

## 수박 덩굴마름병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법 개발

# Development of an Efficient Screening System for Resistance of Watermelon Plants to *Didymella bryoniae*

이지현<sup>1</sup> · 장경수<sup>1</sup> · 최용호<sup>1</sup> · 김진철<sup>2</sup> · 최경자<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 친환경신물질연구센터, <sup>2</sup>전남대학교 응용생물공학부

Ji Hyun Lee<sup>1</sup>, Kyoung Soo Jang<sup>1</sup>, Yong Ho Choi<sup>1</sup>, Jin-Cheol Kim<sup>2</sup>, and Gyung Ja Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Eco-Friendly New Materials, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

<sup>2</sup>Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

**\*Corresponding author**

Tel: +82-42-860-7434

Fax: +82-42-861-4913

E-mail: kjchoi@kriect.re.kr

Gummy stem blight, caused by the fungus *Didymella bryoniae*, is major disease of watermelons worldwide. The objective of the present study was to establish an efficient screening system to identify watermelon resistant to *D. bryoniae*. An GSB3 isolate was prepared from a watermelon plant showing typical symptoms of gummy stem blight in Haman-gun and identified as *D. bryoniae* based on molecular analysis of internal transcribed spacer sequence. A simple mass-production technique of inoculum was developed based on spore production of *D. bryoniae* GSB3 under several incubation conditions and their virulence on watermelon plants. Resistance degrees of 22 commercial watermelon cultivars to the GSB3 isolate were evaluated. Among them, four watermelon cultivars showing different degree of resistance response were selected for further study. Development of disease on the cultivars according to various conditions including inoculum concentrations, incubation periods in dew chamber, and incubation temperatures was investigated. From the results, we suggest an efficient screening method for resistant watermelon cultivars to gummy stem blight. Seeds of watermelon cultivar are sown and grown in a greenhouse until plant stage of 2-fully expanded leaves. Seedlings are inoculated with *D. bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $5.0 \times 10^5$  spores/ml. The infected plants are incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Three to four days after inoculation, disease severity of the plant are measured using percentage of infected leaf area.

**Keywords:** Breeding, Disease resistance, Gummy stem blight, Screening

Received May 17, 2016

Revised May 24, 2016

Accepted June 3, 2016

### 서 론

*Didymella bryoniae*에 의한 덩굴마름병은 수박을 포함한 여

러 박과 작물에 큰 피해를 일으키는 병으로 과습하고 따뜻한 기후 조건에서 많이 발생하며, 재배지뿐만 아니라 수확 후에도 발생하여 심각한 손실을 일으킨다(Sherf와 MacNab, 1986). 덩굴마름병이 박과 작물 줄기에 발생하면 초기 회갈색의 불규칙한 병반이 형성되고 심하면 식물체 전체가 고사된다. 앞에서는 황갈색의 작은 반점을 초기에 생성하다가

**Research in Plant Disease**

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

점차 진전되면 큰 원형의 부정형 병반으로 확대되며, 그 후 병반에 흑색 소립의 병자각을 형성하고, 열매와 열매자루에서는 배꼽 부분이 갈색으로 변색되어 결국 열매 전체가 마르고 썩어버린다(Skarshaug, 1981). 특히, 수박의 경우 발생하면 떡잎, 배축, 잎, 과실 등에서 수관이 마르고, 줄기에 궤양이 생기며 잎이 일찍 떨어지는 증상이 나타나는데(Maynard와 Hopkins, 1999), 착과 이후에 이 병이 급격히 발생하기 때문에 과실이 성숙되기 이전에 잎과 덩굴이 말라 죽는 경우가 많다(Kwon 등, 1997).

덩굴마름병을 방제하기 위하여 화학적 방제 방법이 효과적으로 사용되어 왔지만 반복된 농약의 사용으로 인해 환경에 부정적인 영향을 주고 있으며, 약제 저항성을 보이는 병원균 출현도 보고되고 있다(Keinath와 Zitter, 1998; Wolukau 등, 2007). 따라서 합성 작물보호제 만으로는 실질적인 방제가 어려운 상황에서 저항성 품종의 재배는 가장 전략적, 환경 친화적이며 일반적으로 인정되는 경제적인 방제 방법이다(Vakalounakis, 1993, 1995; Wehner와 St. Amand, 1993).

덩굴마름병 저항성 육종 소재 발굴에 관한 연구는 지속적으로 이루어져 왔다. 미국 농무부(United States Department of Agriculture)의 Germplasm Collection에서 보유하고 있는 수박 유전자원 439개 중 'PI 189225'가 가장 높은 저항성을 보였으며(Sowell과 Pointer, 1962), 'PI 271778'도 추가적으로 저항성 소재로 보고되었다(Sowell, 1975). 그리고 감수성인 'Charleston Gray'와의 교잡에서 'PI 189225'의 저항성은 단일 열성 유전자에 의한 것으로 나타났다(Norton, 1979). 이후에 Boylan 등(1994)은 138개의 수박 수집종의 덩굴마름병 저항성 스크리닝을 수행하여 'PI 500335', 'PI 505590', 'PI 512373', 'PI 164247', 'PI 500334' 등의 저항성 소재를 선발하였다. 덩굴마름병 저항성 유전자원인 'PI 189225'와 'PI 271778'를 이용하여 저항성 품종 'AU-Producer', 'AU-Golden Producer', 'AU-Jubilant', 'AU-Sweet Scarlet'을 개발하였으나(Norton, 1979; Norton 등, 1986, 1993, 1995), 이들의 덩굴마름병 저항성이 부모 세대보다 낮아서 덩굴마름병 저항성 육종의 어려움만 확인하였다. 따라서 질적으로 우수한 새로운 덩굴마름병 저항성 육종 소재 발굴과 이를 이용한 저항성 품종 개발 연구가 수행되어야 한다. 이를 위해서는 대량 시료의 덩굴마름병 저항성을 효과적으로 검정하는 것이 필요하다. 하지만 효율적인 수박 덩굴마름병 저항성 검정 체계 확립에 대한 보고는 거의 없다.

저항성 육종 소재 발굴과 덩굴마름병 저항성 계통 육성을 위해서는 한 번에 저항성을 검정하는 식물의 수가 많기 때문에 검정에 사용할 포자를 쉽고 용이하게 대량 생산할 수

있어야 한다. 하지만 덩굴마름병균은 인공배지 상에서 특별한 처리 없이는 거의 포자를 형성하지 않거나, 계통에 따라 전혀 형성하지 않는 경우도 있어 실험에 어려움이 있다고 보고되어 있다(Chiu와 Walker, 1949a; Wiant, 1945). Kwon 등(1997)은 덩굴마름병균의 병포자를 대량생산하는 방법을 보고하였으나, 방법이 복잡하여 좀 더 이용하기 쉬운 방법으로의 개선이 필요하다.

본 연구에서는 효율적인 수박 덩굴마름병 저항성 검정 방법을 확립하고자, *D. bryoniae* GSB3 균주를 사용하여 배양 조건에 따른 포자 생산량과 형성된 포자의 수박에 대한 병원력 차이를 조사하였다. 그리고 시판 중인 수박 22품종의 덩굴마름병균에 대한 저항성 정도를 확인하여 저항성 정도가 다른 수박 4개 품종을 선발하고, 습실 처리 시간, 접종 농도, 접종 후 재배 온도 등의 몇 가지 발병 조건에 따른 이들 품종의 덩굴마름병 발생을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**병원균 분리 및 동정.** 함안 지역에서 전형적인 덩굴마름병 병징을 보이는 수박으로부터 분리한 GSB3 균주를 NongwooBio (Suwon, Korea)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 병든 줄기 조직을 잘라 1% sodium hypochlorite (Samchun Chemical, Pyeongtaek, Korea)로 30초 동안 표면을 살균한 후에 멸균수로 씻고 표면을 말려주었다. Streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 µg/ml가 포함된 potato dextrose agar (PDA; Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA)에 올려 놓고 25°C에서 배양하여 균주를 분리하였다. 이들 중 포자 형성이 가장 좋은 균주(GSB3)의 포자를 백금으로 긁어내어 1.5% water agar (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 배지에 희석도말한 후에 광학현미경 하에서 배지 위에 있는 단일 포자를 떼어내어 PDA 배지에 올려 놓고 25°C에서 배양하였다.

염기서열분석을 통해 병원균 동정을 수행하고자 GSB3 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 7일 동안 배양한 후에 균사체를 수확하였다. 수확된 균사체를 InstaGene Matrix #732-6020 solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 20 µl에 현탁하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후에 상등액 1 µl를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. 염기서열 분석을 위하여 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머(White 등, 1990)를 사용하여 PCR을 수행하였다. InstaGene Matrix 산물 1 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10× PCR buffer 3 µl, 10 pmol의 프라이머 각

각 1  $\mu$ l, 2.5 unit/ $\mu$ l의 EF-Taq DNA polymerase (SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea) 0.2  $\mu$ l를 넣고 멸균수를 첨가하여 최종 30  $\mu$ l의 반응액을 만들었다. Internal transcribed spacer (ITS) 영역 유전자 증폭은 95°C에서 2분간 initial denaturation을 실시한 후에 denaturation 95°C/30초, annealing 54°C/30초, extension 72°C/1분으로 35 cycle을 수행하고 final extension 72°C에서 10분간 실시하였다. 그리고 PCR 산물은 Big Dye<sup>®</sup> terminator ver. 3.1 cycle sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 반응 후 각각의 프라이머로 DNA Engine Tetrad 2 peltier thermal cycler (Bio-Rad)를 이용하여 PCR반응을 수행하고 ABI Prism 3730xl Analyzer 96 capillary type (Applied Biosystems)으로 염기서열 분석결과를 얻었다. 분석된 염기서열은 BLAST search에 의해 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록된 ITS 영역의 염기서열과 비교하였다. GSB3 균주와 GenBank로부터 얻은 염기서열은 CLUSTAL X (Thompson 등, 1994)와 PHYDIT program (Chun, 1995)을 이용하여 분석하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package (Felsenstein, 1985)의 Kimura's 2-parameter distance model (Kimura, 1980)을 이용하여 작성하였다.

**배지 종류와 광처리에 따른 포자 생산량.** 덩굴마름병균 포자를 대량 생산하기 위한 최적의 배지와 포자 유도 방법을 결정하기 위하여 PDA, V8-juice agar (V8A; V8 Juice [Campbell Soup Co., Camden, NJ, USA] 200 ml, CaCO<sub>3</sub> [Samchun Chemical] 3 g, agar 9 g, distilled water 1 l), oatmeal agar (OMA; Becton, Dickinson and Co.)를 멸균하여 직경 8.5 cm의 Petri dish에 부어 배지를 준비하였다. *D. bryoniae* GSB3 균주의 균사조각을 각 배지의 중앙에 1조각씩 접종하여 25°C에서 7일 동안 암상태에서 배양하였다. 포자를 유도하기 위하여 이를 25°C의 항온항습실(상대습도 80%, 광:암=12시간:12시간)로 이동하고 1일 혹은 2일간 더 배양하거나, 1일 혹은 2일 동안 하루에 12시간씩 광처리(53–58  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)한 후에 25°C 배양기로 이동하여 암상태로 2일간 더 배양하여 포자를 형성시켰다. 그리고 여기에 멸균수를 넣고 붓으로 긁어 포자를 수확하고 이를 3점의 가계에 걸러 균사를 제거한 후, 광학현미경 하에서 hemocytometer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konighofen, Germany)를 사용하여 포자 농도를 조사하였다. 이로부터 plate당 형성된 포자의 수를 계산하였다. 포자 형성 실험은 3반복으로 2회 실시하였다.

**식물 재배.** 여러 조건에서 생산한 *D. bryoniae* 포자의 수박 유묘에 대한 병원력 차이 실험은 '꼬꼬마'(Asia Seed Co.,

Ltd., Seoul, Korea)와 '서태자'(Asia Seed Co., Ltd.) 품종을 플라스틱 포트(직경 5 cm, 토양 90 ml)에 원예용 상토 5호(Punong, Gyeongju, Korea)를 넣고 각 품종의 종자를 1립씩 파종한 후에 온실(25°C±5°C)에서 재배한 5가지 생육 시기의 수박 유묘(떡잎과 본엽 1엽, 2엽, 3엽 및 4엽이 충분히 전개된 유묘)를 실험에 사용하였다. 떡잎 시기는 플라스틱 포트(직경 5 cm, 토양 90 ml)에서 재배한 유묘를 사용하였으며, 본엽 1엽 또는 2엽이 충분히 전개된 수박 유묘를 위해서는 플라스틱 포트(직경 6.5 cm, 토양 200 ml)로 한 번 이식하여 재배하였다. 그리고 3엽 또는 4엽이 충분히 전개된 수박 유묘는 한 번 더 새로운 포트(직경 9 cm, 토양 400 ml)로 이식하여 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

수박 품종들의 덩굴마름병균에 대한 저항성 정도 실험을 위해서 시판 중인 수박 품종 22개(원더풀꿀, 지존꿀[KP2], 장춘꿀, 슈퍼그랑프리, 노란부시복, 칠복꿀, 웰빙, 설강102, 부라보꿀, 낙동꿀, 황금꿀, 슈퍼골드, 흑호, 꼬꼬마, 베스트꿀, 누네띠네꿀, 신설강102, 속노란꿀, 노란복, 서태자, 서태자꿀, 감천꿀)를 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다. 플라스틱 포트(직경 5 cm, 토양 90 ml)에 원예용 상토 5호(Punong)를 넣고 각 품종의 종자를 1립씩 파종하여 온실(25°C±5°C)에서 재배한 후 새 플라스틱 포트(직경 6.5 cm, 토양 200 ml)로 이식하여 2엽이 완전히 전개된 수박 유묘를 실험에 사용하였다.

발병 조건에 따른 수박 4개 품종들의 덩굴마름병 발생 정도 조사는 중도저항성 2개 품종 '원더풀꿀'(NongwooBio)과 '지존꿀'(Dongbu Farm Hannong, Seoul, Korea), 그리고 감수성 2개 품종 '꼬꼬마'(Asia Seed Co., Ltd.)와 '서태자'(Asia Seed Co., Ltd.)를 앞에서와 동일한 방법으로 실험하였다.

**접종원 준비.** 포자 형성 방법에 따른 *D. bryoniae* 포자의 병원력 차이 실험을 위해 PDA 배지에 GSB3 균주의 균사조각을 배지 중앙에 접종하고 25°C 암상태에서 7일 동안 배양한 후에 25°C, 상대습도 80%의 항온항습실로 이동시켰다. 하루에 12시간씩 2일간 광처리한 배지와 동일한 방법으로 광처리한 후에, 암상태에서 2일 동안 배양(후숙처리)한 배지에서 형성된 포자를 앞에서와 같은 방법으로 수확하고, 최종 포자 농도를 5.0×10<sup>5</sup> spores/ml로 조정하였다.

접종원 농도에 따른 덩굴마름병 발생 실험을 제외한 나머지 모든 실험을 위해서는 *D. bryoniae* GSB3 균주의 균사조각을 직경 8.5 cm의 PDA 배지에 plate당 3조각씩 접종하고 25°C 암상태에서 7일 동안 배양하였다. 그리고 이를 25°C, 상대습도 80%의 항온항습실로 이동시켜 하루에 12시간씩 2일 동



안 광(53–58  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )을 처리하면서 배양하고, 형성된 포자를 앞에서와 동일한 방법으로 수확하였다. 이를 3겹의 가제로 걸러 균사를 제거하고 광학현미경 하에서 포자 농도를 조사하고, 멸균수로 희석하여  $5.0 \times 10^5$  spores/ml 농도의 포자현탁액을 준비하였다. 그리고 접종원 농도에 따른 수박 품종들의 덩굴마름병 발생 실험을 위해서는 포자 농도가 각각  $2.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$  spores/ml가 되도록 준비한 접종원을 실험에 사용하였다.

**접종 및 병조사.** 수박 유묘에 준비한 *D. bryoniae* GSB3 균주의 포자현탁액을 흘러내리기 직전까지 분무하여 접종하고 25°C 습실에서 2일 동안 배양하였다. 습실 처리한 유묘는 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 처리하며 재배하였다.

습실 처리기간에 따른 수박 덩굴마름병 발생 실험은 앞에서와 같은 방법으로 접종하고, 25°C 습실에서 1일 또는 2일 동안 처리한 수박 유묘를 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 처리하며 재배하였다.

그리고 접종 후 재배 온도에 따른 덩굴마름병 발생 실험은 접종한 수박 유묘를 각각 20°C, 25°C, 30°C 습실에서 2일 동안 배양한 후에 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하고,

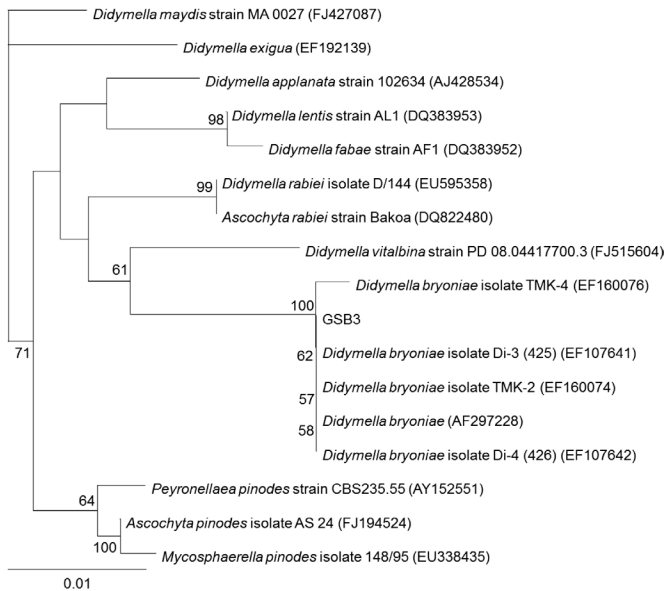
앞에서와 동일한 방법으로 재배하여 덩굴마름병 발생을 유도하였다.

병조사는 접종하고 3–4일 동안 재배하여 덩굴마름병이 충분히 발생한 후에 접종한 잎을 대상으로 달관조사하여 병반면적률(%)을 조사하였으며, 모든 실험은 5반복으로 2회 수행하였다. 그리고 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ )를 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**균주 동정 및 최적 포자 생산 조건.** 덩굴마름병이 발생한 수박으로부터 분리된 GSB3 균주를 동정하고자 rDNA-ITS 영역의 ITS1/4 염기서열을 GenBank의 표준 균주들과 비교 분석한 결과, *D. bryoniae* 균주들과 99.75%–100% 동일한 염기서열을 가졌으며 하나의 그룹을 형성하였다(Fig. 1). 따라서 전 세계적으로 수박, 멜론 등 박과 작물에서 나타나는 전형적인 덩굴마름병 병징을 보이는 병반으로부터 분리된 GSB3 균주는 *D. bryoniae*로 동정되었다.

*D. bryoniae* GSB3 균주의 포자 형성 최적 조건을 결정하고자 3종 배지를 사용하여 광처리 기간 그리고 광처리 후 암처리 여부에 따른 포자 생산량을 조사한 결과, PDA 배지, OMA 배지 그리고 V8 배지 순으로 포자가 많이 형성되었다(Table 1). PDA 배지에서 7일간 배양하고 이를 하루에 12시간씩의 광처리를 1일 동안 한 후 암상태에서 2일 배양하였을 때 가장 많은 수의 포자가 형성되었으며, 2일 동안 광처리하거나 2일 광처리 후 암상태에서 2일 배양한 처리구는 포자 생산



**Fig. 1.** Neighbor-joining tree based on internal transcribed spacer sequences showing relationships among *Didymella bryoniae* GSB3 and closely related species. The values above each branch indicate the percentage levels of bootstrap support (>50%) for the branch point based on 1,000 resamplings. The bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position. GenBank accession number are parentheses.

**Table 1.** Spore production of *Didymella bryoniae* in three media under some irradiation conditions

Irradiation condition*	Total incubation period	No. of spores ( $\times 10^7$ spores/plate)		
		PDA	V8A	OMA
A: One-day (12-h light/day)	8	48 bz	8 ay	36 bzy
A and then two-day darkness	10	182 az	6 ay	88 abz
B: Two-day (12-h light/day)	9	152 az	5 ay	104 abz
B and then two-day darkness	11	153 az	27 ay	185 az

Values in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ . PDA, potato dextrose agar; V8A, V8-juice agar; OMA, oatmeal agar. \**D. bryoniae* inoculated on three media was incubated at 25°C in darkness for 7 days and then further incubated under several irradiation conditions. Experiment was carried out two runs with three replicates each.

량이 다소 낮았다(Table 1). 그러나 1일 광처리만 하였을 때에는 포자가 가장 적게 형성되었다.

덩굴마름병 저항성 검정을 위해서는 포자를 효율적으로 대량 생산하는 것이 중요하다. 그런데 덩굴마름병균 *D. bryoniae*는 암상태 하에서 인공배양하였을 때에는 포자가 거의 형성되지 않는다고 보고되었다(Chiu와 Walker, 1949a; Wiant, 1945). Kwon 등(1997)은 덩굴마름병균 포자 대량 생산 방법으로 먼저 암상태 하에서 26°C에서 2일간 배양하고 동일 온도에서 하루 12시간씩 2-3일 자외선을 조사하면서 배양한 후 자외선 조사를 중지하고 암상태 하에서 다시 2일간 두어 병자각 형성을 유도하고, 이후 4-5일간 암상태 하에서 포자를 성숙시킨 후에 포자를 실험에 사용하는 방법을 제안하였다. 하지만 본 연구에서는 *D. bryoniae*를 PDA 배지에 접종하고 7일 동안 배양한 후에 하루에 12시간씩 2일 동안 광을 처리하는 것만으로도 효과적으로 덩굴마름병균 포자를 짧은 시간에 많이 얻을 수 있었다.

**생산 방법에 따른 포자의 병원력 차이.** 포자 생산 방법에 따른 덩굴마름병균 포자의 수박에 대한 병원력 (virulence) 차이를 조사하고자 7일간 암상태에서 배양한 것을 2일간 광처리하여 형성된 포자와 광처리 후에 추가로 암상태에서 2일간 배양하여 형성된 포자를 수박 유묘에 접종하여 덩굴마름병 발생을 비교한 결과, 광처리만 하였을 때에는 평균 98%의 병반면적률을, 그리고 광처리 후 암처리 하였을 때에는 평균 94%의 병반면적률을 보여 덩굴마름병균 포자의 병원력은 추가적인 암처리 여부와 관계없음을 알

수 있었다(Table 2).

Kwon 등(1997)은 덩굴마름병균 포자 대량 생산 방법으로 먼저 병자각 형성을 유도하고 이후에 4-5일간 암상태 하에서 포자를 성숙시킨 후에 포자를 실험에 사용하는 방법을 제안하였다. 하지만, 본 실험에서는 PDA 배지에 덩굴마름병균을 접종하고 병원균이 충분히 자란 후에 이를 하루 12시간씩 2일 동안 광처리하는 것만으로, 즉 별도의 후속처리 없이도 강한 병원력을 나타내는 다량의 포자를 얻을 수 있었다(Table 2). 따라서 이 방법을 사용하면 기존의 덩굴마름병균 포자 형성 방법에 비하여 간단하게 다량의 포자를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

한편, 암처리를 하지 않은 조건에서 형성된 포자들은 떡잎, 본엽 1엽, 2엽, 3엽, 4엽이 전개된 수박 유묘에서 각각 100%, 99%, 100%, 98%, 97%의 평균 병반면적률을 보였으며, 암처리를 한 포자의 경우에는 각각 100%, 100%, 94%, 96%, 83%의 평균 병반면적률을 나타내었다(Table 2). 접종하는 수박 유묘의 생육 시기에 따른 덩굴마름병 발생은 생장 단계가 높아질수록 덩굴마름병의 발생이 약간 감소하나 큰 차이가 없었다. 떡잎 단계에서도 병이 순조롭게 진행되었으나 덩굴마름병 저항성 검정에서 떡잎의 접종한 결과는 믿을 수 없다는 보고가 있으므로(Chiu와 Walker, 1949b; van Deer Meer 등, 1978; Wyszogrodzka 등, 1986), 2엽이 충분히 전개된 수박 유묘 시기에 덩굴마름병균을 접종하는 것으로 결정하였다.

**수박 22개 품종의 저항성.** 시판 중인 수박 22 품종의 *D. bryoniae*에 의해 발생하는 덩굴마름병에 대한 저항성 검정

**Table 2.** Disease development of watermelon plants inoculated with spores of *Didymella bryoniae* produced under two irradiation conditions\*

Irradiation condition	Cultivar	Plant growth stage (No. of fully expanded leaves)				
		0	1	2	3	4
A: Two-day (12-h light/day)	Kokoma	100±0.0 az	100±0.0 az	100±0.0 az	100±0.0 az	93±5.8 bz
	Seotaja	100±0.0 az	97±13 abz	100±0.0 az	97±5.8 az	100±0.0 az
	Mean	100	99	100	98	97
A and then two-day darkness	Kokoma	100±0.0 az	100±0.0 az	100±0.0 az	98±3.5 az	85±18 bcz
	Seotaja	100±0.0 az	100±0.0 az	87±15 bz	95±5.0 az	82±24 bcz
	Mean	100	100	94	96	83

Each value represents the mean disease severity±standard deviation of two runs with five replicates each.

Values in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

\*Seeds of watermelon cultivar were sown and grown in a greenhouse at 25°C±5°C to be growth stage of cotyledone and 1-, 2-, 3-, and 4-fully expanded leaves. Seedlings were inoculated with *D. bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $5.0 \times 10^5$  spores/ml. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Four days after inoculation, disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area.



**Fig. 2.** Typical symptomatic images of two watermelon cultivars to gummy stem blight. (A) 'Wonderfulggul' (moderately resistant). (B) 'Seotaja' (susceptible).

을 수행한 결과, 실험한 모든 품종은 39% 이상의 높은 병반 면적률을 보였다(Fig. 2, Table 3). 따라서 실험한 품종 중 덩굴마름병에 대하여 높은 저항성을 보이는 품종은 없는 것으로 생각되었다. 하지만 '원더풀꿀'과 '지존꿀'은 다른 품종들에 비하여 상대적으로 낮은 병반면적률을 보였다.

수박 덩굴마름병에 대한 효율적인 저항성 검정 체계 확립을 위한 발병조건에 따른 수박 품종들의 덩굴마름병 발생을 실험하기 위하여, 실험한 품종 중 가장 높은 저항성을 보인 두 품종(원더풀꿀, 지존꿀)을 중도저항성 품종으로, 그리고 덩굴마름병이 심하게 발생한 두 품종(꼬꼬마, 서태자)을 감수성 품종으로 선발하였다.

**습실 처리 기간에 따른 덩굴마름병 발생.** 접종 후 습실 처리 기간에 따라 선발한 수박 4개 품종의 덩굴마름병의 발생을 실험한 결과, 48시간 동안 습실 처리한 경우에는 중도저항성 품종인 '원더풀꿀'과 '지존꿀'에서 각각 19%와 8%의 병반면적률을, 그리고 감수성 품종인 '꼬꼬마'와 '서태자'는 각각 77%와 84%의 병반면적률을 나타내었다(Table 4). 그러나 24시간 동안 습실 처리하였을 때에는 실험한 모든 품종은 11% 이하의 낮은 병반면적률을 보였다(Table 4).

덩굴마름병의 발생에 습도는 매우 중요한 요소로서 비가 온 후에 야간에 이슬이 낀 기간이 포자 확산의 절정이며, 잎에 최소 1시간의 자유수분(free moisture)이 있어야 감염이 일어나고 지속적으로 잎이 젖어있어야 병반이 진전된다고 하였다(Sitterly와 Keinath, 1996). 본 연구에서도 접종 후 24시간 동안의 습실 처리만으로는 병이 충분히 진전될 수 없었고, 48시간 동안 습실 처리하고 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 처리하며 덩굴마름

**Table 3.** Resistance degree of 22 commercial watermelon cultivars to *Didymella bryoniae*\*

Cultivar	Infected leaf area (%)	Cultivar	Infected leaf area (%)
Wonderfulggul	39±25 d	Supergold	93±9.7 abc
Jijonggul	70±34 cd	Heukho	94±4.2 abc
Jangchunggul	72±5.7 bc	Kokoma	95±6.1 abc
Supergrandprix	80±16 abc	Bestggul	95±8.7 abc
Noranbusibok	82±16 abc	Nunettineggul	96±4.2 abc
Chilbokggul	83±15 abc	SinSeolang102	96±4.2 abc
Wellbing	84±19 abc	Soknoranggul	97±2.7 abc
Seolang102	84±25 abc	Noranbok	98±2.7 ab
Bravoggul	88±27 abc	Seotaja	98±4.5 ab
Nakdonggul	89±6.5 abc	Seotajaggul	98±4.5 ab
Hwanggeumggul	91±11 abc	Kamchunggul	99±2.2 a

Each value represents the mean disease severity±standard deviation. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

\*Seedlings with 2-fully expanded leaves were inoculated with *D. bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $5.0 \times 10^5$  spores/ml. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Three days after inoculation, disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area. Experiment was carried out two runs with five replicates each.

**Table 4.** Development of gummy stem blight on four watermelon cultivars according to incubation period in dew chamber after inoculation\*

Cultivar	Trait	Incubation period in dew chamber	
		24 h	48 h
Wonderfulggul	MR	8±2.7 az	19±11 cz
Jijonggul	MR	6±2.2 az	8±2.7 cz
Kokoma	S	5±0.0 ay	77±34 abz
Seotaja	S	11±6.5 ay	84±26 az

Each value represents the mean disease severity±standard deviation of two runs with five replicates each.

Values in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

MR, moderately resistant; S, susceptible.

\*Seedlings with 2-fully expanded leaves were inoculated with *Didymella bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $5.0 \times 10^5$  spores/ml. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 or 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Three days after inoculation, disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area.



병 발생을 유도하는 것이 수박 덩굴마름병 발생에 효과적인 동시에 품종 간의 저항성 반응 차이도 잘 나타내어 저항성 검정에 효과적인 것으로 생각되었다.

**접종 농도에 따른 덩굴마름병 발생.** 저항성 검정을 위한 적정 포자 농도를 결정하고자 수박 4품종의 유묘에 4 가지 농도의 포자현탁액( $2.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$  spores/ml)을 분무 접종하고 덩굴마름병 발생을 조사한 결과, 실험한 모든 품종에서 포자 농도가 증가함에 따라 병반면적률이 증가하였다(Table 5).  $5.0 \times 10^5$  spores/ml 농도의 포자현탁액을 접종하였을 때에는 ‘원더풀꿀’, ‘지존꿀’, ‘꼬꼬마’, ‘서태자’ 품종에서 각각 26%, 28%, 58%, 59%의 병반면적률을 보여 품종 간의 저항성 차이를 잘 나타내었다(Table 5). 하지만 가장 높은  $2.5 \times 10^6$  spores/ml 농도의 포자현탁액을 접종하였을 때에는 ‘원더풀’과 ‘지존’에서도 각각 68%, 48%의 높은 병반면적률을 보였으며,  $1.0 \times 10^5$  spores/ml 이하의 농도로 접종하였을 때는 감수성 품종에서도 43% 이하의 낮은 병반면적률을 보였다.

박과 작물의 덩굴마름병 저항성을 평가하기 위해서 많은 연구자들은  $10^5$ – $10^7$  spores/ml 범위의 포자 농도를 사용하여 실험하였다(Boylan 등, 1994; St. Amand와 Wehner, 1995a, 1995b; van Deer Meer 등, 1978; van Steekelenburg, 1981; Wehner와 St. Amand, 1993; Zhang 등, 1995, 1997). 하지만 수박의 경우에는 본 연구의 결과에 따라  $5.0 \times 10^5$  spores/ml 농도의 포자현탁액을 사용하여 수박 덩굴마름병 저항성 검정을 수행하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

**접종 후 초기 재배온도에 따른 덩굴마름병 발생.** 수박 유묘에 포자현탁액을 분무 접종한 후 각각 20°C, 25°C,

30°C의 습실에 2일 동안 재배하여 네 품종들의 덩굴마름병 발생 정도를 조사한 결과, 실험한 모든 품종에서 접종 후 재배 온도가 높아질수록 덩굴마름병 발생이 증가하였다(Table 6). 25°C에서 습실 처리하였을 때에 ‘원더풀꿀’과 ‘지존꿀’은 각각 25%와 24%의 병반면적률을 보였으며, ‘꼬꼬마’와 ‘서태자’는 각각 60%와 58%의 병반면적률을 보여 품종들의 저항성과 감수성을 잘 나타내었다. 하지만 20°C에서는 감수성 품종(꼬꼬마, 서태자)에서도 15% 이하의 낮은 병반면적률을 보여 덩굴마름병 발생에 적합하지 않았으며, 30°C에서는 중도저항성 대조품종인 ‘원더풀꿀’과 ‘지존꿀’도 34%와 59%

**Table 6.** Development of gummy stem blight on four watermelon cultivars according to incubation temperature in dew chamber inoculation\*

Cultivar	Trait	Incubation temperature in dew chamber		
		20°C	25°C	30°C
Wonderfulggul	MR	3±2.9 az	25±16 bz	34±32 bz
Jijonggul	MR	11±10 ay	24±18 by	59±12 abz
Kokoma	S	9±6.5 ax	60±13 ay	89±15 az
Seotaja	S	15±20 ay	58±14 az	59±8.2 abz

Each value represents the mean disease severity±standard deviation of two runs with five replicates each.

Values in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

MR, moderately resistant; S, susceptible.

\*Seedlings with 2-fully expanded leaves were inoculated with *D. bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $5.0 \times 10^5$  spores/ml. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 20°C, 25°C, and 30°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Three days after inoculation, disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area.

**Table 5.** Development of gummy stem blight on four watermelon cultivars according to inoculum concentration\*

Cultivar	Trait	Inoculum concentration (spores/ml)			
		$2.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6$
Wonderfulggul	MR	9±4.2 ay	24±15 azy	26±12 bzy	68±24 abz
Jijonggul	MR	16±16 az	38±32 az	28±11 bz	48±19 bz
Kokoma	S	11±6.3 ay	43±35 azy	58±30 az	81±18 az
Seotaja	S	17±10 ay	21±11 ay	59±20 az	86±16 az

Each value represents the mean disease severity±standard deviation of two runs with five replicates each.

Values in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

MR, moderately resistant; S, susceptible.

\*Seedlings with 2-fully expanded leaves were inoculated with *D. bryoniae* by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of  $2.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$ , and  $2.5 \times 10^6$  spores/ml. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% relative humidity with 12-hour light a day. Three days after inoculation, disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area.

의 높은 덩굴마름병 발생을 나타내므로 품종 간 저항성 차이가 잘 나타나지 않았다(Table 6).

Sitterly와 Keinath (1996)가 덩굴마름병 감염에 멜론은 20°C, 그리고 수박과 오이는 24°C-25°C가 최적 온도라고 보고하였다. 본 연구에서는 접종하고 25°C에서 2일 동안 습실 처리한 후에 25°C, 상대습도 80% 환경하에서 하루에 12시간씩 광을 조사하였을 때 감수성 품종에서 덩굴마름병 발생도 높았고 품종 간의 저항성 차이도 효과적으로 나타났다.

이상의 결과로부터 *D. bryoniae*에 의한 덩굴마름병에 대한 수박 품종들의 저항성을 검정하기 위한 방법으로 수박 종자를 파종하고 온실에서 본엽2엽이 충분히 펼쳐질 때까지 재배한다. 그리고 재배한 수박 유묘에  $5.0 \times 10^5$  spores/ml 농도의 *D. bryoniae* 포자현탁액을 흘려내리기 직전까지 충분히 분무하여 접종하고, 25°C 암상태로 48시간 동안 습실 처리한 유묘는 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루 12시간씩 광을 조사하면서 재배하고, 접종 3-4일 후에 감수성 대조구에 덩굴마름병이 충분히 발생하였을 때 접종한 잎의 병반면적률(%)을 조사하는 것을 제안하고자 한다.

## 요 약

*D. bryoniae*에 의해 발생하는 덩굴마름병은 세계적으로 수박 재배에 주요한 병으로 알려져 있으며, 본 실험은 *D. bryoniae*에 대한 수박의 효율적인 저항성 검정법을 확립하기 위해 수행하였다. 함안 지역에서 전형적인 덩굴마름병 병징을 보이는 수박으로부터 GBS3 균주를 분리하였고 ITS 영역의 염기서열 분석을 통해 GBS3 균주는 *D. bryoniae*로 동정되었다. 다양한 조건에서의 포자 형성량과 형성된 포자의 5가지 생육 시기의 수박 유묘에 대해 병원력 차이를 조사하고, 이로부터 저항성 검정을 위한 간편한 접종원 대량 생산 방법을 확립하였다. 시판 중인 수박 22개 품종의 GBS3 균주에 대한 저항성 정도를 확인하고, 그 결과로부터 저항성 정도가 다른 수박 4개 품종을 선발하였다. 그리고 접종원 농도, 습실 처리 기간, 접종 후 재배온도 등의 발병 조건에 따른 이들 품종의 덩굴마름병 발생을 조사하였다. 이들 결과로부터 덩굴마름병에 대한 효율적인 수박 저항성 검정 방법으로 본엽 2엽이 충분히 전개된 수박 유묘에  $5.0 \times 10^5$  spores/ml 농도의 *D. bryoniae* 포자현탁액을 분무접종하고, 25°C 습실에서 48시간 동안 배양 후에 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루 12시간씩 광을 처리하면서 재배하고, 접종 3-4일 후에 접종한 잎의 병반면적률을 조사하는 것을 제안하고자 한다.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgement

This research was supported by Golden Seed Project Vegetable Seed Center (213002-04-4-SBc10, 213002-04-4-SBZ10), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Service (KFS).

## References

- Boylan, G. E., Norton, J. D. and Abrahams, B. R. 1994. Screening for resistance to anthracnose (race 2), gummy stem blight, and root knot nematode in watermelon germplasm. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 17: 106-110.
- Chiu, W. F. and Walker, J. C. 1949a. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. *J. Agric. Res.* 78: 81-102.
- Chiu, W. F. and Walker, J. C. 1949b. Physiology and pathogenicity of cucurbit black-rot fungus. *J. Agric. Res.* 78: 589-615.
- Chun, J. S. 1995. Computer-assisted classification and identification of Actinomycetes. Ph.D. thesis. University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Keinath, A. P. and Zitter, T. A. 1998. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South Carolina and New York. *Plant Dis.* 82: 479-484.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kwon, M. K., Hong, J. R., Sun, H. J., Sung, K. Y., Cho, B. H. and Kim, K. C. 1997. Standardization of a mass-production technique for pycnidiospores of *Didymella bryoniae*, gummy stem blight fungus of cucurbits. *Korean J. Plant Pathol.* 13: 105-112. (In Korean)
- Maynard, D. N. and Hopkins, D. L. 1999. Watermelon fruit disorders. *HortTechnology* 9: 155-161.
- Norton, J. D. 1979. Inheritance of resistance to gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* in watermelon. *HortScience* 14: 630-632.
- Norton, J. D., Boyhan, G. E., Smith, D. A. and Abrahams, B. R. 1993. 'AU-Golden Producer' watermelon. *HortScience* 28: 681-682.
- Norton, J. D., Boyhan, G. E., Smith, D. A. and Abrahams, B. R. 1995. 'AU-Sweet Scarlet' watermelon. *HortScience* 30: 393-394.
- Norton, J. D., Cospers, R. D., Smith, D. A. and Rymal, K. S. 1986. 'AU-Jubilant' and 'AU-Producer' watermelons. *HortScience* 21: 1460-1461.
- Sherf, A. F. and MacNab, A. A. 1986. Vegetable Diseases and Their



- Control. 2nd ed. J. Wiley, New York, NY, USA.
- Sitterly, W. R. and Keinath, A. P. 1996. Gummy stem blight. In: Compendium of Cucurbit Disease, eds. by T. A. Zitter, D. L. Hopkins and C. E. Thomas, pp. 27-28. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.
- Skarshaug, A. J. 1981. Centrum development in *Didymella bryoniae*. *Am. J. Bot.* 68: 1096-1103.
- Sowell, G. 1975. An additional source of resistance to gummy stem blight in watermelon. *Plant Dis. Rep.* 59: 413-415.
- Sowell, G. and Pointer, G. R. 1962. Gummy stem blight resistance in introduced watermelons. *Plant Dis. Rep.* 46: 883-885.
- St. Amand, P. C. and Wehner, T. C. 1995a. Eight isolates of *Didymella bryoniae* from geographically diverse areas exhibit variation in virulence but no isolate by cultivar interaction on *Cucumis sativus*. *Plant Dis.* 79: 1136-1139.
- St. Amand, P. C. and Wehner, T. C. 1995b. Greenhouse, detached leaf, and field testing methods to determine cucumber resistance to gummy stem blight. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 673-680.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Vakalounakis, D. J. 1993. Inheritance and genetic linkage of fusarium wilt (*Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerinum* race 1) and scab (*Cladisporium cucumerinum*) resistance genes in cucumber (*Cucumis sativus*). *Ann. Appl. Biol.* 123: 359-365.
- Vakalounakis, D. J. 1995. Inheritance and linkage of resistance in cucumber line SMR-18 to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Pathol.* 44: 169-172.
- van Der Meer, Q. P., van Bennekom, J. L. and van Der Giessen, A. C. 1978. Gummy stem blight resistance of cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 27: 861-864.
- van Steekelenburg, N. A. M. 1981. Comparison of inoculation methods with *Didymella bryoniae* on *Cucumis sativus*. *Euphytica* 30: 515-520.
- Wehner, T. C. and St. Amand, P. C. 1993. Field tests for cucumber resistance to gummy stem blight in North Carolina. *HortScience* 28: 327-329.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Wiant, J. S. 1945. Mycosphaerella black rot of cucurbits. *J. Agric. Res.* 71: 193-213.
- Wolukau, J. N., Zhou, X. H., Li, Y., Zhang, Y. B. and Chen, J. F. 2007. Resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498. *HortScience* 42: 215-221.
- Wyszogrodzka, A. J., Williams, P. H. and Peterson, C. E. 1986. Search for resistance to gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 35: 603-613.
- Zhang, Y. P., Anagnostou, K., Kyle, M. and Zitter, T. A. 1995. Seedling screens for resistance to gummy stem blight in squash. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 18: 59-61.
- Zhang, Y. P., Kyle, M., Anagnostou, K. and Zitter, T. A. 1997. Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field. *HortScience* 32: 117-121.