

# 석회유황합제가 배나무 낙엽의 진균 다양성 변화에 미치는 영향

민광현<sup>1</sup> · 송장훈<sup>2</sup> · 조백호<sup>1</sup> · 양광열<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 배연구소

## Effect of Lime Sulfur on Changes of Fungal Diversity in Pear Fallen Leaves

Kwang-Hyun Min<sup>1</sup>, Jang Hoon Song<sup>2</sup>, Baik Ho Cho<sup>1</sup> and Kwang-Yeol Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

<sup>2</sup>Pear Research Institute, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Naju 55365, Korea

**ABSTRACT :** This study was conducted to examine changes in the fungal community on fallen leaves of pear by treatment with lime sulfur. Although the lime sulfur could reduce the primary inoculum of several pathogens on spring season, the effect of lime sulfur has not been well determined scientifically. Fallen leaves infected by pear diseases in pear orchards in Naju were collected and treated with lime sulfur or water as a control. To determine the fungal diversity from each treatment, rDNA internal transcribed spacer (ITS) regions were analyzed after extraction of fungal genomic DNA from lime sulfur-treated or water-treated fallen leaves, respectively. The most common fungal species were Ascomycota and Basidiomycota in both treated leaves. However, the population dynamics of several fungal species including *Alternari* sp., *Cladosporium* sp., and *Phomopsis* sp., which are known as pear pathogens for skin sooty dapple disease, were quite different from each treated leaves. These results indicated that lime sulfur treatment led to changes of fungal communities on pear fallen leaves and could be applicable as a dormant spray.

**KEYWORDS :** Fallen leaves, Fungal diversity, Lime sulfur, Pear

우리나라 배나무에 발생하는 병해는 29여 종이 보고되어 있으나 배 과수원에서 적절한 방제가 이루어지고 있음에도 불구하고 경제적으로 피해를 주고 있는 주요 병해는 진균에 의한 검은별무늬병, 붉은별무늬병 및 과피열룩병 등이 있다[1]. 이러한 주요 병해의 병환을 살펴보면 붉은별무늬병을 제외한 대부분의 병해는 병든 낙엽이나 과실과 같은

잔재물, 인편 그리고 가지 등에서 월동하면서 휴면상태로 생존한 병원균이 다음해 봄에 1차 전염원이 되어 병을 일으킨 후 그로부터 2차 전염원이 형성되어 병이 진전된다[2]. 따라서 1차 전염원의 밀도가 많아지면 결과적으로 병에 의한 피해가 심해질 수 있으므로 1차 전염원의 밀도를 줄이는 방법이 주요 병해 방제를 위해 매우 중요하다.

석회유황합제는 18세기 중반에 살균제로 개발된 후 지금까지 널리 이용되고 있는데 높은 pH와 적은 양의 황화수소 가스를 지속적으로 방출함으로써 살균효과를 나타내는 기작 때문에 다양한 병원균에 적용될 수 있으나 생육기의 지속적인 사용은 식물세포에 약해를 일으킬 수 있다[3]. 그래서 배 과수원에서 1차 전염원의 밀도를 줄이기 위해 동계 방제의 한 가지 방법으로 석회유황합제를 사용하고 있으나 현재 우리나라 배 과수원에서 석회유황합제를 살포하는 농가 수는 10% 정도에 그칠 정도로 미미한 실정이다[4]. 최근에 석회유황합제의 살포가 과실의 상품성을 저하시키는 배 과피열룩병을 방제하는 효과가 있음을 확인한 결과는 있지만 아직까지 많은 연구가 진행되고 있지는 않은 실정이다

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 281-285  
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.281>  
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249  
 © The Korean Society of Mycology

\*Corresponding author  
 E-mail: kyyang@jnu.ac.kr

Received November 23, 2015  
 Revised December 10, 2015  
 Accepted December 14, 2015

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

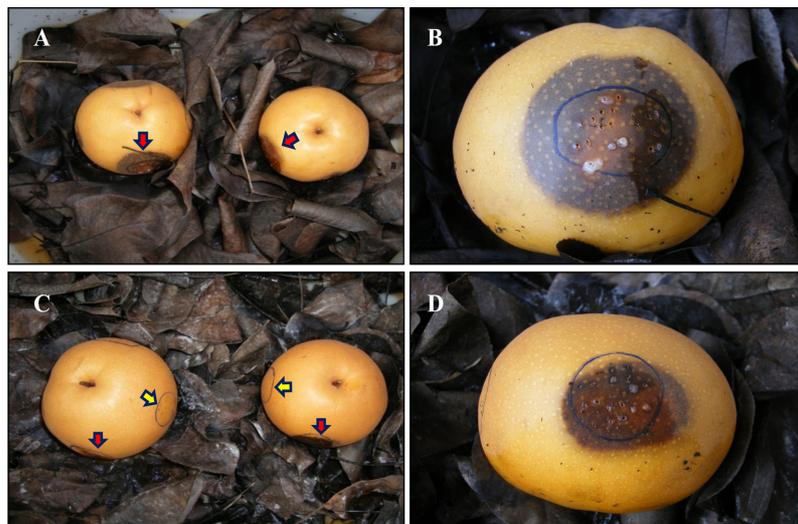
[5]. 그러나 사과나무에서는 오래 전부터 비교적 많은 연구가 수행되어 국내의 경우는 사과 검은별무늬병 약제방제 체계에 대한 연구를 통해 월동기에 석회유황합제의 살포가 사과 검은별무늬병의 방제에 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인하였다[6]. 또한 국외의 경우는 합성농약을 사용할 수 없는 유기제배 및 일부 관행제배 사과 과수원에서 석회유황합제를 활용한 많은 연구를 통해 사과 검은별무늬병뿐만 아니라 그을음병과 그을음점무늬병에 대한 방제 효과를 확인하였다[7-10].

따라서 본 연구에서는 우리나라 배 과수원에서 동계방제 수단으로써 석회유황합제의 효과를 과학적으로 증명하기 위하여 배 과수원에서 1차 전염원의 역할을 하는 낙엽에 석회유황합제를 처리한 후 병원균을 비롯한 낙엽에 존재하는 진균의 다양성 변화를 확인하였다.

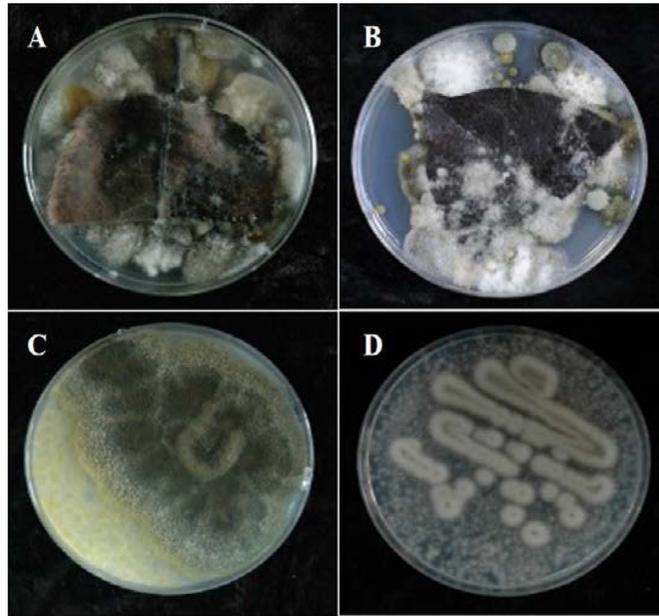
우리나라의 주요 배 생산지역인 전라남도 나주지역 배 재배농가들 중에서 주요 병해 피해율이 나주지역 전체 피해율보다 높은 나주시 봉황면 소재의 A 과수원과 나주시 왕곡면 소재의 B 과수원 등 두 곳을 선정하여 각각의 과수원에서 병반이 있는 낙엽들을 포함하여 무작위로 수집한 다음 시험에 사용하였다. 과수원에서 월동하는 자연 상태에서의 결과를 확인하기 위해 수집한 낙엽을 표면소독과 같은 인위적인 처리는 하지 않았다. 수집한 낙엽들은 이등분하여 한 곳에는 유기농자재로 목록고시된 석회유황합제(lime sulfur 22%)를 고시농도로 처리하였으며 다른 곳에는 대조구로 동량의 물을 처리하였다. 석회유황합제 처리구의 낙엽과 물이 처리된 대조구의 낙엽을 각각 다른 두 플라스틱 상자(424 × 540 × 345 mm) 바닥에 깔고 그 위에 멸균수로 깨끗하게 세척한 후 과실의 변화를 빨리 확인하기 위하여 멸균된 이쑤시개를 이용하여 인위적으로 상처를 준

건전한 배 두 개씩을 올려놓았다. 두 개의 플라스틱 상자는 진균이 성장할 수 있는 습도를 유지하기 위해 주기적으로 멸균수를 뿌려 주었으며 주간 16시간과 야간 8시간 조건의 20°C 배양실에 보관하면서 10일간 관찰한 결과, 대조구에서는 5~7일째부터 과실표면의 상처가 생긴 부위에서 약하게 갈변되는 증상이 나타나기 시작하였으나 10일이 지난 뒤에는 상처가 난 부위 주변으로 넓게 확대되면서 과피부터 과육 부분까지 물러지면서 부패되는 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 1A, 1B). 그러나 같은 조건하에서 배양된 석회유황합제 처리구는 대조구와 다르게 전체적으로 비교적 깨끗하게 유지되어 상처가 난 부위에 큰 변화가 없거나 일부 상처 부위에서만 약하게 갈변되며 부패되기 시작하는 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, 1D). 같은 방법으로 세 번 반복하여 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 석회유황합제를 낙엽에 처리하면 낙엽에 존재하는 여러 종류의 부생균을 포함한 미생물들이 살균되는 효과가 있었음을 의미한다.

그래서 대조구와 석회유황합제 처리구의 낙엽에 존재하는 다양한 미생물들 중에서 진균의 다양성 변화를 확인하기 위하여 20°C 배양실에서 10일 동안 배양된 낙엽들을 세균의 생육 억제를 위해서 항생제 streptomycin (Sm, 50 µg/mL)이 첨가된 진균 생육 배지인 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 치상하였다. 낙엽들이 치상된 PDA/Sm 배지는 20°C 배양기에서 7일 동안 배양하면서 배지에 자란 진균 균종의 모양과 색, 균사 등의 특징을 관찰하였으며 PDA/Sm 배지상에서 우점하는 진균은 별도로 순수분리한 후 PDA/Sm 배지에 배양하면서 생육을 관찰하였다. 대조구와 석회유황합제 처리구의 낙엽 하나씩을 여러 개의 PDA/Sm 배지에 각각 치상한 후 7일 동안 배양시킨 결과, 대조구



**Fig. 1.** Symptoms of decay at wounded sites of pear fruits on fallen leaves treated with water (A and B) or lime sulfur (C and D). The rot symptoms on pear fruits (red arrows) and relatively clear part on pear fruits (yellow arrows) were observed 10 days after incubation at 20°C.



**Fig. 2.** Growth of fungi from fallen leaves treated with water (A) or lime sulfur (B) on PDA/Sm medium at 7 days after incubation. Mycelial colonies of *Alternaria* sp. (C) and *Cladosporium* sp. (D). PDA, potato dextrose agar; Sm, streptomycin.

와 석회유황합제 처리구의 낙엽 모두에서 다양한 진균들의 생육을 관찰할 수 있었으나 석회유황합제 처리구에 비하여 대조구에서 조금 더 다양한 진균들의 생육을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, 2B). 각각 다른 두 곳의 배 과수원 낙엽들에서 확인되는 진균들의 생육은 차이가 있었으며 치상된 낙엽에 따라 우점하는 진균들이 다르게 나타났다(테이더 미제시). 낙엽이 치상된 여러 개의 PDA/Sm 배지에서 우점하는 진균들의 형태학적인 생육 차이를 확인하기 위하여 개별적으로 분리해서 PDA/Sm 배지상에서 생육을 지속적으로 확인한 대표적인 진균에는 *Alternaria* sp.와 *Cladosporium* sp. 등이 있었다(Fig. 2C, 2D).

미지의 미생물들을 보다 정확하게 동정하고 분류하기 위해서 DNA를 이용한 다양한 진단법이 널리 사용되고 있으나 특히 ribosomal DNA (rDNA)의 internal transcribed spacer (ITS) 영역을 polymerase chain reaction (PCR) 방법에 의해 특이적으로 증폭한 후 염기서열을 비교함으로써 진균을 동정하는 방법이 유용하게 이용되고 있다[11]. 따라서 20°C 배양실에서 10일 동안 배양한 대조구와 석회유황합제 처리구의 10여 장의 낙엽을 각각 수거하여 액체질소로 마쇄한 다음 i-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 진균 genomic DNA를 분리하였으며, 또한 순수분리한 후 PDA/Sm 배지에 접종하여 배양한 진균들도 1 × PBS buffer와 Cell scraper (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)를 사용하여 균사체를 회수한 다음 같은 kit를 이용하여 진균 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 이용하여 진균을 동정하기 위해 rDNA의 ITS 영역의 염기서

열을 분석하였다. 진균 universal primer로 알려진 ITS1 (5'-TCCGTAGGTTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머 쌍을 이용하여 PCR를 수행하였다[12, 13]. PCR 조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation을 실시한 후, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 primer annealing 30초, 72°C에서 extension 30초의 조건으로 35 cycle을 반복한 후 72°C에서 5분간 final extension을 실시한 후 PCR 산물은 1% agarose-gel에서 전기영동을 통해 확인하였다. 최종적으로 대조구와 석회유황합제 처리구로부터 각각 70개씩의 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하여 동정할 수 있었다. Table 1에서 확인할 수 있듯이 대조구와 석회유황합제 처리구 모두에서 자낭균문(Ascomycota)과 담자균문(Basidiomycota)에 속하는 서로 다른 다양한 종류의 진균들이 동정되었으며 동정이 되지 않는 진균들도 존재하였다. 대조구에서는 자낭균문에 속하는 *Alternaria*속의 진균들과 *Cladosporium*속의 진균들이 높은 비율로 동정되었으며 석회유황합제 처리구에서는 자낭균문에 속하는 *Alternaria*속의 진균과 담자균문에 속하는 *Tremellales*속의 진균이 높은 비율로 동정되었다. 이 결과는 배 과수원 내 공기 중에 존재하는 진균의 약 95%를 자낭균문이 차지하고 있다는 기존의 결과와 부합하였다[14]. 최근에 배 재배농가에서 상품성의 저해요인으로 문제가 되고 있는 배 과피열룩병을 일으키는 몇 가지 진균에는 *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Gloeodes pomigena*, *Mycosphaerella graminicola*, *Phomopsis* sp. 등이 있다고 보고되었다[15]. 이러한 진균들 중 *Alternaria*속의 진균은 대조구에서 동정된 전체 진균의 51.5%를 차지하였으나 석회유황합제 처리구

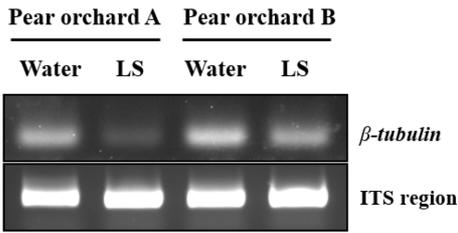
에서는 28%로 비율이 대폭 감소되었으며, *Cladosporium*속의 진균도 대조구에서 14%의 비율로 동정되었으나 석회유황합제 처리구에서는 7%의 비율로 역시 대폭 감소되는 것으로 나타났다(Table 1). 그리고 배 과피열룩병의 또 하나의 병원균인 *Phomopsis*속의 진균과 배 재배농가에 가장 큰 피해를 주고 있는 배 검은별무늬병원균인 *Venturia nashicola*는 대조구에서는 동정되었으나 석회유황합제 처리구에서는 동정되지 않았다(Table 1). 따라서 배 과피열룩병을 일으키는 여러 병원균들 중에서 가장 대표적인 병원균으로 알려진 *Cladosporium*속에 속하는 진균의 밀도 변화를 대조구와 석회유황합제 처리구의 낙엽으로부터 직접 확인해보기 위해 *Cladosporium* sp.의  $\beta$ -tubulin 유전자의 특이적인 primer (forward 5'-GGCCAGTGTGTACGTCAAGA-3', reverse 5'-GGCCAGTGTGTACGTCAAGA-3')를 제작하였

으며, 이를 사용하여 PCR를 수행한 후 전기영동을 통해 PCR 산물을 확인하였다. 그 결과, 나주지역 A 과수원과 B 과수원의 낙엽 모두에서 대조구에 비해 석회유황합제 처리구에서 *Cladosporium* sp.의 밀도가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이러한 결과는 석회유황합제 처리가 배나무 동계방제의 수단으로써 과실에서 발생하는 배 과피열룩병 방제에 효과적이라는 기존의 보고를 과학적으로 입증한 결과다[5]. 이러한 결과들을 종합해 보면 석회유황합제 처리가 배 낙엽에 존재하는 진균 다양성의 변화에 영향을 미쳤으며 월동 병원균의 철저한 방제를 통한 1차 전염원의 밀도를 감소시키는 차원에서 동계방제로서 역할을 수행할 수 있음을 시사한다.

**Table 1.** Comparison of fungal taxa occurred on water-treated controls or lime sulfur-treated fallen leaves of pear

Water-treated		Lime sulfur-treated	
Fungus name	%	Fungus name	%
Ascomycota		Ascomycota	
<i>Alternaria</i> sp.	50.0	<i>Alternaria</i> sp.	28.0
<i>Alternaria arborescens</i>	1.5	-	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1.5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1.5
-		<i>Bipolaris</i> sp.	1.5
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	12.5	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	7.0
<i>Cladosporium uredinicola</i>	1.5	-	
-		<i>Colletotrichum acutatum</i>	3.0
-		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1.5
<i>Dothideomycete</i> sp.	1.5	<i>Dothideomycete</i> sp.	1.5
-		<i>Glomerella cingulata</i>	3.0
<i>Pelctosphaerella</i> sp.	1.5	-	
-		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8.5
<i>Phoma</i> sp.	3.0	-	
<i>Phomopsis</i> sp.	3.0	-	
-		<i>Pichia guilliermondii</i>	4.0
-		<i>Ramichloridium</i> sp.	1.5
<i>Rosellinia necatrix</i>	1.5	-	
-		<i>Saccharomycetales</i> sp.	4.0
<i>Venturia nashicola</i>	1.5	-	
<i>Xylariales</i> sp.	1.5	-	
<i>Xylaria</i> sp.	1.5	-	
Basidiomycota		Basidiomycota	
<i>Bulleromyces albus</i>	4.0	-	
-		<i>Cryptococcus flavescens</i>	4.0
<i>Cryptococcus tephrensii</i>	7.0	-	
<i>Tremellales</i> sp.	3.0	<i>Tremellales</i> sp.	24.0
Others	4.0	Others	7.0



**Fig. 3.** PCR amplification of  $\beta$ -tubulin gene fragments for *Cladosporium* sp. isolated from fallen leaves after water or lime sulfur (LS) treatment. The fallen leaves were collected in two pear orchards (pear orchard A and pear orchard B) of Naju. The internal transcribed spacer (ITS) region was used as a control to confirm the integrity of the genomic DNA.

## 적 요

석회유황합제의 배나무 동계방제 수단으로써 효과를 과학적으로 증명하기 위해 배 과수원에서 1차 전염원의 역할을 하는 낙엽에 석회유황합제를 처리한 후 낙엽에 존재하는 진균의 다양성 변화를 확인하였다. 물이 처리된 대조구와 석회유황합제 처리구의 낙엽에서 진균 genomic DNA를 추출한 다음 rDNA internal transcribed spacer (ITS) 영역의 염기서열 분석을 통해 진균들을 동정한 결과, 대조구와 석회유황합제 처리구에서 자낭균문(Ascomycota)과 담자균문(Basidiomycota)에 속하는 다양한 종류의 진균들이 동정되었으나 동정되는 진균의 수와 비율은 서로 다르게 나타났다. 특히 배 과피얼룩병을 일으키는 *Alternaria*속과 *Cladosporium*속의 진균은 대조구에 비해 석회유황합제 처리구에서 동정되는 비율이 대폭 감소되었으며, *Phomopsis*속의 진균은 대조구에서는 동정되었으나 석회유황합제 처리구에서는 동정되지 않았다. 이러한 결과는 석회유황합제 처리가 배 낙엽에 존재하는 진균 다양성의 변화에 영향을 미쳤으며 동계방제로서 역할을 수행할 수 있음을 시사한다.

## Acknowledgements

This study was financially supported by a grant from the Agenda project (PJ010197052015), Rural Development Administration, Republic of Korea.

## REFERENCES

1. Yoon DH, Park HJ, Nam KW. Control effect of environmental-friendly organic materials against major pear diseases. *Korean J Pestic Sci* 2010;14:401-6.
2. Agrios GN. *Plant pathology*. 5th ed. Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
3. McCallan, SE. The nature of the fungicidal action of copper and sulfur. *Bot Rev* 1949;15:629-43.
4. Park YS. *Studies on the skin sooty dapple disease of oriental pear in Korea [dissertation]*. Gwangju: Chonnam National University; 2004.
5. Park YS, Kim KC, Lee JH, Kim IS, Choi YS, Cho SM, Kim YC. Etiology and chemical control of skin sooty dapple disease of Asian Pear. *Korean J Pestic Sci* 2008;12:375-81.
6. Yoon JT, Kim JS, Kang CS. Effective chemical control system of apple scab caused by *Venturia inaequalis*. *Plant Pathol J* 1993;9:180-4.
7. Williamson SM, Sutton TB. Sooty blotch and flyspeck of apple: etiology, biology, and control. *Plant Dis* 2000;84:714-24.
8. Holb IJ, De Jong PF, Heijne B. Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Ann Appl Biol* 2003;142:225-33.
9. Montag J, Schreiber L, Schönherr J. An in vitro study on the postinfection activities of hydrated lime and lime sulphur against apple scab (*Venturia inaequalis*). *J Phytopathol* 2005; 153:485-91.
10. Jamar L, Lefrancq B, Fassotte C, Lateur M. A during-infection spray strategy using sulphur compounds, copper, silicon and a new formulation of potassium bicarbonate for primary scab control in organic apple production. *Eur J Plant Pathol* 2008;122:481-93.
11. Kang HW. Genetic diversity analysis of fungal species by universal rice primer (URP)-PCR. *Kor J Mycol* 2012;40:78-85.
12. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
13. Le Cam B, Devaux M, Parisi L. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. *Phytopathology* 2001;91:900-4.
14. Moon HY. *Ecophysiological characteristics of Venturia nashicola Tanaka & Yamamoto causing pear scab and screening of biocontrol agent against the causal fungus. [MS Thesis]*. Gwangju: Chonnam National University; 2009.
15. Nam KW, Oh SY, Yoon DH. Pear skin stain caused by *Mycosphaerella graminicola* on Niitaka pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Plant Pathol J* 2014;30:229-35.