ISSN 0367-6315 (Print) / ISSN 2288-2162 (Online)
Korean J. Soil Sci. Fert. 47(1), 28-35 (2014)
http://dx.doi.org/10.7745/KJSSF.2014.47.1.028

Article

Effects of Cover Plants on Soil Microbial Community in a Organic Pear Orchard

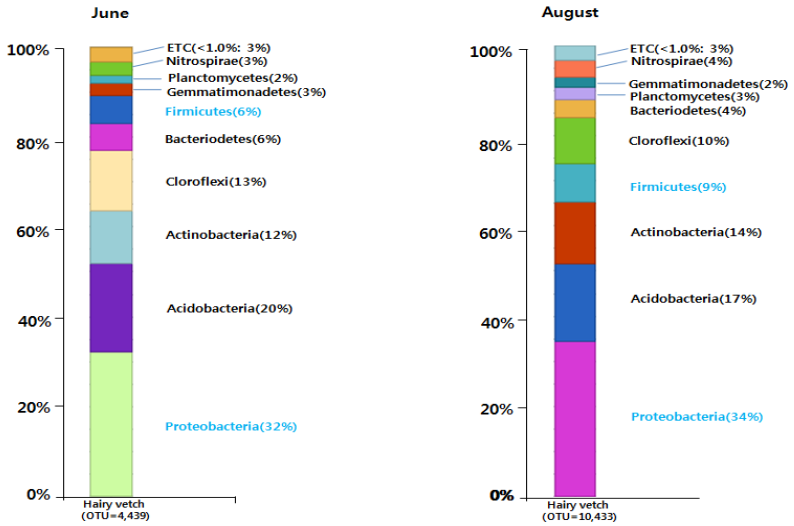
Young-Ju Oh, Soo-In Sohn[1], Yang-Ik Song[2], Seok-Boem Kang[3], and Jin-Ho Choi[4]*

Institute for Future Envionmental Ecology Co., Ltd, Suwon, 441-853, Korea
[1]National Academy of Agricultural Science, Suwon, 441-707, Korea
[2]Apple Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Gunwi 716-812, Korea
[3]Citrus Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Jeju 699-946, Korea
[4]Pear Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Naju 520-821, Korea

(Received: October 10 2013, Accepted: January 21 2014)

Due to recent interest of the consumers on safe farm products and the government's political support for eco-friendly agriculture, organic fruit production has been growing continuously. This research was conducted in order to study the effect of cover plants on soil microbial community on cover plants and establish an organic fruit cultivation method through choosing optimal cover plant. As a result of investigating soil microbial population density, the bacterial density in soil showed an increasing trend in June compared to April, and there was a decreasing trend in bacterial density of the soil in August compared to June. The density of actinomycetes in soil increased around 1.6 times in June compared to April when the soil was covered with hairy vetch. The increase of filamentous fungus in crimson clover group was 6.1 times higher in June compared to April and in hairy vetch group, the increase was 4.9 times higher in June compared to April. As a result of analyzing DNA extracted from the soil categorized by different types of cover plants using DGGE method, soil collected from April had higher number of bands detected from different locations according to different types of cover plants. Diversity of the bands from the soil collected from August showed higher range of reduction. As a result of analyzing soil microbial community by different period and the types of cover plants using Pyrosequencing method, microbes were detected in the order of *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, and *Firmicutes*. Distribution rate of *Firmicutes* increased in the soil collected in August compared to June and this was shown in all types of cover plants by twice the amount.

Key words: Cover plant, Soil microbial community, 16S rDNA



Comparison analysis of relative abundance of microbial phyla in the June and August pear orchard soils hairy vetch. OTU, operational taxonomic unit.

*Corresponding author : Phone: +82613301562, Fax: +82613301533, E-mail: pearchoi@korea.kr
§Acknowledgement: This study was carried out with the support of "Cooperative Research Program for National Institute of Horticultural & Herbal Science (Project No. PJ90706804)", Rural Development Administration, Republic of Korea.

Introduction

2012년도 현재 우리나라 친환경농산물 시장규모는 2011보다 2.7% 감소한 3조 809억 원에 달하는 것으로 추정되고 있다. 친환경농산물 가격이 상승하였음에도 불구하고 시장규모가 전년과 비교하여 감소한 이유 중 하나는 저농약 인증 재배면적이 2011년에 비해 크게 감소하였기 때문이다. 정부는 친환경농업 3차 5개년 (2011-2015년)계획에서 2015년까지 전체 농산물 대비 유기농산물 생산을 15%까지 증가시킨다는 목표를 가지고 있다 (Kim et al., 2013).

과실류의 경우 유기농산물과 무농약농산물 재배가 증가추세에 있으나 전체 저농약농산물 가운데 과실류 저농약이 62.5%를 차지하고 있어 2015년 저농약인증제 폐지에 대응하여 과실류 저농약을 유기나 무농약으로 전환시키기 위한 대책이 요구된다. 이를 위해 과수재배의 친환경적 잡초방제와 화학비료를 대체하거나 사용량을 줄일 수 있는 방안의 하나로서 콩과 또는 벼과 피복작물을 도입한 토양관리법이 진행되고 있다 (Ditsch et al., 1993). 과원의 토양을 피복식물로 관리하면 여러 가지 경제적 및 생태적 이점이 있는 것으로 보고되고 있다 (Roberts et al., 1998). 토양침식 경감, 토양구조 개선, 광 차단, 기계작업에 의한 경반층 형성 경감, 유익 곤충의 서식처 제공, 해충방제, 질소 이용도 증가, 유기물 증가, 보수력 증가, 잡초발생 억제, 비료 사용 절감 등의 효과를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다 (Cardina, 1995; Petersen & Rover, 2005; Ramos et al., 2010; Wyland et al., 1996). 또한 재배 후 녹비로 토양에 혼합하면 토양의 양분과 유기물을 증진시키는 중요한 역할을 한다 (Duxbury et al., 1989; Eo et al., 2010; McGill et al., 1986; Sakamoto & Oba, 1993).

과수원에 사용하는 피복작물은 나무 밑에서 재배하기 때문에 일조가 부족해도 잘 자랄 수 있고, 근군이 깊지 않아서 과수와 양분이나 수분 경합을 일으키지 않으며, 과수에 병충해를 옮기지 않는 것을 선발하여 재배하여야 한다. 피복작물은 크게 콩과와 벼과로 분류할 수 있다. 콩과는 공중질소를 고정하는 작물로서 대표적으로 자운영 (*Astragalus sinicus*), 헤어리베치 (*Vicia villosa*), 클로버류 등이 있다 (Cardina, 1995; Kuo and Sainju, 1997). 전작물로 콩과작물 재배시 후작물은 콩과작물이 생산한 질소의 30~60%를 흡수할 수 있어 질소비료 시용을 줄일 수 있다고 알려져 있다 (Celette *et al.*, 2009; Evans & Terashima, 1987; Fisk & Hesterman, 2001). 벼과 피복작물로는 호밀 (*Secale cereal*), 청보리 (*Hordeum vulgare*), 톨페스큐 (*Festuca arundinacea*), 수단그라스 (*Sorghum sudanense*), 들묵새 (*Festuca myuros*), 켄터키블루그라스 (*Poa pratensis*) 등이 있으며, 콩과 피복식물과 달리 질소 고정은 하지 않지만 토양으로부터 질소를 회수하는 데 있어서 콩과 식물보다 더 효과적이라고 알려져 있다.

피복식물에 의한 토양생물 밀도의 변화는 과원의 양분관리에 있어서 중요한 요소라 할 수 있으며, 토양생물에 의한 유기물 분해가 효율적으로 이루어졌을 때 배 과수의 안정적 생산에도 기여할 수 있다. 유기물이 양분으로 전화되기 위해서는 토양미생물에 의한 분해과정, 즉 유기물을 분해하여 암모니아를 생성하는 암모니아화성 작용, 암모니아를 질산으로 바꾸는 질산화 과정, 인산가용화균이나 균근의 활동에 의한 무기태화 등 미생물의 활동으로 인한 화학 작용이 필요하다. 토양 미소동물은 주로 유기물의 물리적 분해를 돕고 분해과정에서 생성된 물질을 고정하는 역할을 하며, 이들에 의한 유기물 분해는 미생물이 분해한 양의 64%에 달한다고 보고되었다 (Hunt *et al.*, 1987).

피복식물에 의한 토양생물상의 변화, 그 중에서도 토양미생물상에 대한 영향은 과원에서의 영양순환에 매우 중요한 요소라 할 수 있지만 국내에서 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 친환경 유기 배 재배에서 벼과인 청보리, 호밀, 콩과인 크림슨클로버, 헤어리베치를 피복작물로 이용 시 배 과원의 토양미생물상에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 유기 배 과원의 토양 화학성분 변화, 토양미생물 군집밀도에 미치는 영향, DGGE 분석에 의한 전체 미생물상 변화, 그리고 차세대 NGS 기법인 pyrosequencing을 통한 미생물 군집구조 및 종 다양성 분석을 통해 토양미생물 관리에 유용한 초종을 선발하고자 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

시험장소 및 피복식물 처리방법 토양의 화학성분과 미생물상 분석은 국립원예특작과학원 배시험장내의 유기배시험포장에서 2011년 배나무의 수관하부에 피복식물을 재배하여 분석하였다. 피복식물은 화본과에 속하는 청보리 (*Hordeum vulgare*), 호밀 (*Secale cereal*) 2종과 콩과에 속하는 크림슨클로버 (*Trifolium incarnatum*), 헤어리베치 (*Vicia villosa*) 2종을 처리하여 조사하였다. 각 시험구의 크기는 4 m x 6 m로 식재 배나무를 중심으로 양쪽의 수관하부에 피복식물을 처리하였다. 피복식물은 청보리 15 kg $10a^{-1}$, 호밀 20 kg $10a^{-1}$, 크림슨클로버 4 kg $10a^{-1}$, 헤어리베치 8 kg $10a^{-1}$을 3월 25일 춘파 파종하였다. 피복식물은 양분공급원으로 그대로 지표면에 두어서 자연고사 시켰다.

토양시료 채취 및 근권토양 화학성분 분석 토양미생물 조사를 위한 토양시료는 대조구인 자연초생구와 피복작물 처리구별 피복작물 발생정도에 따라 4, 6, 8월에 표토를 제거 후 깊이 10 cm 정도로 채취하였다.

토양 화학성분 분석을 위해서는 피복작물별, 시기별 토양시료를 채취하여 음건시킨 후 2 mm 체를 통과한 토양시료를 분석에 이용하였다. 토양 화학분석은 국립농업과학원

토양화학분석법(NIAST, 2010)에 준하여 pH는 토양과 증류수의 비율을 1:5로 하여 pH meter로 측정하였고, 토양 총질소 및 총탄소 함량은 Elemental analyzer (Vario Max CN, Elementar, Germany), 유효인산은 Lancaster 법을 이용하여 비색정량하였다. 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트륨 등 치환성양이온은 1N Ammonium acetate로 침출하여 유도결합플라즈마 발광광도계 (ICP, Intergra, GBC, Australia)로 분석하였다.

미생물 군집밀도 조사 채취한 토양 10 g을 90 mL의 멸균된 0.85% NaCl 용액에 넣어 진탕배양기 (Vision Co., Bucheon, Korea)에서 200 rpm으로 30분간 현탁하였다. 현탁액은 일련의 희석계열을 만든 후, 세균은 cycloheximide (0.05 g l^{-1})를 첨가한 R2A agar (NA, Difco, Detroit MI)배지에, 사상균은 chloramphenicol (0.02%)을 첨가한 R2A agar (Difco, Detroit MI) 배지에, 방선균은 sodium caseinate agar 배지에 도말하여 배양하였다. 도말된 평판은 세균의 경우 28°C에서 2일간, 방선균은 4일간, 사상균은 5일간 배양한 후 출현한 colony를 계수하였다. 각 시료당 미생물 수는 3개의 petridish에 나타난 colony를 각각 계수한 후 평균한 값을 생균수 (colony forming unit : CFUg^{-1}건토)로 산출하였다.

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 분석 대조구와 피복작물별 토양에서 전체 토양미생물 군집의 변화가 있는지 조사하기 위해 DGGE 분석을 수행하였다. 토양미생물로부터 DNA는 FastDNA Spin Kit (Qbiogen, Carsbad. U.S.A.)를 사용하여 추출하였으며, 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하였다. PCR을 위한 프라이머는 eubacteria의 V3 부위를 포함하도록, F352T-519r을 사용하였으며 프라이머 염기서열은 F352T:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGGACTCCTACGGGTGGC -3', 519r:5'-ACCGCG GCTGCTGGCAC -3'이었다. PCR 반응물은 총량을 50 μL로 하여, 5 μL의 10x PCR buffer, 10 ng의 주형 DNA, 각 25 pmol의 양방향 프라이머, 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 U의 f-*Taq* DNA polymerase (Solgent, Daejeon, Korea)를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성과정을 거친 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, U.S.A)을 사용하여 변성제인 formamide가 40-70%로 농도구배된 8% 아크릴아미드젤에서 전기영동하였다. 전개된 DNA를 SYBR Green I (Cambrex BioScience, Rockland, ME, USA)과 EtBr로 염색하여 Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용, UV transilluminator 하에서 관찰하였다.

Pyrosequencing을 이용한 16S rRNA gene 염기서열 분석 및 종 다양성 분석 토양으로부터 추출한 DNA를 주형으로 사용하여, 16S rRNA gene의 증폭을 위하여 fusion primer인 B16S-F (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTT GATCMTGGCTCAG-3'와 B16-8-62 (5'-CCATCT CATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TAGATGCG-AC-WT TACCGCGGCTGCTGG-3')를 사용하였다. PCR 반응은 10x buffer + $MgCL_2$ 5μL, 10 mM dNTPs 1 μL, 20 pmol μL^{-1} primers (forward/reverse) 2 μL, 5U μL^{-1} *Taq* Polymerase (Roche, Brandord, USA) 0.25 μL, DNA template (100 ng) 1 μL를 넣고 총 부피가 50 μL가 되도록 dH_20를 넣어 PCR 증폭을 하였다. PCR 반응은 Touch-down program을 사용하여 denaturation (94, 5분), denaturation (94, 30초), annealing (60, 45초), extension (72, 90초)단계를 10회 반복하면서 각 단계마다 annealing 온도를 0.5씩 낮추면서 실시한 후, denaturation (94, 30초), annealing (55, 45초), extension (72, 90초)단계를 20회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 주형으로 하여 한 개의 bead 당 한 개의 DNA fragment가 부착되도록 하여, PCR을 하고 필요한 기질 및 효소와 함께 PicoTiterPlate의 well에 첨가한 뒤 GS FLX Titanium system (Roche, Brandord, USA) 염기 서열 분석기를 이용하여 pyrosequencing반응을 진행시켰다. 얻어진 염기서열은 EzTaxon (http://www.eztaxon.org)의 16S rDNA sequence와 비교하여 동정하였다. 얻어진 결과를 토대로 종 다양성지수인 Shannon index 값을 다음과 같은 식으로 계산하였다 (Shannon, 1948).

$$H_{shannon} = -\sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = the number of observed OTUs
n_i = the number of individuals in OTUi
N = the total number of individuals in the community

Results and Discussion

토양 화학성분 분석 친환경 유기 배 과원에서 벼과 및 콩과 피복식물 재배에 따른 토양화학성 조사결과는 Table 1에 제시하였다. 토양 화학성분의 차이는 토양미생물 군집에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 시기별・피복식물별 토양의 화학성분에 차이가 있는지 조사하기 위해 각각 4월, 6월, 8월 채취토양으로부터 토양 pH, 전기비전도도, 유기물 함량, 유효인산, 전질소, 치환성 양이온을 분석하였다 (Table 1). 토양 pH는 6.7~7.4 범위로서 유기 배 과원과 관행과원의 pH (5.8~6.3)에 비해 비슷하거나 다소 높은 것으로 조사되었다 (Choi *et al.*, 2011). 토양의 pH는 배나무의 생장이나 과실의 생산에 주요한 영향을 미치는데 토양 산도가 낮으면 질

Table 1. Soil chemical properties in pear orchard covered with barley, crimson clover hairy vetch and rye.

Parameter	Month	pH	EC	OM	Aail. P_2O_5	T-N	Exch. Cation			
							Ca	K	Mg	Na
		1:5	dS m^{-1}	g kg^{-1}	mg kg^{-1}	%	---------- $cmol_c$ kg^{-1} ----------			
Barley	Apr.	7.20	0.39	22.47	286.3	0.17	11.39	1.12	4.22	0.16
	Jun.	7.15	0.44	26.26	296.6	0.24	10.34	0.85	3.66	0.15
	Aug.	7.26	0.43	21.89	375.1	0.23	11.18	1.22	4.09	0.07
Crimson clover	Apr.	7.10	0.36	15.00	91.1	0.14	9.42	0.36	2.72	0.10
	Jun.	7.41	0.79	41.09	449.9	0.27	14.53	1.56	3.63	0.17
	Aug.	7.39	0.78	35.55	1285.4	0.43	17.44	1.57	5.38	0.05
Hairy vetch	Apr.	7.21	0.39	18.56	176.6	0.16	10.72	0.80	3.64	0.10
	Jun.	6.69	0.81	33.50	285.3	0.28	10.94	0.96	3.66	0.15
	Aug.	7.13	0.46	24.56	312.2	0.24	10.06	1.25	3.75	0.04
Rye	Apr.	7.38	0.59	25.69	333.8	0.25	13.51	1.39	4.78	0.15
	Jun.	7.40	0.63	34.42	485.3	0.29	15.32	1.17	4.46	0.13
	Aug.	7.33	0.42	19.35	284.4	0.25	14.20	1.16	5.48	0.07

Table 2. Number of microbes in cover plant treated soils of pear orchard.

Microbes	Month	Cover plant			
		Barley	Crimson clover	Hairy vetch	Rye
Bacteria ($x10^6$)	Apr.	276±5.8†	136±28.9	110±10.0	306±45.1
	Jun.	340±34.6	650±26.5	946±40.4	830±65.6
	Aug.	166±11.6	165±19.7	162±9.1	107±13.7
Actinomycetes ($x10^5$)	Apr.	46.6±2.5	37±5.3	28.3±2.1	78.3±4.5
	Jun.	50±4.0	36±2.5	46±2.3	18±3.6
	Aug.	14±2.0	9±2.5	17±3.1	9±0.0
Fungi ($x10^5$)	Apr.	76±3.1	61±6.5	55±2.6	105±5.3
	Jun.	78±4.0	373±4.0	271±14.0	32±2.6
	Aug.	62±5.7	113±7.6	86±2.9	96±9.5

†colony forming unit(CFU) g^{-1} fresh weight ±standard deviation from three replications.

소, 인산, 칼리의 흡수도 낮아지고 미량원소의 흡수도 낮아져 뿌리의 생육이나 수량이 감소된다. 유효인산은 91.1~1,285 mg kg^{-1} 범위로서 시기별·처리별 차이를 나타내었다. 배 토양의 적정범위는 200-300 mg kg^{-1}으로 크림슨클로버의 경우 시기별로 유효인산 농도가 증가하여 8월에는 과다 농도 우려가 있는 것으로 조사되었다. 크림슨클로버의 경우 일시적 증가인지 또는 크림슨클로버 피복에 따른 영향인지에 대해 장기적 차원에서 면밀한 조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 청보리, 헤어리베치의 유효인산 농도는 시기별로 증가하는 경향을 나타내었다. 호밀의 경우 4월에 비해 6월이 더 증가하였으나 8월에는 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서 크림슨클로버를 제외하고 피복에 따른 과다 유효인산 농도의 우려는 없는 것으로 조사되었다. 유기물 함량은 15 ~ 41.1 g kg^{-1} 범위로서 시기별·피복식물별로 차이가 있는 것으로 나타났다. 치환성 양이온의 농도는 4월 크림슨클로버 토양의 칼륨 함량을 제외하고는 배 과원의 적정 함량에 비해 높은 수준을 나타내는 것으로 조사되었다.

토양미생물 군집밀도 분석 피복식물별 토양시료를 시기별로 채취하여 미생물 군집밀도 변화를 조사하였다 (Table 2). 4, 6, 8월 토양시료의 토양미생물 군집밀도 조사결과 세균 군집밀도는 전체적으로 4월토양에 비해 6월 토양이 증가하는 경향을 보였고, 8월은 6월 토양에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 청보리 세균 군집밀도의 경우 4월토양보다 6월 토양에서 크게 증가하지는 않았으나 크림슨클로버, 헤어리베치, 호밀의 경우는 각각 4.8, 8.6, 2.7배 증가하는 것으로 조사되었다. 방선균의 경우 헤어리베치구에서는 4월에 비해 6월 토양에서 약 1.6배 이상 농도가 증가하였다. 사상균의 경우 크림슨클로버와 헤어리베치구에서 4월 토양에 비해 6월토양에서 6.1, 4.9 증가한 것으로 조사되었다. 친환

경 사과원 재배에서 피복식물 이용시 세균, 방선균, 사상균의 상대적 밀도가 증가하였으며, 선충이나 미소절족동물의 전체밀도도 크게 증가한 바 있다 (Eo et al., 2010). 일반적으로 밭토양에서 녹비작물을 장기적으로 연용할 경우 토양은 바실러스균과 그람음성 세균이 우점하는 경향이 있다고 하였다 (Suh et al., 2010). 피복작물에 의해 토양내 유기물의 함량이 피복율이 높은 6월에 증가하였다가 고사하여 토양에 투입되기 시작하는 8월에 감소하는 것과 토양미생물의 세균, 방선균, 사상균의 6월 증가와 8월 감소와 유사한 경향치를 가져왔고 이중 호밀에서만 방선균이 지속적으로 감소하고 사상균도 감소했다가 다시 증가하는 현상이 발생하였는데 이는 피복작물의 재투입 과정에서 쉽게 분해되지 않는 특성이 영향을 미친 것으로 판단되었다. 특히 헤어리베치와 크림슨클로버는 청보리나 호밀보다 많은 유기물이 투입되고 토양의 비옥도를 높여주고 있고 이에 따른 사상균의 증가 경향이 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

피복식물의 토양미생물상에 대한 영향은 피복식물의 재배기간 동안과 수확 후 환원되는 시기가 작물별로 차이가 있어 토양의 비옥도의 영향을 동일시점에 판단하기 어려운 점이 있기 때문에 토양미생물상의 영향을 토양특성의 변화와 연계하여 장기적으로 추가 조사가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

DGGE 분석 피복식물별 토양으로부터 DNA를 추출하여 DGGE 방법을 이용하여 분석한 결과 4월 토양에서는 피복작물별로 서로 다른 위치에서 검출되는 band의 수가 많은 것으로 관찰되고 위치가 같더라도 강도가 band들도 많이 검출되었다. DGGE 분석은 16S rRNA 유전자의 특정 변이부위 차이를 검출하는데 있어서 효과적인 분석법이며, 젤상에서 다른 위치에 나타나는 밴드는 서로 다른 세균으로 볼 수 있다. 4월 토양에서 피복작물별로 band의 위치나 강도가 다른 band 들이 많이 검출되는 것은 각각의 토양이 서로 다른 미생물 분류군을 포함하고 있다는 것을 나타낸다. 검출된 band의 위치나 강도가 모든 시험구에서 유사한 것으로 조사되었다. 6월 토양은 4월 토양에 비해서 피복식물별로 서로 위치가 일치하는 band가 많이 검출되었지만 피복식물별로 위치나 강도가 다른 band 들도 검출되는 것으로 나타났다. 같은 위치의 band는 같은 종의 미생물일 수도 있고 다른 종의 미생물이 혼재할 수도 있어 차이가 나는 band 들의 정밀한 분석이 요구되어질 것으로 사료된다. 8월 토양에서는 band의 다양성이 많이 감소되는 것으로 분석되었다. 피복식물별 토양미생물상의 전체적인 경향은 DGGE 분석을 통해서 조사될 수 있지만, 메타게놈 분석을 통한 미생물 분류군 분포 및 분포비율에 대한 조사를 통해 피복식물이 토양미생물상에 미치는 영향에 대한 조사가 필요하다.

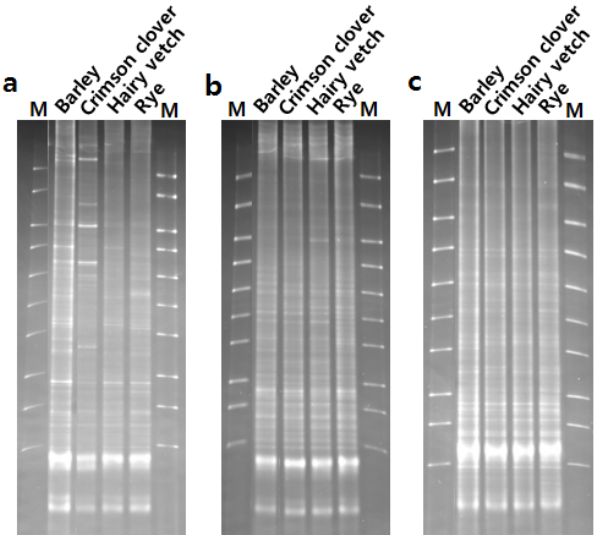


Fig. 1. DGGE analysis of 16S rDNA V3 region obtained after PCR amplification with eubacterial primers 352T and 519r. DGGE profile for April (a), June (b) and August (c) pear orchard soils covered with with barley, crimson clover hairy vetch and rye. M, DGGE marker II (Wako, Tokyo, Japan).

Pyrosequencing을 이용한 토양미생물 동정 피복작물의 생육 최성기인 6월과 생육후기에 고사하여 토양에 재투입된 8월의 토양에 대해 Pyrosequencing 방법으로 시기별・피복작물별 토양미생물 군집을 분석한 결과, 6월의 경우 청보리는 4,892개, 크림슨클로버 3,825개, 헤어리베치는 4,439개, 호밀은 4,281개의 16S rRNA gene sequence를, 8월의 경우 청보리는 1,105개, 크림슨클로버 5,795개, 헤어리베치는 10,433개, 호밀은 2,576개의 16S rRNA gene sequence를 획득하였다. Phylum 수준에서 미생물의 분포비율을 비교한 결과, 6월 피복작물별 토양에서 우점미생물은 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* 등으로 나타났으며 8월토양도 같은 분류군이 우점하는 것으로 나타났다. 이중 *Proteobacteria*는 α-*Proteobacteria*, β-*Proteobacteria*, δ-*Proteobacteria*, γ-*Proteobacteria*의 class가 포함되어 있고, α-*proteobacteria*에는 *Rhizobiales* 목이 포함되어 있다. 청보리로 피복한 경우 6월 토양에 비해 8월토양에서 *Rhizobiales* 목이 1.8배 증가한 것으로 조사되었다. 6월 토양에 비해 8월 토양에서 분포비율이 증가한 것은 *Firmicutes*로서 모든 피복작물에서 2배 정도 증가하는 것으로 나타났다. *Firmicutes* 분류군에는 식물 성장에 유익한 *Bacilli* class가 포함되고 6월 토양에 비해 8월 토양에서 청보리는 2.5배, 크림슨클로버는 1.9배, 헤어리베치는 1.4배, 호밀은 1.7배 증가하였다. 미생물 농약으로 산업화 된 대부분의 고활성 미생물은 *Bacillus* 속에 속하며 열과 건조 등 환경스트레스에 견딜 수 있는 특징적인 내생포자 (endospore)를 형성한다. *Bacillus* 균은 자연계의 도처에 분포하며 다양한 기능을 갖는 펩타이드 물질을 생산하는데 농작물의 생육

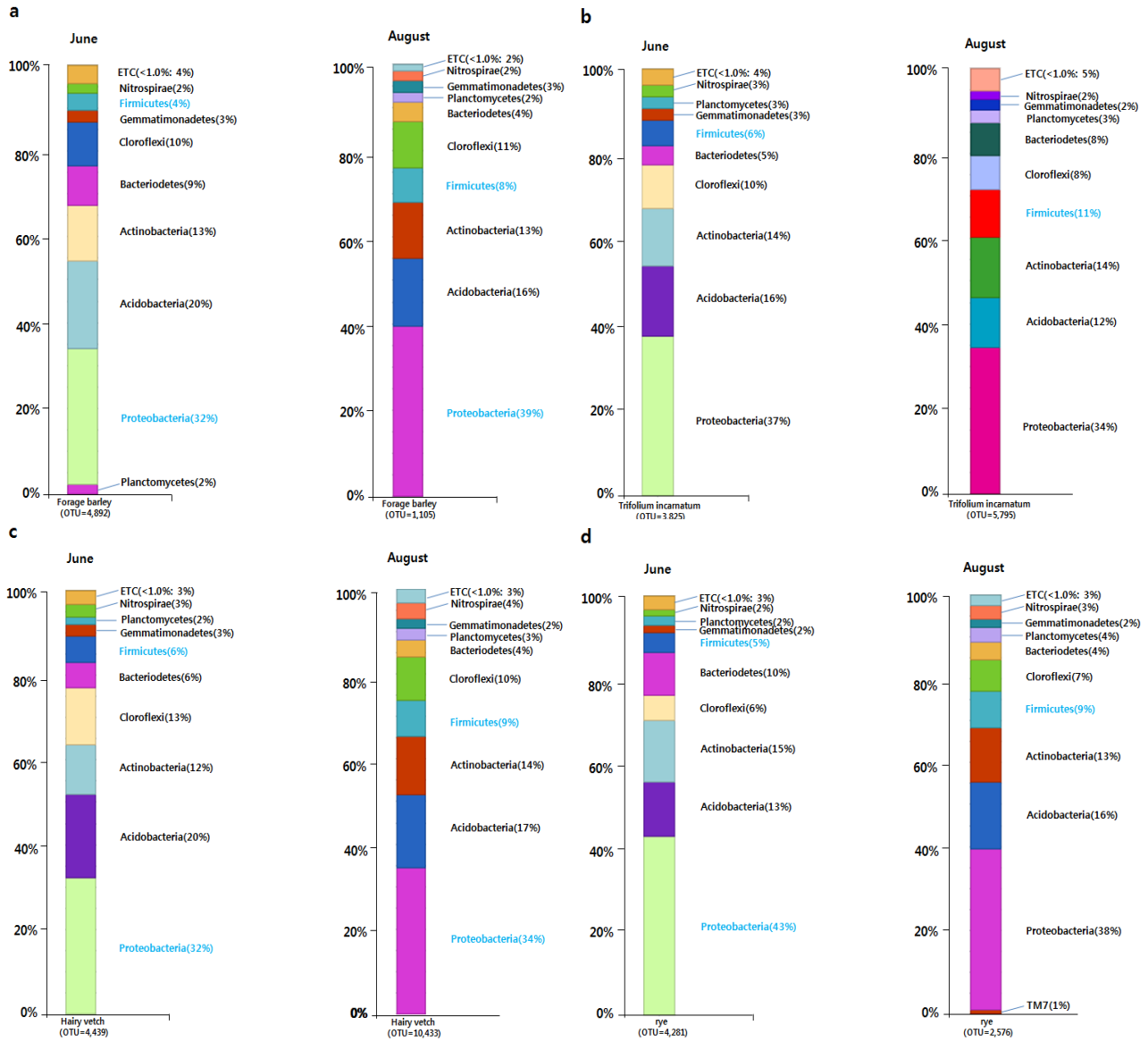


Fig. 2.Comparison analysis of relative abundance of microbial phyla in the June and August pear orchard soils covered with barley(a), crimson clover(b), hairy vetch(c) and rye(d). OTU, operational taxanomic unit.

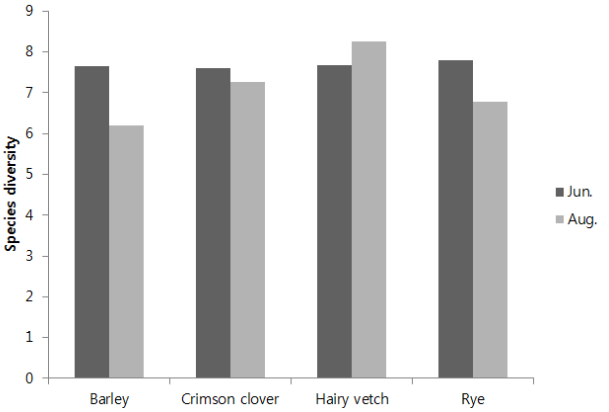


Fig. 3. Analysis of bacterial species diversity in the June and August pear orchard soils covered with barley, crimson clover, hairy vetch and rye.

과 관련이 있는 식물의 생육촉진과 식물병에 대항할 수 있는 항생기작 및 식물에 방어기작을 부여하고 근권 내 미생물의 정착을 돕는 유용한 기능을 가지고 있다. 농업용으로 쓰이는 *Bacillus* 균은 대부분 *Phenibacillus*와 *Bacillus* 속으로 Cyclic lipopeptide (CLP)에 속하는 Surfectin, Iturin, Fengycin 계열의 다양한 리포펩타이드를 생산하며 그 물리화학적 특성에 따라 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Gardener, 2004; Ongena & Jacques, 2007). Pyrosequencing에서 얻은 결과를 통해 각 피복식물별 종 다양성 지수는 6월 토양의 경우 호밀 (7.8)이, 8월 토양의 경우 크림슨클로버 (8.3)가 가장 높은 것으로 나타났다.

Conclusions

최근에 소비자들의 안전 농산물에 대한 관심과 정부의 정책적인 친환경농업에 대한 지원으로 유기 과수 재배는 지속적으로 발전되어 왔다. 본 연구는 피복 작물별 유기 배 과원의 토양 화학성 및 시기별 토양미생물에 대한 비교분석을 통해 피복작물의 토양미생물상 영향을 구명하고 유기농법에 의한 과수재배법을 확립하고자 수행되었다.

피복작물은 벼과 작물인 청보리, 호밀과 콩과 작물인 크림슨클로버와 헤어리베치를 대상으로 하였다. 배과원에서 피복처리에 의한 토양화학성분 변화는 시기별·피복식물별 차이를 나타내었다. 토양 pH는 6.7~7.4 범위로서 유기 배 과원 관행과원의 pH에 비해 비슷하거나 다소 높은 것으로 조사되었다. 유효인산은 크림슨클로버의 경우 6월 토양에 비해 8월 토양이 과다 농도 우려가 있는 것으로 조사되었다. 유기물 함량은 15 – 41.1 g/kg 범위로 시기별・피복식물별 차이가 있는 것으로, 치환성 양이온은 배 관행과원에 비해 높은 것으로 조사되었다. 토양미생물 군집밀도 조사결과 세균 군집밀도는 4월 토양에 비해 6월 토양이 증가하는 경향을 나타내었고, 8월토양은 6월 토양에 비해 감소하였다. 헤어리베치로 피복하였을 때 4월 토양에 비해 6월 토양에서 방선균 군집밀도가 약 1.6배 이상 증가하였다. 사상균의 경우 크림슨클로버와 헤어리베치구에서 4월 토양에 비해 6월 토양에서 약 6.1배와 4.9배 증가한 것으로 조사되었다. 피복식물별 토양으로부터 DNA를 추출하여 DGGE 방법을 이용하여 분석한 결과 4월 토양에서는 피복작물별로 서로 다른 위치에서 검출되는 band의 수가 많은 것으로 조사되었다. 6월 토양은 4월 토양에 비해서 피복식물별로 서로 위치가 일치하는 band가 많이 검출되었지만 피복식물별로 위치나 강도가 다른 band 들도 검출되는 것으로 나타났다. 8월 토양에서는 band의 다양성이 많이 감소되는 것으로 분석되었다. Pyrosequencing 방법으로 시기별・피복작물별 토양미생물 군집을 분석한 결과, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* 등으로 나타났으며, 6월 토양에 비해 8월 토양에서 분포비율이 증가한 것은 *Firmicutes*로서 모든 피복작물에서 2배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 피복작물을 이용한 배과원의 토양미생물상 영향 분석결과 헤어리베치구에서 토양의 입단화를 촉진시키고 유기물 분해에 기여하는 방선균이 증가된 것으로 조사되어 헤어리베치가 가장 좋은 피복작물로 판단되었다.

References

Cardina, J. 1995. Biological weed management. In: Smith, A.E. (Ed.), Handbook of Weed Management Systems. pp. 279-341. Marcel Dekker, New York, USA.

Celette, F., A. Findeling, and C. Gary. 2009. Competetion for nitrogen in an unfertilized intercropping system: The case of an association of grapevine and grass cover in a Mediterranean climate. Eur. J. Agron. 30:41-51.

Choi, H.S., L. Xiong, W.S. Kim, Y. Lee, and H.J. Jee. 2011. Comparison of soil physic-chemical and microbial characteristics in soil of 'Niitaka' pear orchards between organic and conventional cultivations. Korean J. of Org, Agric. 19(2): 229-243.

Ditsch, D.C., M.M. Alley, K.R. Kelley, and Y.Z. Lei. 1993. Effectiveness of winter rye for accumulating residual fertilizer N following corn. Journal of Soil and Water Conservation 48:125-132.

Duxbury, J.M., M.S. Smith, and J.W. Doran. 1989. Soil organic matter as source and a sink of plant nutrients, In: Colenman, D. C. et al. (eds.). Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems, pp. 33-68. Univ. Hawaii Press, Honolulu, USA.

Eo, J.N., S.B. Kang, K.C. Park, K.S. Han, and Y.K. Yi. 2010. Effects of cover plans on soil biota: A study in an apple orchard. Korean J. Environ. Agric. 29:287-292.

Evans, J.R. and I. Terashima. 1987. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach, Aust. J. Plant Physiol. 14:281-292.

Fisk, J.W. and O.B. Hesterman. 2001. Weed suppression by annual legume cover crops in no-tillage corn. Agron. J. 93: 263-298.

Gardener, B. and B. M. 2004. Ecology of Bacillus and Paenibacillus spp. in agricultural systems. Phytopathology 94: 1252-1258.

Hunt, H.W., D.C. Coleman, E.R. Inham, R.E. Ingham, E.T. Elliott, J.C. Moore, S.L. Rose, C.P.P. Reid, and C.R. Morley. 1987. The detrimental food web in a shortgrass prairie. Biol. Fertil. Soils 3:57-68.

Kim, C.G., H.G. Jung and D.H. Mun. 2013. Actual condition of products and market prospect for eco-friendly farm products in domestic and foreign country. KREI Agri-Policy Focus 55, P25.

Kuo, S. and U.M. Sainju. 1997. Winter cover crop effects on soil organic carbon and carbohydrate in soil. Soil Sci. 61:145-152.

McGill, W.B., K.R. Cannon, J.A. Roberson, and F.D. Cook. 1986. Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic carbon in Breton L after 50 years of cropping to two rotations. Can. J. Soil. Sci. 66:1-19.

NIAST. 2010. Methods of Soil Chemical Analysis. National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea.

Petersen, J. and A. Rover. 2005. Comparison of sugar beet cropping systems with dead and living mulch using a glyphosate-resistant hybrid. J. Agron. Crop Sci. 191:55-63.

Ongena, M. and P. Jacques. 2007. Bacillus lipopeptides: versitile

weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 16:115-125.

Ramos, M.E., E. Benitez, P.A. Garcia and A.B. Robles. 2010. Cover crops under different managements vs. frequent tillage in almond orchards in semiarid conditions: Effects on soil quality. Appl. Soil Ecol. 44:6-14.

Roberts, R.K., J.A. Larson, D.D. Tyler, B.N. Duck and K.D. dillivan. 1998. Economic analysis of the effects of winter cover crops on no-tillage corn yield response to applied nitrogen. Journal of Soil and Water Conservation. 53:280-284.

Sakamoto, K. and Y. Oba. 1993. Relationship between available N and soil biomass in upland field soils. Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr. 64:42-48.

Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27, 379-423 and 623-656.

Suh, J.S., J.S. Kwon, and H.J. Noh. 2010. Effect of the long-term application of organic matters on microbial diversity in upland soils. Korean J. Soil. Fert. 43:987-994.

Wyland L.J., L.E. Jackson, W.E. Chaney, K. Klonsky, S.T. Koike, and B. Kimple. 1996. Winter cover crops in a vegetable cropping system: Impacts on nitrate leaching, soil water, crop yield, pests and management costs. Agric. Ecosyst. Environ. 59:1-17.