種方法이 동일한 경우에는 菌株에 따른 차이가 거의 없어 두 菌株 간에는 본 實驗의 供試品種에 대한 根瘤形成이나 窒素固定能力的 차이가 거의 없는 것으로 생각되며 菌株와 接種方法간의 相互作用도 없는 것으로 보였다. 일반적으로 效果的인 根瘤形成은 根瘤菌의 接種量 및 方法에 의해 크게 좌우되는데⁵⁾ Peat inoculum은 Broth inoculum보다 根瘤形成이 훨씬 效果的이며 gum arabic은 根瘤菌의 生存을 增大시켜 接種效果를 높인다고 알려져 있다.^{1,3)} 본 實驗에서도 gum arabic과 함께 Peat inoculum으로 接種한 것이 Broth inoculum으로 接種한 것보다 根瘤形成이나 幼苗生育이 현저히 좋은 경향을 보여 이러한 보고들과 잘 일치하였다. 그리고 전체적으로 볼 때 Peat & lime pelleting 방법이 Peat adhesive 방법이 보다 다소 效果的인 것으로 나타났는데 그 이유는 명확하지 않으며 아마도 피복을 함으로써 有毒物質을 함유하는 種皮로부터 根瘤菌이 分離되었거나¹⁰⁾ 아니면 피복을 함으로써 보다 많은 菌이 接種될 수 있었던 데 기인되는 것으로 생각된다. 따라서 실제 圃場에서 根瘤菌을 接種할 때는 Peat & lime pelleting 방법을 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

摘 要

Alfalfa에 대한 國內分離 根瘤菌의 有效성과 效果的인 根瘤菌 接種方法을 밝히고자 培地上에서 이들 菌株의 根瘤形成 및 窒素固定能力을 검토한 다음 이들 菌株에 3가지 種子接種方法을 적용하여 砂耕栽培를 실시한 結果는 다음과 같다.

1. 根瘤菌 接種에 따른 根瘤의 形成은 接種 2주후부터 볼 수 있었고 幼苗의 生長은 對照區보다 현저히 增加되었으며 窒素處理區(70 μg N/ml)와 차이가 없어 두 菌株는 모두 有效菌株로 評價되었다.

2. 두 菌株 모두 Broth-vacuum方法으로 接種한 것은 根瘤의 形成은 있었으나 實驗期間 중 幼苗의 生長에 있어서는 無接種 對照區와 차이가 없었다.

3. Peat & lime pelleting 방법은 두 菌株 모두에서 根瘤形成과 幼苗生長을 현저히 增加시켰으나 Peat-adhesive 방법은 A₁ strain에서만 效果的이었다.

4. 根瘤의 무게와 地上部 乾物重 그리고 根瘤의 무게와 根重사이에는 두 菌株 모두에서 高度의 正的 相關關係가 인정되었다.

引 用 文 獻

1. Brockwell, J. 1962. Incorporation of peat inoculant in seed pellets for inoculation of *Medicago tribuloides* Desr. sown in dry soil. Aust. J. Sci., 24, 458.
2. _____ . 1962. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. 1. Coating materials, adhesives, and methods of inoculation. Aust, J. Sci., 24, 458.
3. Burton, J. C., and L. W. Erdman. 1940. A division of the alfalfa crossinoculation group correlating efficiency in nitrogen fixation with source of *Rhizobium meliloti* J. Amer. Soc. Agron., 32, 439-450.
4. _____ . 1972. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In Alfalfa science and technology. (ed. C. H. Hanson), pp 229-246. ASA. Mono. No. 15, ASA, Inc., publisher.
5. _____ . 1976. Methods of inoculating seeds and their effects on survival of rhizobia. In Symbiotic nitrogen fixation in plants. (ed. P.S. Nutman), pp. 175-189. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
6. Loneragan, J. F., Meyer, D., Faucett, R. G., and Anderson, A. J. 1955. Lime-pelleted clover seeds for nodulation in acid soils. J. Aust. Inst. Agr. Res., 21, 264-265.
7. Radcliffe, J. C., W. S. McGuire, and M. D. Dawson. 1967. Survival of rhizobia on pelleted seeds of *Trifolium subterraneum* L. Agron. J., 59, 56-58.
8. Shank, D. B. 1945. Effects of phosphorus, nitrogen and soil moisture on top-root ratios of inbred and hybrid maize. J. Agr. Res., 70, 365-377.
9. Silver, W. S., and R. W. F. Hardy. 1976. Newer development in biological dinitrogen fixation of possible relevance to forage production. In Biological N. fixation in forage-livestock systems.

- (ed. C. S. Hoveland) pp. 1-34. Agronomy Spec. publ. 28. Am. Soc. of Agron., Madison, Wis.
10. Thompson, J. A. 1961. Studies on nodulation responses to pelleting of subterranean clove seed. *Aust. J. Agr. Res.*, 12, 578-592.
11. _____ . 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
12. Waggoner, J. A., G. W. Evers, and R. W. Weaver 1979. Adhesive increases inoculation efficiency in white clover. *Agron. J.*, 71, 375-377.