Effectiveness of Pelleting for Inoculating Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Small Seeds

Ui-Gum Kang*, Jum-Soon Kang¹, Si-Lim Choi², Sang-Seok Lee³, Jong-Soo Kim³, and Seok-Hee Park³

Professional Experienced Personnel Invitation Program, National Research Foundation of Korea, Daejeon 34113, Korea

¹Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 52733, Korea

³Gyeongsangbuk-do Agricultural Research and Extension Services, Daegu 41404, Korea

*Corresponding author: kangug1104@gmail.com

ABSTRACT

Received: July 15, 2019

Revised: August 28, 2019

Accepted: August 29, 2019

The effectiveness of pelleting for inoculating small seeds with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) was studied. Seeds of sesame cv. Yangbaeckkae and perilla cv. Namcheon were inoculated with *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 with pelleting material, 'DPA' (contained 70% diatomite, 14% perlite, 5% appetite, 5% cow dung, 3% peat, and 3% pea) and stored at refrigerator temperature of 4°C or room temperature of 18 - 20°C for 2 to 7 weeks. While 4°C modestly improved strain survival and growth, crop by strain interaction was substantial. Strain KR083 numbers grew 10 to 13 fold on sesame in 2 to 7 weeks but declined by as much as 78% on perilla across both temperatures. In contrast, strain RRj228 numbers grew 1.7 to 11 fold on perilla but only maintained its numbers on sesame across temperatures and storage times. Strains impacted seed viability differently; while KR083 had no effect, RRj228 decreased germination rate of both sesame and perilla by as much as 20% after 2 weeks of storage of pelleted seeds at 18 - 20°C. Strain KR083 significantly improved root elongation of both crops, but only of sesame when co-inoculated with RRj228. On the other hand, KR083 had lower colonization ability than RRj228 on roots, 19 and 83 % lower on sesame and perilla, respectively. Mixed inoculum, however, significantly improved colonization of both strains on both crops. In field trials, sesame co-inoculated with KR083 and RRj228 yielded 18% higher than non-inoculated control while reducing phytophthora blight infection by 10 and 20% in silty loam and sandy loam soils, respectively. Likewise, Perilla yielded 29% more leaf with mixed inoculation than the non-inoculated, diatomite-pelleted control in the same silty loam soil. Results indicate DPA pelleting as an effective method for small seeded crops when compatible PGPR strains are used as inocula.

Keywords: Effectiveness, Pelleting, Perilla, Plant growth-promoting rhizobacteria, Sesame

Images of microscopic transverse section (50 fold magnification) of a sesame seed pelleted with 'DPA' material together with a mixture of PGPR strain *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 (Left), a sesame seedling from the seed pellet (Center) and its growing status in 'growth pouch' (Right).

Introduction

식물의 근권에 서식하면서 식물성장을 돕는 근권세균 (Plant Growth-Promoting Rizobacteria, 일명 PGPR)은 공중질소 고정, 식물성장호르몬 생성, 식물의 토양양분 흡수촉진, 토양병 억제 등의 기능을 한 가지 이상 발휘하여 식물의 생장을 종합적으로 촉진시키는 미생물로 알려져 있다 (Kloepper and Schroth, 1978; Ahemad and Kibret, 2014). PGPR의 이러한 기능은 궁극적으로 화학비료와 농약의 사용량을 줄일 수 있어 화학농자재의 저투입을 위한 방안으로서 많이 연구되었다 (Baldani et al., 2001; Bashan et al., 2014; Kang et al., 2017). 지금까지 알려진 PGPR 균주는 *Pseudomonas* 속 (Kloepper et al., 1980; Kang et al., 2017), *Bacillus* 속 (Backman et al., 1994; Park et al., 2015; Kang et al., 2017), *Azospirillum* 속 (Okon, 1985) 등을 포함해서 다양하다 (Ahemad and Kibret, 2014). 이들 PGPR 균주의 농작물 접종효과는 벼 (Baldani et al., 2001; Kang et al., 2017)와 콩 (Begum et al., 2010), 밀 (de Freitas and Germida, 1990; Kang and Chebotar, 2002), 수수 (Kang and Chebotar, 2002), 감자 (Kloepper and Schroth, 1981; Kang and Chebotar, 2002), 호박 (Furnkranz et al., 2012), 고추 (Kang and Chebotar, 2002) 등에서 확인되었다. 그러나 PGPR 균주가 효과적으로 실용화 되기 위해서는 먼저 숙주의 뿌리 내부나 외부에 착생하는 능력이 토양 속의 기존 미생물보다 높아야 하고 (Kloepper et al., 1980; Vessey, 2003), 다음으로는 이러한 균주의 근권 또는 뿌리내부 착생을 돕는 적절한 접종방법이 필요하다 (Persello-Cartieaux et al., 2003). 이에따라 뿌리착생력이 우수한 PGPR 균주를 이용한 작물접종 연구가 많이 이루어졌으며 (Bashan et al., 2014; O'Callaghan, 2016), 접종된 뒤 작물의 뿌리 안팎에 잘 생존하면서 (Mahaffee, 1991; Caballero-Mellado et al., 1995; Catroux et al., 2001; Deaker et al., 2004) 생장촉진 기능을 가급적 빨리 발현하도록 도울 수 있는 이른바 ‘종자접종법’이 다양하게 모색되었다 (Deaker et al., 2004; Muller and Berg, 2008; Zhang et al., 2009; Begum et al., 2010; Elzein et al., 2010). 보고 (O'Callaghan, 2016)에 의하면 미생물의 종자접종방법에는 작물종자를 균주배양액에 담궈서 접종하는 Bio-priming법, 종자표면에 막을 입혀서 균주를 접종하는 Film coating법, 균주가 들어있는 담체를 점착물질로 종자에 붙여서 접종하는 Slurry coating법, 그리고 균주배양물을 영양물질 등과 함께 종자에 두껍게 입혀서 접종하는 Pelleting법 등이 있다. 특히 펠렛접종법은 종자가 작은 참깨, 들깨, 상추, 당근, 토마토 등에 이용할 경우 종자의 부피를 늘릴 수 있기 때문에, 이들 작물의 생장촉진효과는 물론이고 파종량의 절감과 파종작업의 생력화까지 기대할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Amer and Utkhede, 2000; Rekha et al., 2007; Trifonova et al., 2009; Kang, 2014). 그러나 이 방법은 접종균주의 생존율을 높이는 것이 해결과제로 지적되고 있어 (O'Callaghan, 2016), 이 문제를 해결할 수 있는 펠렛 구성물질의 선택이 매우 중요한 것으로 여겨진다.

이러한 측면에서 본 연구에서는 기 보고된 (Kang et al., 2017) PGPR 균주 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228의 식물성장 조장 기능과 병원균 생육억제 기능을 활용해서 참깨나 들깨와 같은 소립종자를 저투입 재배할 목적으로, 이들 균주의 종자접종에 필요한 한 펠렛팅 후보물질의 실용성을 검토하였다.

Materials and Methods

시험된 PGPR 균주 본 시험에 사용된 PGPR 균주는 *Bacillus* sp. KR083 (KACC 91050)과 *Pseudomonas* sp. RRj228 (KACC91052) 이었다 (Kang et al., 2017). 이 중 KR083 균주는 공중질소를 고정하고 식물성장을 조장하며 식물병원균의 생육을 억제하고 토양인산을 가용화하면서 Pectinase 활성을 갖고 있고, RRj228 균주는 식물성장을 조

장하고 식물병원균의 생육을 억제하며 토양인산을 가용화하면서 *Protease* 활성을 갖는 것으로 보고되었다 (Kang et al., 2017). 특히 RRj228 균주는 KR083에 비해 토양인산의 가용화 능력이 우수하고 식물병원균의 억제효과가 높으며, 접종농도가 10^6 cfu mL⁻¹ 이하일 때는 식물성장 조장 효과를 보이지만 그 이상에서는 식물의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다. 그리고 이들 균주의 생장과 관련된 적정 온도범위는 KR083의 경우 28 - 37°C이고 RRj228은 11 - 37°C이며, pH 6.5의 PDB (Potato Dextrose Broth) 배지에서 24시간 180 rpm 속도로 진탕배양 했을 때의 생균수는 KR083의 경우 접종직후 10 cfu mL⁻¹에서 6.6×10^8 cfu mL⁻¹로 증가하였고 Rj228은 8 cfu mL⁻¹에서 5.3×10^9 cfu mL⁻¹로 증가하는 특성을 보였다.

종자 펠렛팅 및 균주 접종 시험된 소립종자는 참깨품종 ‘양백깨’와 들깨품종 ‘남천들깨’(잎 생산용 들깨)의 것으로 하였다. 종자 펠렛팅은 Kang et al. (2009)의 등의 방법에 준해서 펠렛팅 드럼 (Seed processing, Holland)에 종자를 넣고 점착제인 PVA (Polyvinyl alcohol)를 분무한 후, 펠렛팅 물질을 처리하였다. 펠렛팅 후보물질의 구성은 시판용 규조토 70%, 펄라이트 14%, 인회석 5%, 흑니토 3%와 분해가 덜 된 소똥 5%, 완두 3%로 하였으며, 이를 이용해서 종자에 처리한 펠렛팅을 ‘DPA 펠렛팅 (Diatomite Perlite Apatite Pelleting)’으로 명명하고, 이와 대조로 DPA 펠렛팅 물질에서 인회석을 빼는 대신 펄라이트를 19% 비율로 높여서 종자처리 한 것을 ‘DP 펠렛팅 (Diatomite Perlite Pelleting)’으로 이름 붙여서 접종균주의 생균수 변화와 종자활력 그리고 작물생육에 대한 영향을 상호 비교하는데 사용하였다. 그리고 펠렛팅 단계에서 균주를 접종하지 않고 ‘DPA 펠렛팅’ 물질의 주성분인 규조토 (Diatomite) 만으로 펠렛 처리한 ‘Diatomite 펠렛팅’이 추진되었는데, 이는 일정기간 펠렛종자를 보관한 다음에 균주 접종에 따른 접종균주의 실내 작물뿌리 착생량 시험 (Table 4)과 균주접종 없이 포장에서의 작물생육영향 시험 (Table 5)에 사용하였다. 이 가운데 DPA 펠렛팅과 DP 펠렛팅을 위해서 PVA를 분무할 때는 초기에 규조토를 종자에 입히는 과정에 0.5% 용액을 사용하였고 펠렛팅 물질과 함께 미생물을 접종하는 중간단계에서는 1.0% 용액으로 처리했으며 마무리단계에서는 펠렛팅 물질이 잘 응집되도록 2.0% 용액으로 하였다. 이 때 드럼의 회전속도는 작업초기에 70 rpm, 중간단계에서는 150 rpm, 마무리단계에서는 450 rpm 이었다. *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228의 종자접종은 펠렛팅 물질이 수분을 65% 내외로 보유하면서 균주가 종자 당 10^4 - 10^5 cfu 가량 부착되도록 (Dobbelaere et al., 2002; Deaker et al., 2004) 액체의 PDB 배지에서 10^7 - 10^8 cfu mL⁻¹ 수준으로 배양한 배양액을 1.8 L 종자량 기준으로 참깨는 2,300 mL, 들깨는 2,400 mL씩 분무처리 하였다. 드럼 속에서 종자를 펠렛 처리한 직후에는 펠렛이 서로 엉기지 않도록 드럼을 돌리면서 열풍건조기로 2분간 건조시켰다. 이 때 펠렛 처리한 참깨와 들깨 종자의 입경은 2.8 - 3.35 mm 였고, 무게는 코팅 이전보다 5배가량 증가되어 100립중으로 참깨는 1.1 g, 들깨는 1.2 g 내외를 보였다. 이렇게 만든 펠렛종자는 수분함량이 40%가 되도록 18 - 20°C의 실온에서 2일간 건조시킨 뒤 시험조건에 따라 적절히 보관하면서 시험에 사용하였다. 참고로 종자 펠렛팅에 사용한 ‘DPA’ 물질의 화학성은 Table 1과 같이 pH (1:5) 6.9, 유기물 27.7 g kg⁻¹, 총 질소 0.12%, 유효인산은 48 mg kg⁻¹ 이었다. 한편, Diatomite 펠렛팅을 위한 PVA 분무처리에서는 DPA와 DP 펠렛팅의 과정에서와 같은 방법으로 하되, 수분을 조절용으로 균주배양액 대신 멸균수를 사용하였다.

Table 1. Chemical properties of ‘DPA’ material used for seed pelleting of sesame and perilla[†].

pH	EC	O.M.	T-N	Av. P ₂ O ₅
(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹
6.9	2.1	27.7	0.12	48

[†]DPA contained 70% diatomite, 14% perlite, 5% apatite, 5% cow-dung, 3% peat, and 3% pea.

펠렛접종 종자에서의 생균수 변화와 종자의 활력, 균주의 뿌리착생량 조사 접종균주의 생균수 조사는 ‘DP’와 ‘DPA’의 두 가지 처리물질로 펠렛팅 하면서 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228를 각각 단독으로 접종한 참깨와 들깨 종자를 사레에 담아 수분증발이 잘되지 않게 파라필름으로 감싼 후 실온 (18 - 20°C) 및 냉장 (4°C) 보관처리 하여 수행하였다. 조사는 총 4회로 종자의 보관 처리일로부터 2주, 4주, 6주, 7주 뒤에 실시하였다. 조사방법은 멸균수 10 mL를 담은 시험관에 펠렛종자 5립을 넣고 2분간 Voltex (Wisemix, VM-10)로 혼합 진탕시킨 뒤 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에 도말하여 28°C 항온배양하면서 취락을 계수하였다 (Kang et al., 2017). 종자 활력은 상기 균주를 단독 및 혼합 접종하여 2주간 실온 보관한 종자를 growth pouch에 5립씩 4반복으로 치상한 다음 5일 뒤에 발아율과 주근의 길이를 조사하여 처리별로 비교하였다. 그리고 종자펠렛접종 균주의 작물뿌리 착생량 조사는 ‘Diatomite’ 물질로 펠렛 처리한 종자에 *gus* gene이 도입된 균주를 접종하여 실시하였다 (Kang et al., 1997). 그 과정은 먼저 pmTn 5 SSgusA 20이 내장된 *Escherichia coli* S17-1의 *gusA* gene을 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228에 도입하여 배양한 다음, 이를 2주 동안 실온에서 보관한 Diatomite 펠렛팅 종자에 접종하여 48시간 무균 접종상에서 보관건조한 뒤 종자를 발근시켜서 균주의 뿌리 착생정도를 *gus* gene의 청색반응 검정법으로 확인하였다. 이 때 혼합접종은 단독접종에 사용된 균배양액을 혼합 처리함으로써 혼합접종구와 단독접종구의 성적을 비교할 수 있게 하였다. 균주의 뿌리착생량 조사 과정은 먼저 펠렛종자 5립을 멸균증류수를 담은 ‘growth pouch’에 4반복으로 치상한 뒤, 발아 7일째의 뿌리를 막자사발에 갈아서 멸균수로 희석한 다음 PDA 배지에 도말하여 28°C 항온배양 했을 때 나타난 취락수를 뿌리의 생체무게 (g) 기준으로 계수하였다.

펠렛처리된 참깨·들깨의 재배 작물의 포장 재배시험은 2차에 걸쳐 수행하였다. 1차 시험은 참깨와 들깨에 DPA펠렛접종 처리한 것과 균주접종 없이 구조토만으로 Diatomite 펠렛팅 처리한 것을 실온에서 38주간 보관한 다음, 국립식량과학원 남부작물부 시험포장에 파종하여 관행의 무처리 종자와 생육을 비교하였다. 2차 시험은 참깨를 대상으로 DPA펠렛접종 처리한 다음 실온에서 2주간 보관한 뒤, 경남 밀양시 삼랑진읍 임천리의 경상남도농업자원관리원 포장에 파종하여 관행의 무처리 종자와 생육을 비교하였다. 시험된 1차 시험지는 객토한 식양토로서 pH는 7.3 이었고, 유기물은 25.2 g kg⁻¹, 유효인산은 337 mg kg⁻¹ 함유하였다. 2차 시험지는 이현통의 사양토로서 pH는 5.6 이었고, 유기물은 15.0 g kg⁻¹, 유효인산은 180 mg kg⁻¹ 함유하였다. 작물재배용 비료는 참깨와 들깨 재배지 모두 10a 당 질소(N)-인산(P₂O₅)-칼리(K₂O)를 8-4-9 kg 사용하고 비닐을 피복한 다음, 재식거리를 30 × 10 cm로 해서 한 이랑에 2 열씩 10 cm 간격으로 점파하였다. 파종량은 주당 5립으로 하였으며, 발아 뒤에는 주당 한 개체만 재배하였다. 그리고 새 피해를 받아 유묘가 없는 곳은 보파해서 입모하였다. 펠렛접종 종자에 부착된 혼합균주 각각의 양은 RRj228과 구별되도록 KR083만 앞에서 언급한 ‘뿌리착생량 조사’ 때와 같은 방법으로 *gus* gene을 삽입해서 조사하였다. 시험구는 난괴법 3반복으로 배치하였는데, 1차 시험에서는 처리별로 40주 재배한 크기로 하였고 2차 시험에서는 처리별로 67.5 m² 크기로 해서 작물의 생육을 분석하였다.

통계분석 SAS 프로그램 9.1.3 버전 (2006)으로 성적을 분석하였다.

Results

종자펠렛접종 균주의 생균수 변화 PGPR 균주 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228을 단독으로

펠렛접종한 참깨와 들깨 종자를 실온과 냉장 보관했을 때 조사된 생균수 변화는 Table 2와 같았다. 먼저 펠렛팅 물질의 영향을 보면, 펠렛접종 종자의 보관방법에 따라서 생균수의 변화경향이 달랐다. 즉, 펠렛접종 종자를 6주 이상 실온보관 했을 때는 참깨에서만 두 균주 모두 생균수가 DPA처리 종자보다 DP처리 종자에서 많은 경향이있었지만 들깨에서는 처리 간에 그와 같은 뚜렷한 경향이 없었다. 반면에 냉장 보관 했을 때는 참깨의 경우 두 균주 모두 보관 6주까지는 DP처리 종자에서, 보관 7주 뒤에는 DPA처리 종자에서 각각 더 많이 증가된 경향이었다. 들깨에서는 두 균주 다 6주 뒤부터 DPA처리 종자가 DP처리보다 많은 생균수 증가를 보인 경향이었다. 이 때 2주 보관종자 대비 7주 보관종자에서의 생균수 증가정도는 DPA처리 종자가 DP처리보다 더 컸는데, KR083의 경우 그 차이는 참깨와 들깨에서 각각 165배와 11배, RRj228은 각각 254배와 980배에 달했다. 실온 및 냉장조건에서 7주 보관한 종자의 생균수 분포는 KR083의 경우 2주 보관종자보다 참깨에서 9.9 (DPA처리 실온보관) - 25.7배가량 (DP처리 실온보관) 더 많이 증가되어 10^5 (DPA처리 실온 · 냉장 보관) - 10^6 (DP처리 실온 · 냉장 보관) cfu seed⁻¹ 수준을 보였지만, 들깨에서는 70 (DP · DPA처리 냉장보관) - 80% (DP · DPA처리 실온보관) 가까이 줄어 든 10^4 cfu seed⁻¹ 수준에 불과하였다. 그리고 RRj228는 2주 보관종자보다 7주 보관종자에서 50% 가량 줄어들거나 (DP처리 냉장보관) 현상유지 (DPA처리 실온보관) 내지 3.0배가량 (DPA처리 냉장보관) 증가되었다. 그 결과 RRj228 균주는 KR083균주보다 10% 가량 낮은 10^4 (DP처리 냉장보관) - 10^5 (DP처리 실온보관, DPA처리 실온 · 냉장보관) cfu seed⁻¹ 수준의 균수를 보였다. 들깨에서는 7주 보관 종자에서 1.5 (DP처리 냉장보관) - 11.3배가량 (DPA처리 냉장보관) 증식되어 참깨에서보다 10배 이상 많은 10^5 (DP처리 냉장보관) - 10^6 (DP처리 실온보관, DPA처리 실온 · 냉장보관) cfu seed⁻¹ 수준의 생균수를 나타내었다. 결과적으로 참깨와 들깨 종자에 펠렛접종된 KR083 균주는 참깨에서, RRj228 균주는 들깨에서 상대적으로 많이 증

Table 2. Relative changes in survival rates of *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 according to storage conditions of sesame and perilla seeds treated with different pellet materials.

Treatments		Room temperature of 18 - 20°C				Refrigerator temperature of 4°C			
Pelleting materials	Inocula	2-week after inocul. (WAI) [†]	4-WAI	6-WAI	7-WAI	2-week after inocul. (WAI) [†]	4-WAI	6-WAI	7-WAI
----- Sesame -----									
DP [§]	KR083	100	481	844	2571	100	440	620	1150
	RRj228	100	136	184	119	100	58	164	46
DPA [‡]	KR083	100	697	803	987	100	507	438	1315
	RRj228	100	51	57	101	100	39	76	300
----- Perilla -----									
DP	KR083	100	159	70	29	100	55	55	33
	RRj228	100	141	83	453	100	99	78	151
DPA	KR083	100	41	54	22	100	48	85	44
	RRj228	100	196	112	720	100	85	338	1131

[†]Populations ($\times 10^4$ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 7.7 and 13.7 for DP, 7.6 and 15.4 for DPA on sesame; 13.2 and 48.1 for DP, 15.2 and 67.1 for DPA on perilla, respectively.

[‡]Populations ($\times 10^4$ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 10.0 and 22.6 for DP, 7.3 and 4.6 for DPA on sesame; 12.5 and 51.5 for DP, 10.9 and 22.0 for DPA on perilla, respectively.

[§]DP contained 70% diatomite, 19% perlite, 5% cow-dung, 3% peat, and 3% pea.

[¶]See foot note to Table 1.

식된 경향이였다. 그리고 7주 동안 냉장 보관했을 때 DPA 처리종자에서의 생균수는 실온 보관했을 때보다 2주 보관 종자를 기준으로 참깨와 들깨에서 KR083의 경우 각각 33%와 200%, RRj228은 각각 297%와 57% 더 많았다.

펠렛접종 종자의 활력 참깨와 들깨의 펠렛종자를 2주 동안 실온보관한 뒤 growth pouch에 치상했을 때 종자의 발아율과 뿌리신장 상태는 Table 3 및 Fig. 1과 같았다. 종자의 발아율을 펠렛팅 물질별로 보면, *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228을 혼합 접종한 경우 참깨에서는 DPA 처리 종자가 DP 처리 종자보다 5% 가량 더 높았다. 들깨에서도 마찬가지로 DPA 처리종자에서 15% 가량 더 높았다. 그러나 균주를 혼합 접종한 종자의 발아율은 무접종 종자에 비해서 참깨에서는 차이가 없었지만, 들깨의 경우는 DP 처리 종자에서 45% 떨어졌고 DPA 처리 종자에서는 15% 가량 떨어졌다 ($p < 0.05$). 한편 DPA 처리 종자 중에서 균주를 단독으로 접종한 KR083 접종종자의 발아율은 참깨와 들깨 모두에서 무접종 종자와 차이가 없었지만 RRj228 접종종자의 발아율은 참깨와 들깨에서 무접종 종자보다 각각 20%와 10% 더 낮았다 ($p < 0.05$). 그리고 뿌리의 신장 정도는 발아율에서처럼 참깨와 들깨 모두 KR083과 RRj228을 혼합접종하면서 DPA 처리한 것이 DP 처리한 것보다 컸으며, 그 정도는 28 (들깨) - 60% (참깨) 수준이었다. 혼합접종 종자의 뿌리신장 정도를 무접종 종자와 비교하면 DPA로 펠렛팅 한 참깨에서만 37% 증가되었고 ($p <$

Table 3. Effectiveness of *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 on the germination and root elongation of sesame and perilla seeds treated with different pellet materials after two weeks of storage at room temperature[†].

Items	DP pelleting		DPA pelleting			
	Noninoculated	KR083 + RRj228	Noninoculated	KR083 + RRj228	KR083	RRj228
----- Sesame -----						
Germination rate (%)	90ab [§]	95a	100a	100a	100a	80b
Root length [‡] (cm)	8.9a	7.8b	9.1b	12.5a	11.5a	7.0b
----- Perilla -----						
Germination rate (%)	80a	35b	65a	50b	60ab	55b
Root length (cm)	9.9a	5.3b	8.1b	6.8bc	10.8a	7.9b

[†]Populations ($\times 10^4$ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 3.9 and 7.9 for DP, 3.8 and 7.7 for DPA on sesame; 6.6 and 14.0 for DP, 7.6 and 33.5 for DPA on perilla, respectively. The seeds were pelleted with DP and DPA materials mentioned in the foot notes to Table 2 and 1, respectively.

[‡]Root length was estimated five days after placing the seeds on growth pouch.

[§]Means least significant difference at 5% level by DMRT.

Fig. 1. Images of microscopic transverse section (50 fold magnification) of a sesame seed pelleted with 'DPA' material together with a mixture of PGPR strain *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 (Left), a sesame seedling from the seed pellet (Center) and its growing status in 'growth pouch' (Right).

0.05) 들깨에서는 16% 감소된 경향이나 유의성이 없었다. 그러나 DP처리 참깨와 들깨에서는 각각 12% ($p < 0.05$)와 46% ($p < 0.05$) 감소되었다 한편, 미생물의 단독접종에 따른 DPA처리 종자의 뿌리 신장 정도는 발아율의 경향과 같이 KR083 균주를 접종한 것이 RRj228 균주를 접종한 것보다 컸으며, 그 정도는 37 (들깨) - 64% (참깨) 범위였다. 그러나 이러한 KR083 균주의 뿌리신장 촉진 효과는 KR083과 RRj228을 혼합 접종했을 때의 효과에 비해 참깨에서는 오히려 8% 감소되었고 들깨에서는 48% 증가된 것으로 나타났다.

종자펠렛접종 균주의 뿌리착생량 참깨와 들깨를 구조토로 펠렛팅 한 Diatomite 펠렛팅 처리종자에 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228을 접종했을 때 이들의 뿌리착생량을 분석한 결과는 Table 4와 같았다. KR083 균주와 RRj228 균주는 단독으로 접종했을 때보다 서로 혼합해서 접종했을 때 참깨와 들깨의 뿌리에 더 많이 착생하는 경향이였다. 참깨와 들깨 뿌리에서의 착생량 증가정도는 KR083의 경우 각각 46%와 713%였고, RRj228은 각각 32%와 56%였다. 그 결과 KR083과 RRj228의 뿌리착생 비율은 단독 접종했을 때 참깨에서 1:1.2였던 것이 혼합 접종 함으로써 1:1.1로 낮아졌고, 들깨에서는 1:5.8이었던 것이 1:1.1 수준까지 낮아졌다.

Table 4. Enumeration of *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 colonizing rhizoplane and/or inside roots of sesame and perilla pelleted with diatomite only.

Inocula [†]	Sesame		Perilla	
	KR083	RRj228	KR083	RRj228
	----- × 10 ³ cfu per root fresh wt., g -----			
KR083	334	-	30	-
RRj228	-	410	-	175
KR083 + RRj228	487	543	244	273

[†]Populations (×10⁴ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 3.5 and 4.0 on sesame; 2.0 and 2.2 on perilla, respectively.

펠렛처리한 참깨, 들깨의 생육상황 Table 3에서 펠렛종자의 활력이 우수했던 DPA를 펠렛팅 물질로 이용하여 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228을 혼합접종 처리하여 재배한 참깨와 들깨의 생육상황은 Table 5, 6과 같았다. 먼저 펠렛접종한 종자를 38주 동안 실온 보관한 뒤 pH가 7.3인 식양토에 파종하여 재배한 결과 Table 5과 같이 PGPR 균주 접종구에서 작물의 생장촉진과 함께 역병 (phytophthora blight) 의 발생억제 효과를 보였다. 처리별로 보면, 참깨의 경우 DPA처리 접종구 > 구조토처리 무접종구 > 무펠렛 무접종구 (대조구) 순으로 경장이 길고 식수가 많았다. 파종 후 72일째 조사한 역병 발생율은 DPA처리 접종구에서 구조토처리 무접종구와 무펠렛 무접종구 (대조구)보다 10% 낮았다. 그러면서 참깨의 종자수량은 대조구 성적을 기준으로 DPA처리 접종구에서 54% 증가된 1,485 kg ha⁻¹을 보였고, 구조토처리 무접종구에서는 16% 증가된 1,124 kg ha⁻¹을 나타내었다. 들깨의 경우 파종 10주와 12주째 수확한 깻잎의 평균수량이 DPA처리 접종구에서 구조토처리 무접종구보다 29% 증가된 경향이였다. 그리고 참깨를 DPA로 펠렛접종 처리하여 2주 동안 실온보관한 뒤에 pH 5.6의 사양토에 파종하여 재배한 성적은 (Table 6) 관행적인 무펠렛 무접종의 대조구에 비해서 식물체 당 식수만 1개 정도 적었을 뿐, 경장과 역병 발생률, 천립중 측면에서 더 좋았다. 특히 역병 발생률은 20%나 감소되었고 천립중은 7% 증가되면서 참깨수량이 대조구보다 18% 증수된 1,160 kg ha⁻¹ 인 것으로 분석되었다 ($p < 0.05$). 뿐만 아니라 파종직후 새 피해 때문에 참깨의 유효묘가 하나도 없는 파종구의 비율이 대조구에서는 59%에 달했지만 DPA처리 접종구는 18%에 그쳤다 (Table 생략). 그리고 수확기 토

Table 5. Growth characteristics and yields of sesame and perilla inoculated with mixture of *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 in silty loam soil.

Treatments	Sesame					Perilla leaf yields [§]
	Stem length	Incidence of phytophthora blight [†]	Capsule no. per plant	Seed no. per capsule	Seed yields	
	cm	% of plant	no.	no.	kg ha ⁻¹	g plant ⁻¹
Control	101.2	55.0	60.7	58.4	965b [¶]	-
Diatomite pelleting noninoculated	105.2	55.0	69.0	52.0	1,124b	93.1b
DPA pelleting [†]	111.7	45.0	85.0	50.0	1,485a	120.4a

[†]Populations ($\times 10^4$ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 76.7 and 28.0 on sesame; 66.0 and 347.0 on perilla, respectively. The seeds were inoculated by pelleting with materials mentioned in foot note to Table 1 and stored at room temperature for 38 weeks before planting.

[‡]Investigated at late flowering stage, 72-day after sowing.

[§]Means of yields harvested in 10- and 12-week after sowing.

[¶]Means least significant difference at 5% level by DMRT.

Table 6. Growth characteristics and yields of sesame inoculated with mixture of *Bacillus* sp. KR083 and *Pseudomonas* sp. RRj228 in sandy loam soil.

Treatments	Stem length at flowering stage	Incidence of phytophthora blight [†]	Capsule no. per plant	1,000-seed wt.	Seed yields
	cm	% of plant	no.	g	kg ha ⁻¹
Control	88.8	25	49.8	2.9	983b [§]
DPA pelleting [†]	97.0	5	48.9	3.1	1,160a

[†]Populations ($\times 10^4$ cfu per seed) of KR083 and RRj228 were 5.3 and 2.2, respectively. The seed was inoculated by pelleting with materials mentioned in foot note to Table 1 and stored at room temperature for 2 weeks before planting.

[‡]Investigated at harvesting stage.

[§]Means least significant difference at 5% level by DMRT.

양의 미생물상을 분석한 (NICS, 2014) 결과, *Bacillus* sp.의 밀도는 대조구 205×10^4 cfu와 접종구 252×10^4 cfu 간에 유의적인 차이가 없었지만, *Pseudomonas* sp.는 대조구 2.13×10^4 cfu와 접종구 5.17×10^4 cfu 간에 유의적인 ($p < 0.05$) 차이를 나타내었다 (Table 생략).

Discussion

식물생장촉진 미생물인 PGPR의 실용성 향상을 위한 방안으로 종자처리 접종법이 다양하게 강구되었지만 (Muller and Berg, 2008; O'Callaghan, 2016), 균주의 특성에 맞게 생균수를 적절히 확보하는 것이 해결과제로 남아 있다 (Deaker et al., 2004; Hartley et al., 2012). 이러한 배경에서 참깨와 들깨 종자를 대상으로 PGPR 균주 접종용 펠렛팅 후보물질 'DPA'- 규조토와 펄라이트, 인회석, 흑니토, 소풍분말, 완두분말의 조성물- 의 실용성을 검토한 결과, 7주 보관 펠렛접종 종자에서 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228의 생균수 확보 (Table 2)와 종자의 활력의 유지 (Table 3, Fig. 1) 측면에서 인회석이 들어가지 않은 'DP'보다 우수한 경향을 보인 것으로 확인되었다. Deaker et

al. (2004)은 미생물을 종자에 접종할 때 고분자 점착물질을 이용하면 접종균의 생존율을 높일 수 있다고 하였는데, 이처럼 인회석이 들어간 DPA로 펠렛접종 한 것이 생균수 확보에 유리했던 것은 인회석의 pH 교정효과와 (Kloepper et al., 1988) 인산 공급의 영향이 크게 반영된 결과가 아닌가 생각되었다. 그리고 이러한 생균수의 변화차이 경향은 보관 기간이 길어질수록 실온보다 냉장보관 종자에서 더 뚜렷하였는데, 이 같은 현상은 *Serratia plymuthica*를 접종한 평지종자 (Muller and Berg, 2008), *Pseudomonas fluorescens*을 접종한 양파종자 (O'Callaghan et al., 2006), *Pseudomonas putida*를 접종한 단무종자 (Shah-Smith and Burns, 1997)에서도 확인되었다. 본 연구에서 조사된 냉장보관 DPA펠렛접종 종자에서의 생균수를 경시적으로 살펴보면, 2주 보관종자에서의 생균수 기준으로 KR083은 들깨에서 4주부터 7주까지 15 (6주 보관종자) - 56% (7주 보관종자) 가량 떨어졌고, RRj228은 참깨에서 4주와 6주 후에 각각 61%와 24% 가량 떨어진 경향이였다. 그러나 7주 냉장보관종자에서의 생균수는 2주 냉장보관종자에 비해서 KR083의 경우 들깨에서 여전히 50% 이상 감소하긴 했지만 참깨에서는 오히려 13배가량 증가되었고, RRj228은 참깨와 들깨에서 각각 3배와 11배가량 증가된 결과를 보였다. 그러면서 7주 동안 냉장 보관한 참깨와 들깨의 DPA펠렛접종 종자에서의 생균수는 KR083의 경우 각각 9.6×10^5 cfu와 4.8×10^4 cfu, RRj228은 각각 4.6×10^5 cfu와 2.5×10^6 cfu로 확인되었다. 이처럼 시간이 지나면서 생균수의 증가경향이 우세했던 것은 저온조건이 균주의 대사활동을 줄여 (O'Callaghan, 2016) 초기 생장을 억제시키기는 했으나 보관기간이 길어지면서 접종된 균주가 DPA펠렛 물질의 구성분을 (Table 1) 영양원으로 이용할 수 있었기 때문이 아닌가 생각되었다 (Augustin and Rahman, 2010; USDA, 2011). 그렇지만 Table 6에서와 같이 실온에서 38주 동안 보관한 DPA펠렛접종 종자에서도 7주 냉장보관 종자에서와 유사한 10^5 - 10^6 cfu 의 실용적 수준의 (Dobbelaere et al., 2002; Kang et al., 2017) 생균수를 보여 DPA펠렛 물질의 영향에 대해서 다각도로 검토할 필요가 있는 것으로 생각되었다. 또한 KR083은 환경에 내성이 강한 *Bacillus* 속 균주임에도 불구하고 (Lopez et al., 2009) 참깨에서의 *Pseudomonas* sp. RRj228과는 대조적으로 7주 보관한 들깨종자에서도 감소를 보인 것은 KR083 균주에 대한 들깨 특유의 생육저해 작용이 있었던 것이 아닌가 생각되어 이같은 작물의 영향에 대한 검토가 필요한 것으로 보여진다. 종자를 DPA로 펠렛팅하면서 생리적 특성이 다른 균주들의 상호보완적인 식물생장 촉진효과를 기대할 목적으로 (Kang et al., 1991; Kozhevin and Korchmaru, 1995; Guetsky et al., 2001; Babana and Antoun, 2006) 검토한 KR083과 RRj228 혼합접종 종자의 활력은 2주간 실온보관한 참깨와 들깨 종자의 발아율에서 DP펠렛종자보다 각각 5%와 15% 더 높았고, 뿌리신장에서는 각각 60%와 28% 더 촉진되는 효과를 보였는데 (Table 3), 이러한 활력차이 역시 시험된 'growth pouch'에서 수분이 공급되면서 균주가 DPA 조성물의 영양분을 효과적으로 이용하여 식물생장촉진 기능을 발휘한 결과로 해석되었다. 그리고 이들 균주를 단독접종했을 때의 종자 활력은 KR083을 접종한 것이 RRj228을 접종한 것보다 좋았는데 ($p < 0.05$), 그 성적은 참깨와 들깨 모두 무접종 종자에 뒤지지 않았고 KR083과 RRj228의 혼합접종 종자에 비해서도 참깨에서 유의적인 차이가 없었으며 들깨에서는 오히려 더 좋은 경향이였다. 이러한 현상은 *Bacillus* 속 균주가 종자의 발아를 촉진하는 것으로도 알려져 있긴 (Minaxi et al., 2012) 하지만, 우수한 접종효과의 확보 측면에서 (Guetsky et al., 2001; Babana and Antoun, 2006) Table 2에서의 작물별 접종균주의 상반된 생균수 변화 경향의 문제와 함께 더 검토되어야 할 균주와 작물 간의 생리생태적 연관사항이 아닌가 생각되었다 (Roberts et al., 1992; Kang et al., 2010; Ahemad and Kibret, 2014; Kang et al., 2017). 특히 RRj228을 접종한 종자의 활력은 들깨보다 참깨에서 더 부진한 경향이었고 KR083과 달리 무접종 종자보다도 못한 것으로 나타났는데 ($p < 0.05$), 이는 전보 (Kang et al., 2017)에서 소개한 것처럼 RRj228이 상대적으로 낮은 접종농도에서 식물의 성장을 촉진하지만 높은 농도에서는 오히려 성장을 억제하는 특성을 지니고 있어 펠렛

종자에 부착된 생균수가 적정농도보다 높았기 때문에 생긴 현상이 아닌가 생각되었다 (Kloepper et al., 1988; Deaker et al., 2004). 이에 따라 RRj228 균주를 효율적으로 이용하기 위해서는 작물에 알맞는 접종농도의 설정연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 판단되었다 (Dobbelaere et al., 2002; Herrmann and Lesueur, 2013; O'Callaghan, 2016; Kang et al., 2017). 한편 PGPR 균주가 식물의 성장촉진효과를 보이려면 제일먼저 뿌리착생이 알맞게 이루어져야 하는 데 (Persello-Cartiaux et al., 2003; Vessey, 2003), 시험된 균주의 뿌리착생량은 (Table 4) 단독으로 접종한 KR083의 경우 참깨와 들깨에서 각각 RRj228보다 19%와 83% 낮은 성적을 보여 Table 2의 생균수 변화경향처럼 작물에 따라 싹틔움현상이 컸음을 알 수 있었다. 그러나 이들을 혼합접종했을 때는 두 균주 모두 단독접종했을 때의 착생량보다 32 (참깨에서의 RRj228) - 713% (들깨에서의 KR083) 수준까지 크게 향상되면서 두 작물에서 각 균주의 착생 비율이 거의 1:1 수준으로 조정된 경향을 보였다. 그렇지만 RRj228이 같은 농도의 KR083에 비해서 성장억제작용이 큰 점을 감안할 때 (Kang et al., 2017) 이 비율이 KR083과 RRj228의 상호보완적인 효과 발현에 바람직한 것인지는 의문시 되었다. 그리고 이러한 작물별 균주의 뿌리착생 경향과 관련해서, Kang et al. (2017)은 논물접종 시험을 통해 이들이 단독접종했을 때와 혼합접종했을 때 다 같이 한국의 통일형 벼보다 자포니카형의 벼 뿌리 내부에 잘 착생됨을 확인한 바 있다. 이상의 성적을 바탕으로 DPA 펠렛팅 처리와 함께 식물체 내부에 착생이 가능한 PGPR 균주 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228을 혼합접종한 종자를 포장에 파종했을 때, 참깨는 사양토와 식양토에서 경장이 길어지고 역병 피해가 각각 20%와 10% 가량 줄면서 무펠렛 무접종구 대비 18% 이상 증수되었고 ($p < 0.05$), 들깨는 식양토에서 균주접종 없이 구조토만으로 펠렛팅 한 것보다 앞 생산량이 29% 증수된 결과를 보였다 ($p < 0.05$). 또한 식양토에서의 참깨 수확기 토양에서는 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.가 여전히 많이 분포하고 있었는데 (‘펠렛 처리한 참깨, 들깨의 생육상황’ 결과 설명 참조), 이는 접종된 균주가 작물의 생장에 상당부분 기여할 수 있었음을 뜻하는 해석되었다. 특히 식양토에서의 이 같은 성적은 펠렛접종 종자를 실온에서 38주 동안 보관해서 얻은 것이기 때문에 균주의 효능과 함께 DPA 펠렛팅의 실용성을 보여주는 것으로 평가되었다 (Muller and Berg, 2008; O'Callaghan, 2016). 그러나 PGPR 균주를 이용해서 보다 좋은 식물생장 촉진과 병 발생억제 효과를 기대하기 위해서는 균주의 생존과 관련된 토양환경문제를 감안하면서 (Kloepper et al., 1988) 다양한 혼합가능 균주의 작용기작과 뿌리착생 능력을 고려한 (Kozhevnikov and Korchmaru, 1995; Kang et al., 2017) 작물별 최적의 혼합접종비율을 다각도로 규명하는 노력이 있어야 할 것으로 생각된다 (Begum et al., 2010; Herrmann and Lesueur, 2013; O'Callaghan, 2016).

Conclusions

PGPR 균주를 이용한 소립종자의 바람직한 펠렛접종 정보를 얻기 위해 참깨 (양백깨)와 들깨 (남천들깨)을 대상으로 *Bacillus* sp. KR083과 *Pseudomonas* sp. RRj228의 종자펠렛접종 시험을 수행한 결과는 다음과 같았다. 펠렛팅 물질로 DPA- 구조토 70%와 펠라이트 14%, 인회석 5%, 소똥 5%, 흑니토 3%, 완두 3%의 조성물-을 이용하여 균주를 종자에 펠렛접종한 뒤 7주 동안 냉장 보관했을 때의 생균수는 실온보관에 비해 참깨와 들깨에서 KR083의 경우 각각 33%와 200%, RRj228은 각각 297%와 57% 더 많았다. 그리고 냉장보관 기간에 따른 생균수는 7주 보관 종자에서 2주 보관종자보다 KR083의 경우 들깨에서 56% 가량 감소했지만 참깨에서는 13배가량 증가하였고, RRj228은 참깨와 들깨에서 각각 3배와 11배가량 증가되었다. 그리고 실온에서 2주 보관한 종자의 활력에 있어서는 KR083을 참깨와 들깨에 단독 접종하거나 RRj228과 함께 참깨에 혼합 접종한 펠렛종자가 무접종 종자에 비해 발아율의 차이가 없거나 뿌리발달이 촉진되는 ($p < 0.05$) 경향을 보였다. 반면에 RRj228을 단독 접종한 종자에서는 발아율이 낮았다 ($p <$

0.05). 균주의 작물뿌리 착생량은 단독접종한 KR083의 경우 RRj228보다 참깨와 들깨에서 각각 19%와 83% 낮아 생균수의 경향처럼 작물별로 쏠림현상이 컸지만 두 균주를 혼합 접종했을 때는 균주 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 포장시험으로 KR083과 RRj228을 함께 DPA 펠렛접종 처리한 종자를 38주 실온보관 후 재배한 식양토와 2주 동안 실온보관 후 재배한 사양토에서 참깨는 무펠렛 무접종구의 것보다 역병피해가 각각 10%와 20% 줄면서 수량이 18% 이상 높았다 ($p < 0.05$). 들깨는 38주 동안 실온에 보관하여 재배한 식양토에서 구조토만으로 펠렛팅 한 무접종구의 것보다 잎 생산량이 29% 증가되었다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로 볼 때, DPA를 이용한 PGPR 균주의 종자펠렛접종은 균주를 작물에 맞게 적절히 선택해서 처리할 경우 소립종자의 저투입 재배에 기여할 수 있을 것으로 판단되었다.

References

- Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J. King Saud University - Science 26:1-20.
- Amer, G.A. and R.S. Utkhede. 2000. Developments of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. Can. J. Microbiol. 46:809-816.
- Augustin, C. and S. Rahman. 2010. Composting Animal Manures: A guide to the process and management of animal compost; NDSU Extension Service, North Dakota State University: Fargo, ND, USA. p.1-8.
- Babana, A.H. and H. Antoun. 2006. Effect of Tilemsi phosphate rock solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. Plant Soil 287:51-58.
- Backman, P.A., P.M. Brannen, and W.F. Mahaffee. 1994. Plant responses and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. p.3-9. In Ryder, M., P.M. Stephens, and C.D. Bowen (ed.) Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO Division of Soil, Adelaide, Australia.
- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, and J. Dobereiner. 2001. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biol. Fertil. Soils 30:485-491.
- Bashan, Y., L.E. de-Bashan, S.R. Prabhu, and Juan-Pablo Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant Soil 378:1-33.
- Begum, M.M., M. Sariah, A.B. Puteh, M.A. Zainal Abidin, M.A. Rahman, and Y. Siddiqui. 2010. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. Biol. Control 53:18-23.
- Caballero-Mellado, J., L.E. Fuentes-Ramirez, V.M. Reis, and E. Martinez-Romero. 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. Appl. Environ. Microbiol. 61:3008-3013.
- Catroux, G., A. Hartmann, and C. Revellin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant Soil. 230: 21-30.
- de Freitas, J.R. and J.J. Germida. 1990. Plant growth-promoting rhizobacteria for winter wheat. Can. J. Microbiol. 36:265-272.
- Deaker, R., R.J. Roughley, and I.R. Kennedy. 2004. Legume seed inoculation technology - a review. Soil Biol. Biochem. 36:1275-1288.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, Y. Okon, and J. Vanderleyden. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol. Fertil. Soils 36:284-297.
- Elzein, A. A. Heller, B. Ndambi, M. de Mol, J. Kroschel, and G. Cadisch. 2010. Cytological investigations on colonization of sorghum roots by the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. strigae and its implications for

- Striga control using a seed treatment delivery system. *Biol. Control* 53:249-257.
- Furnkranz, M., E. Adam, H. Muller, M. Grube, H. Huss, J. Winkler, and G. Berg 2012. Promotion of growth, health, and stress tolerance of Styrian oil pumpkins by bacterial endophytes. *Eur. J. Plant Pathol.* 143:509-519.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, Y. Elad, and A. Dinoor. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathol.* 91:621-627.
- Hartley, E.J., L.G. Gemell, and R. Deaker. 2012. Some factors that contribute to poor survival of rhizobia on preinoculated legume seed. *Crop Pasture Sci.* 63:858-865.
- Herrmann, L and D. Lesueur. 2013 Challenges in formulation and quality of biofertilisers for successful inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:8859-8873.
- Kang, B.G., W.T. Kim, H.S. Yun, and S.C. Chang. 2010. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol.* 4:179-183.
- Kang, J.S. 2014. Development of seed treatment and nondestructive classification technology. Available on line at: <http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201400029993>. Accessed in March 2019.
- Kang, J.S., B.G. Son, Y.W. Choi, Y.J. Lee, W.H. Joo, C.S. Lim, and Y.H. Park. 2009. Effects of dehydration methods and storage conditions on germinability of pelleted carrot seeds. *J. Life Sci.* 19:526-531.
- Kang, U.G., H.M. Park, J.Y. Ko, J.S. Lee, W.T. Jeon, C.Y. Park, K.D. Park, and V.K. Chebotar. 2017. Isolation, root colonization and evaluation of some plant growth-promoting rhizobacteria in paddy rice. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 50:135-149.
- 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. and V.K. Chebotar. 2002. Development of new plant-growth promoting bioinoculants for sustainable agriculture. In Final report of cooperative research project between the Rural Development Administration of Korea and All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology of Russia, Rural Development Administration, Suwon, Korea.
- Kang, U.G., V.K. Tchepotar, C.A. Asis Jr., H.S. Ha, and S. Akao. 1997. Nodulation competitiveness and nitrogenase activity of *gusA*-marked *Rhizobium meliloti* in alfalfa. *Soil Microorganisms* 50:45-49.
- Kloepper, J.W., D.J. Hume, F.M. Scher, C. Singleton, B. Tipping, M. Lalibert, K. Frauley, T. Kutchaw, C. Simonson, R. Lifshitz, I. Zaleska, and L. Lee. 1988. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (Rapeseed). *Plant Dis.* 72:42-46.
- Kloepper, J.W. and M.N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. of the 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria, Angers. 2:879-882.
- Klopper, J.W. and M.N. Schroth. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathol.* 71:642-644.
- Kloepper, J.W., M.N. Schroth, and T.D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathol.* 70:1078-1082.
- Kozhevina, P.A. and S.S. Korchmaru. 1995. On theoretical substantiation of the use of microbial fertilizers. *Soil Biol.* 50:45-52.
- Lopez, D, H. Vlamakis, and R. Kolter. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:152-163.
- Mahaffee, W.F. 1991. Effects of edaphic factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. In Cotton root colonization by plant growth-promoting rhizobacteria: determination of effecting factors and development of a luciferase marker. MS thesis, Auburn University, Auburn, Ala.

- Minaxi, L.N, R.C. Yadav, and J. Saxena. 2012. Characterisation of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. *Appl. Soil Ecol.* 59:124-135.
- Muller, H., and G. Berg. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia entomophila* HRO-C48 on Verticillium wilt in oilseed rape. *BioControl.* 53:905-916.
- NICS. 2014. An analysis handbook for the environment of staple crop. National Institute of Crop Science, Suwon, Korea.
- O'Callaghan, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:5729-5746.
- O'Callaghan, M., J. Swaminathan, J. Lottmann, J.D. Wright, and T.A. Jackson. 2006. Seed coating with biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *NZ Plant Prot.* 59:80-85.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnol.* 3:223-228.
- Park, Y.S., K. Park, J.W. Kloepper, and C.M. Ryu. 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria stimulate vegetative growth and asexual reproduction of *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Pathol. J.* 31:310-315.
- Persello-Cartieaux, F., L. Nussaume, and C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobia interactions. *Plant, Cell and Environment.* 26:189-199.
- Rekha, P.D., W.A. Lai, A.B. Arun, and C.C. Young. 2007. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresour. Technol.* 98:447-451.
- Roberts, D.P., C.J. Sheets, and J.S. Hartung. 1992. Evidence for proliferation of *Enterobacter cloacae* on carbohydrates in cucumber and pea rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* 38:1128-1134.
- Shah-Smith, D.A., and R.G. Burns. 1997. Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings. *Biocontrol Sci. Tech.* 7:65-74.
- Trifonova, R., J. Postma, M.T. Schilder, and J.D. van Elsas. 2009. Microbial enrichment of a novel growing substrate and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 58:632-641.
- USDA NRCS. 2011. Carbon to nitrogen ratios in cropping systems. Available at: http://www.nrcs.usda.gov/wps/PA_NRCSConsumption/download?cid=nrcs142p2_052823&ext=pdf. Accessed in March 2019.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- Zhang, J.X, A.G. Xue, and J.T. Tambong. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Dis.* 93:1317-1323.