

## 박과작물 덩굴마름병균 *Didymella bryoniae*의 병포자 대량 생산 방법의 표준화

권미경 · 홍정래 · 선해정<sup>1</sup> · 성기영 · 조백호 · 김기침\*  
전남대학교 농과대학 응용식물학부  
<sup>1</sup>서울종묘기술연구소

### Standardization of a Mass-Production Technique for Pycnidiospores of *Didymella bryoniae*, Gummy Stem Blight Fungus of Cucurbits

Mi Kyung Kwon, Jeong Rae Hong, Hae Jeong Sun<sup>1</sup>, Ki Yeong Sung,  
Baik Ho Cho and Ki Chung Kim\*

Faculty of Applied Plant Science, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
<sup>1</sup>Seoul Plant Seeds Co. Breeding Station, Janghowon, Icheon 135-080, Korea

**ABSTRACT:** *Didymella bryoniae*, gummy stem blight fungus of cucurbits, has been known not to produce its pycnidium *in vitro* without irradiation. Various methods for producing pycnidiospores of the fungus as an inoculum have been used. However, those methods have not been verified in terms of efficiency of the productivity, activity and synchronous maturation of the inoculum. Therefore, a pycnidiospore production method *in vitro* that is highly reliable and reproducible has to be developed to obtain a large amount of inoculum for screening disease resistant varieties or effective fungicides. Here we standardized a mass-production technique for pycnidiospores of *D. bryoniae in vitro* by comprehensively finding the optimal conditions such as kinds and thickness of cultural medium, growing temperature, and quality and duration of irradiation as well as examining the activity and pathogenicity of the pycnidiospores reproduced. In brief, mycelial colony on the PDA plate was cultured at 26°C for 2 days under the darkness, and then the plate was irradiated under the UV light (12 hr/a day) for 2~3 days at the same temperature(26°C). Two days after UV irradiation, a great number of pycnidia was simultaneously formed. This plate was subjected to darkness again for 4~5 days to mature pycnidiospores. We could obtain a large amount of inoculum that is synchronously matured in a short period of time through the above procedures.

**Key words:** *Didymella bryoniae*, cucurbits, gummy stem blight fungus, pycnidiospore mass-production, UV irradiation

*Didymella bryoniae*는 박과작물의 덩굴마름병균으로서, 멜론, 수박, 참외, 오이, 호박 등에 병을 일으킨다. 수박, 참외, 오이, 호박의 시설 재배가 성행하면서 노지에서 발생했던 탄저병은 거의 발생하지 않으나 그 대신 덩굴마름병의 피해가 극심하게 되었다(8). 더욱이 축성재배에 있어서는 가온비의 절감을 위해 야간의 시설내 온도를 한계온도에 가깝게 유지시키기 때문에 하우스내 상대습도가 야간에 아주 높아져 이 병을 격발시키게 된다. 박과작물 중에서도 멜론이 가장 치명적이며 참외와 수박도 피해가 아주 큰 편이다

(12, 16). 노지재배에서도 이 병의 발생이 심하며, 특히 수박의 경우 착과 이후에 이 병이 급격히 발생하기 때문에, 과실이 성숙되기 이전에 일과 덩굴이 말라죽는 경우가 허다하다. 따라서 수박 및 멜론의 안정적 생산을 위해서는 저항성 계통의 선발 및 육성이 시급한 실정이다.

병에 관련된 연구를 위해서는 병원균의 취급과 조작이 쉬워야 한다. 특히 저항성 계통 육성에서는 식물의 취급 개체수가 많기 때문에 많은 양의 포자 현탁액이 요구된다. 그런데 덩굴마름병균은 인공배지상에서 특별한 처리없이 거의 포자를 형성하지 않거나 또는 계통에 따라서는 전혀 형성하지 않는 것도 있어(4,

\*Corresponding author.

22), 실험에 어려움을 겪게 된다. 이 균의 포자 형성은 광에 의해 촉진된다는 것이 알려지면서(2, 5), 연구자들은 이 병원균의 포자를 얻기 위해 광을 조사하여 병자각 형성을 유기시켜 왔다. 그러나 연구자에 따라 실내 자연광(1, 20), 형광등(3, 7, 10, 23-25) 또는 자외선광(11, 13, 19) 등을 조사하는 여러 가지 방법을 사용해 왔다. 또 연구자마다 사용배지(5, 10, 13, 23), 배양기간, 처리광의 종류, 광조사 시기 및 시간이 달라 집중원으로서의 여러 가지 문제점을 안고 있다. 즉 이들 방법들은 오직 포자 형성에만 초점이 맞추어졌을 뿐, 형성된 포자의 양, 소요시간, 작업의 번잡성, 형성된 포자의 활성, 同調性(synchronously matured) 및 동질성이 고려되지 않은 포자형성법들이다. 따라서 많은 양의 집중원을 요하는 계통선발에 있어서 보다 손쉽고 효율적인 다량의 동조적 포자를 얻는 표준적인 방법의 개발이 절실하게 요구된다.

이 연구는 potato dextrose agar(PDA)상에서 신속하고, 효율적이면서 同調性인 다량의 포자를 손쉽게 생산하는 표준적인 방법을 개발하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

공시균의 배양. 공시균으로는 96년도에 덩굴마름병에 걸린 수박잎과 덩굴로부터 조직분리한 균주들을 사용하였다. 이들 균주는 PDA에 배양하여 4°C에 보존해 온 것으로, 이로부터 균총을 증식하여 공시하였다. 공시배지로는 기본적으로 PDA(Difco)를 사용했고, 연구목적에 따라 V-8 agar(Difco), malt-extract agar(MEA; Difco) 및 green bean agar(GBA)를 사용했다. GBA는 green bean baby food 226 g을 homogenizer로 갈아 그 즙액을 걸러낸 다음, 여기에 탈이온수를 가하여 1 liter로 만들고 다시 분말한천 15 g을 가하여 조제하였다(21). 배양조건은 실험목적에 따라 달리하였다.

변온(變溫)과 광조사(光照射). 공시균을 암상태에서 일정기간 배양한 후, 실내 자연광(300 lux), 살균용 자외선 등(G40T10 40W, Sanyo Denky, Japan) 및 주광색 형광등(FL20WD)을 배양 25 cm 상부로부터 조사하였다. 암처리는 300 lux 이하의 실내에 설치한 항온기를 이용하여 완전히 암상태로 유지하고 그 속에서 병원균을 취급하였다. 변온처리는 광처리전의 암상태에서 균배양온도 및 배양시간을 달리하였고, 이어서 광조사시의 온도와 조사시간을 달리하여 병자각을 형성시켰다.

병자각 및 포자 형성수 조사. 병자각이 배지 전면

에 경우도 있으므로 병자각이 형성되어 있는 균총면적을 측정하고, 그 중 4개소를 선정하여 1 cm<sup>2</sup>당 병자각의 수를 colony counter를 이용하여 조사하였다. 이를 포자형성 전체면적에 곱하여 전체 병자각의 수를 추정하였고, 이를 균총 전체 면적으로 나누어 균총 1 cm<sup>2</sup>당 병자각의 수로 추정, 표시하였다. 포자형성수는 병자각이 형성된 평판배양(직경 9 cm petridish)에 10 ml의 멸균수를 부어 넣고 가볍게 rubber brush로 문지른 다음 haemocytometer를 이용하여 1 ml/당 포자수를 추정하였다.

포자발아율 조사. 병자각내에 형성된 병포자의 발아율은 병자각이 형성된 후 8일째에 멸균증류수 또는 0.1% glucose 용액으로 포자 현탁액을 만들어 이를 10<sup>4</sup>포자/ml로 조정하여, 26°C에서 3일간 발아율을 조사하였다. 발아판 길이가 포자 길이의 2배 이상인 것을 발아된 것으로 간주하였다.

병원성 검정. UV조사에 의해 유기된 병포자의 병원성은 유묘검정으로 실시하였다. Peat moss와 vermiculite를 4:1로 섞어 담은 직경 5 cm의 pot에 최아종자 1개씩을 심고, 제1본엽이 완전히 전개하고 제2본엽이 자랄 때까지 생장상(21~24°C, 30,000 lux, 12 hr photo period, RH 50~60%)에서 생육시켰다. 병원균 접종전에 멸균수를 분무하여 식물체를 씻어내고, 물기를 제거한 다음 포자 현탁액(10<sup>6</sup>포자/ml)을 식물 전체에 살포하였다. 그 후 고습도를 유지하기 위해 대형 plastic 용기에 담아 24°C, 암상태에서 24시간 보존했다가 꺼내 밝은 창가에 배열하고 5일째에 발병정도를 평가하였다. 발병정도는 0~7까지의 scale로 조사하였는데, 0=무감염, 1=1~10%, 2=11~25%, 3=26~50%, 5=51~75%, 6=90% 이상의 잎병반면적, 7=자엽 및 제1본엽이 완전 봉괴된 것으로 하였으며(1, 21), 1처리구에 수박묘 3개체를 이용하여 평균치로 표시하였다.

## 결 과

배양기간, 조사광 및 배지가 병자각 형성에 미치는 영향. 덩굴마름병균의 병자각 형성에 미치는 배양기간, 조사광질 및 배지종류의 영향을 Table 1에 나타냈다. 암상태 하에서 병원균을 단기간 배양했을 경우는 거의 基底균사만 생장할 뿐 氣中균사는 생장하지 않았는데 반해, 장기간 배양할 경우는 기중균사가 무성하였다. 2일간 암상태에서 배양한 균총에 하루 12시간씩 살균용 자외선 등을 조사한 경우에는 배지종류에 관계없이 1 cm<sup>2</sup>당 1,000~1,300개의 많은 병자각이 형성되었으나, 하루 14시간의 실내광(300 lux)하에서는

**Table 1.** Effects of cultural medium, cultural period and light irradiation on the production of pycnidia of *Didymella bryoniae* DW96-61

Irradiation <sup>a</sup>	No. of pycnidium <sup>b</sup> /cm <sup>2</sup> of medium <sup>c</sup>			
	V-8 agar	MEA	PDA	GBA
2 days after dark incubation				
14 hr indoor light/day	0	0	0	0
12 hr UV light/day	1,139	1,000	1,348	1,360
Continuous FL light	189	90	960	1,280
Continuous UV light			0	0
Continuous darkness	0	0	0	0
7 days after dark incubation				
Aerial mycelium was removed;				
12 hr UV light/day	0	0	0	0
12 hr FL light/day	0	0	0	0
Continuous UV light			0	0
Plate was cut into pieces after removing aerial mycelium;				
12 hr indoor light/day	0	0	0	0

<sup>a</sup> All treatments were done at room temperature (21 to 24 °C) and under the indoor light (300 lux), FL light (FL 20WD, 1890 lux) or UV light (germicidal lamp G40T10 40W, Sanyo Denky).

<sup>b</sup> Mean values of 2 petri plates(9 cm diam.).

<sup>c</sup> MEA: malt extract agar; PDA: potato dextrose agar; GBA: green bean agar.

전혀 형성되지 않았다. 또 형광등(1,600 lux)을 계속해서 조사했을 경우에는 배지의 종류에 따라 형성되는 병자각의 수에 상당한 차이를 나타냈다. 즉 GBA에서는 살균등 12시간 조사구와 비슷한 수의 병자각을 형성했지만 V-8 agar나 MEA에서는 그 형성수가 아주 낮았다. 그리고 광조사없이 암상태로 계속 유지되었을 경우와 UV를 계속 조사했을 경우에는 병자각이 전혀 형성되지 않았다. 계속적인 UV조사구는 균총의 생장에 이상이 나타났다. 한편 암상태 하에서 7일간 배양한 다음, 기중균사를 제거하고 하루 12시간씩 UV 또는 FL을 조사했을 경우나, 기중균사를 제거한 경우, 또 이를 다시 균총배지를 바둑판처럼 절단한 경우, 모두 실내광하에 방치해 두어도 병자각이 형성되지 않았다. 이 실험의 결과 덩굴마름병균은 암상태하에서는 병자각을 형성하지 않으며, 이의 형성 유기에는 형광등보다는 자외선 등의 조사가 훨씬 효과적이었다. UV 조사에서는 배지간에 거의 차이 없이 병자각이 잘

**Table 2.** Effect of thickness of PDA medium on the production of pycnidia and pycnidiospores of *Didymella bryoniae* under the UV irradiation

Medium thickness(mm) (vol. in 9 cm-diam. petridish)	No. of pycnidia/cm <sup>2a</sup>	No. of pycnidiospores/ml <sup>a</sup>
0.75 (5 ml)	860	3.4 × 10 <sup>5</sup>
1.50 (10 ml)	1280	26 × 10 <sup>5</sup>
2.25 (15 ml)	1436	45 × 10 <sup>5</sup>
3.20 (20 ml)	1729	47 × 10 <sup>5</sup>
3.75 (25 ml)	1900	98 × 10 <sup>5</sup>
4.50 (30 ml)	1630	43 × 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Mean values of 3 petri plates.

형성되었지만, FL 조사에서는 GBA, PDA, V-8 agar, MEA의 순으로 병자각 형성이 저하되었다. 광조사 없이는 균총에 대한 기계적 손상도 병자각 형성 유기에 아무런 효과가 없었다.

한편 병자각 형성에 있어서 광의 효과를 확인하기 위해 국내 각 지역에서 분리한 301균주에 대해 암처리와 UV처리를 한 다음 병자각 형성 여부를 검정한 결과, UV처리에서는 모든 균주에서 병자각이 형성되었으나 완전히 암처리 하에서는 병자각이 전혀 형성되지 않았다(자료 생략). 그러나 배양기간 중 다른 목적으로 항온기의 문을 빈번히 개폐하거나 배양을 꺼냈을 경우에는 균주에 따라 약간의 병자각이 형성된 경우도 있었다.

PDA 배지두께가 병자각 형성에 미치는 영향. 실험 과정에서 배지 종류 뿐만 아니라 배지 두께에 따라서도 병자각 형성수가 달라지는 것 같아 이를 확인하였다. 직경 9 cm인 1회용 petridish에 PDA를 주입할 경우 개략적인 배지 두께는 Table 2와 같았다. 배지 두께를 0.25 mm(5 ml)에서부터 4.50 mm(30 ml)까지 6단계로 조제하여 UV조사 후 병자각 형성수를 평가한 결과(Table 2), 두께 3.75 mm(25 ml)까지는 두께가 증가함에 따라 병자각 형성수 및 포자농도 모두 증가하였다. 그러나 두께 4.50 mm에서는 병자각 형성수 및 포자농도가 모두 낮아졌고, 이에 반하여 균총생장이 왕성하였으며, 병자각 형성이 배지전면에 균일하게 형성되지 않고 윤상의 띠모양으로 형성되었다.

변온이 병자각 형성에 미치는 영향. Table 1의 결과에서 덩굴마름병균의 병자각 형성 誘起에는 광이 중요한 요인임을 밝혔다. 그러나 광조사가 중요한 요인이라 하더라도 광조사시기와 균배양온도, 광조사시의 온도 등이 검토되어 가장 신속하고도 많은 양의 포자를 얻을 수 있는 최적 조건이 밝혀져야 할 것이다.

**Table 3.** Effect of fluctuation of cultural temperature on the pycnidium production of *Didymella bryoniae*

Cultural temp.(°C) and duration(hr) of mycelial colony prior to induction of pycnidia formation <sup>a</sup> °C (hr)	Cultural temp.(°C) and duration(hr) of mycelial colony for pycnidia formation <sup>b</sup> °C (hr)	No. of pycnidia/cm <sup>2</sup> of mycelial colony <sup>c</sup>	
		FL40WD	UV
26(48)	26(L12)-20(D12)	610	928
	26(L12)-26(D12)	119	1533
	20(L12)-20(D12)	0	996
20(48)	26(L12)-20(D12)	45	159
	26(L12)-26(D12)	272	1080
	20(L12)-20(D12)	0	960
26(24)-20(12)-26(12)	26(L12)-20(D12)	314	1088
	26(L12)-26(D12)	686	941
	20(L12)-20(D12)	0	288

<sup>a</sup> Culture was done under darkness.

<sup>b</sup> Cultural duration of mycelial colony under the irradiation (L) or darkness (D). All treatments showed pycnidia formation from 2 days after irradiation.

<sup>c</sup> Mean values of 3 petri plates.

이러한 관점에서 광조사에 앞서 26°C 또는 20°C에서 각각 48시간 암상태에서 배양한 균체에 광처리를 하였는데, 광조사의 온도와 시간을 26°C 또는 20°C, 12시간으로 하고, 광조사 후 암상태 하의 온도와 시간을 20°C 또는 26°C, 12시간으로 하여 균총 1 cm<sup>2</sup>당 병자각의 형성수를 비교한 결과(Table 3), 광처리전의 암상태 온도 26°C가 20°C에서 보다 병자각의 형성수가 많았고, 두 가지 처리온도 모두 FL보다는 UV조사에서 훨씬 많았으며, 광처리시의 변온보다는 동일 온도를 유지해 줄 경우에 병자각의 형성수가 많은 경향을 보였으며, 특히 26°C를 계속 유지해 줄 경우 월등하게 많았다. 광처리 전 암상태 하 배양시의 변온과 광조사의 변온처리에서는, 변온보다는 항온(26°C)을 유지한 FL, UV조사구에서 병자각의 형성수가 많은 경향이였다. 즉 광처리 전후 배양온도를 26°C로 일정하게 유지시켜 주는 것이 변온시켜 주는 것보다 효과적이었고, 병자각의 형성유기에는 FL보다 UV 조사가 훨씬 효과적이였다.

UV 및 FL 조사횟수가 병자각형성 및 형성된 병포자의 발아율에 미치는 영향. Table 3의 결과로부터 덩굴마름병균의 포자형성 유기처리는 암상태의 26°C에서 2일간 균총을 배양한 후, 26°C에서 자외선을 12시간 조사하고 다시 암상태로 보존하는 것이 효과적임을 제시했다. 그러나 광조사 횟수에 관해서는 보

**Table 4.** Effects of the frequency of irradiation on the pycnidium production and on the germination of pycnidiospore of *Didymella bryoniae*

Irradiation	Pycnidia production <sup>a</sup>		% germination of pycnidiospores <sup>b</sup>	
	Initial date <sup>c</sup>	Number/cm <sup>2</sup>	Distilled water	0.1% glucose
UV for 12 hr/day				
1 time	2	33551	85	89
2 times	2	38648	78	86
3 times	3	50895	77	82
FL for 12 hr/day				
1 time	2	6447	81	85
2 times	2	21222	73	85
3 times	3	20255	70	82
FL for 24 hr		0		
48 hr		0		
72 hr		0		
Indoor light for 12 hr/day				
1 time		0		
2 times		0		
3 times		0		
Continuous FL irradiation to mycelial block on agar plate		0		

<sup>a</sup> Estimated by (number of pycnidia/cm<sup>2</sup>) × (pycnidium formation area)/(whole mycelial colony area).

<sup>b</sup> Estimated at 8 days after pycnidia formation on agar plates.

<sup>ab</sup> Mean values of 3 replicates.

<sup>c</sup> Initial date of pycnidia formation after irradiation(day).

다 구체적인 검토가 있어야 하고, 또 UV 및 FL조사에 의해 형성된 병자각내의 병포자의 활성도 검토되어야 한다.

Table 4에서 보는 바와 같이 26°C 배양 2일 후부터 하루에 12시간 주기로 UV나 FL을 3회까지 조사했을 경우 극히 많은 병자각이 형성되었는데, UV 및 FL 모두 조사횟수가 증가함에 따라 병자각의 형성이 약간 늦어지는 감이 있었지만 병자각 형성수에서는 UV의 경우 크게 증가한 반면 FL의 경우 증가하지 않았다. 실내 자연광하에서는 전혀 병자각이 형성되지 않았다. FL을 배양당시부터 계속적으로 조사했을 때도 전혀 병자각이 형성되지 않았다. 한편 병자각이 형성된 지 8일 후에 병자각으로부터 병포자를 회수하여 발아율을 조사해 본 바, 멸균수 보다는 0.1% glucose 현탁액(10<sup>4</sup>포자/ml)에서 발아율이 약간 높았는데, UV 및

**Table 5.** Effect of period of pycnidium maturation on the germination of their pycnidiospore in *Didymella bryoniae*

Isolates tested	Germination % of pycnidiospores				
	1	2	3	4	5th days
<b>Pycnidiospores induced by UV<sup>a</sup></b>					
DW96-34	0	50	62	70	78
DW96-88	0	54	70	72	84
DW96-96	0	43	68	72	78
DW96-131	0	54	71	76	83
DW96-60	0	58	65	72	75
<b>Pycnidiospores induced by FL<sup>b</sup></b>					
DW96-34	0	58	65	68	74
DW96-88	0	60	63	75	80
DW96-96	0	45	58	65	76
DW96-131	0	52	65	67	77
DW96-60	0	45	68	73	80
<b>Pycnidiospores produced naturally<sup>c</sup></b>					76

<sup>a</sup> Pycnidiospores produced under the germicidal lamp G 40T10 40W.

<sup>b</sup> Pycnidiospores produced under the FL40WD lamp.

<sup>c</sup> Pycnidiospores produced on the diseased leaves of watermelon growing in field.

FL 조사횟수가 증가함에 따라 발아율이 다소 저하하는 경향을 나타냈다.

UV 및 FL조사에 의해 형성된 병자각내 병포자의 경시적 발아율. UV나 FL조사에 의해 많은 병자각이 형성되었지만(Table 3 및 4), 형성된 병자각내 병포자의 성숙여부는 불명하다. 미성숙 포자를 식물에 접종해도 만족할만한 감염이 이루어지지 않는다. 따라서 병자각 형성 이후 성숙에 어느 정도의 기간이 소요되는지를 밝히는 것은 성공적인 실험을 위해 매우 중요한 일이다. 이점을 감안하여 UV 및 FL조사에 의해 형성된 병자각내 병포자가 성숙되는데 소요되는 기간을 포자발아율에 의해 검토하였다. UV 또는 FL을 조사하여 병자각이 형성된 날로부터 경시적으로 병자각내 병포자의 발아율을 조사한 결과, Table 5에서 보는 바와 같이 병자각이 형성된 직후의 병포자는 발아율이 40~50%에 불과하여, 아직 성숙되지 않은 포자가 많다는 것을 나타냈다. 그 발아율은 시일이 경과함에 따라 점차 높아져, 병자각이 형성된지 5일째에 UV 및 FL 조사구 모두 70~80%에 이르렀다. 이 발아율은 대조로

**Table 6.** Pathogenicity of pycnidiospores produced from pycnidia of *Didymella bryoniae* that had been exposed under the UV light, to watermelon cultivar 'Gumcheon'

Host plant <sup>a</sup>	No. of isolates tested <sup>b</sup>	No. of isolates belong to disease rating of <sup>c</sup>						
		0	1	2	3	4	5	6
Watermelon	113	22	20	14	13	11	12	21
Melon	5	1						3
Oriental melon	9	4	2			2		1
Squash	6	3	1			1		1
Cucumber	1					1		
Total	134	3	28	20	16	13	15	26

<sup>a</sup> Cucurbits from which *Didymella* isolates were obtained.

<sup>b</sup> Number of *Didymella* isolates obtained from the cucurbits and used to produce their pycnidiospores under the UV light.

<sup>c</sup> Disease rating was estimated by diseased leaf area (21); 0=no infection; 1=1~10%; 2=11~25%; 3=26~50%; 4=51~75%; 5=76~90%; 6=more than 90%; 7=destroyed.

공시한 자연형성 병포자의 그것과 같은 수준이었다. 이로 미루어 실험에 사용할 포자는 병자각이 형성된 지 적어도 5일 이상 경과된 것으로부터 채취해야 정상적인 활성을 발휘할 수 있을 것으로 판단되었다.

UV조사에 의해 유기된 병포자의 병원성. 박과작물의 이병부위로부터 분리한 덩굴마름병균 134균주에 UV를 조사하여 얻은 병포자의 수박 유묘에 대한 병원성을 조사한 결과(Table 6), 호박에서 분리한 3균주를 제외하고는 모두 병원성을 나타냈다. 병원성을 나타내지 않았던 호박에서 분리한 3균주는 비병원성인 균주인지 또는 검정상의 잘못인지 좀더 구체적인 검토가 있어야 하겠으나, 총 134균주 중 오직 3균주만이 병원성을 나타내지 않았다는 것은 UV조사에 의해 유기된 병포자의 병원성에 변화가 없었다고 볼 수 있다.

## 고 찰

병원균과 관련하여 여러 가지 실험을 수행할 경우, 접종원으로서 그 병원균의 포자를 이용하는 것이 균사체를 이용하는 것보다 실험상 여러 가지 편리한 점이 많다. 즉 일시에 同調인 많은 양의 접종원을 얻을 수 있고, 또 정량적인 취급이 용이하다. 그런데 박과작물의 덩굴마름병균 *Didymella bryoniae*는 보통의 암상태 하에서는 전혀 포자를 형성하지 않기 때문에 (4, 22), 병원성 검정이나 저항성 계통을 선발하는데 양질의 접종원 확보에 어려움이 많다. 지금까지 발표된 문헌들을 보면, 연구자에 따라 실내 자연광(1, 20),

형광등(3, 7, 10, 23, 24), 또는 자외선(11, 13, 19)을 조사하여 포자를 얻어 왔고, 또 이들을 처리하는 방법 역시 다양하다. 대부분 육종가들이 저항성 계통을 선발하는데 필요한 접종원 만을 얻기 위해 사용되어 온 방법들이다. 그러나 이러한 방법들에 의해 생산된 접종원의 질과 양에 대해 비교 검토된 바가 없고, 접종원 생산을 위한 효율성도 검토된 바가 없다. 따라서 접종원으로서 병원균의 포자를 생산하기 위해 가장 능률적이면서 활성이 높고 同調인 접종원을 생산하는 표준적인 방법의 확립이 절실하다.

공시 배지가 병자각 형성에 미치는 영향(Table 1)은 UV를 조사할 경우에는 배지간에 큰 차이가 없지만 FL을 조사할 경우 PDA보다는 GBA가 효과적이었는데 이는 Renkins(17)의 결과와 일치한다. 그러나 GBA의 조제가 PDA에 비해 복잡하므로 포자형성을 목적으로 할 경우 굳이 GBA를 선택할 필요는 없을 것으로 생각된다.

박과작물 덩굴마름병균의 병자각 형성에는 광조사가 필수적인 요인이었기 명백하다(Table 1). 그것은 이와 다른 실험(data 생략)에서 국내 30개 분리균주가 모두 완전 암상태 하에서 병자각이 형성되지 않았다는 사실로도 이를 뒷받침한다. 엄격한 암처리 여부가 분명치 않으나, 암상태 하에서 병자각이 형성되는 듯한 몇 가지 결과들이 있으나(11, 12), 이는 아마도 배양기간 동안 절대 암상태가 유지되었는지 의문이다. 왜냐하면 배양기간 중 항온기의 개폐가 빈번하다는가 배양을 꺼내 작업한다던가 하는 경우 약하지만 자연광의 영향을 받을 수 있기 때문이다. 형광등보다는 UV가 병자각 형성에 효과적이었는데(Table 1), 이는 병자각 형성에 유효 파장이 있음을 시사한 것이다. 살균용 UV파장은 200~300 nm이지만 실제적으로 이보다 넓은 영역의 파장도 함께 방출된다는 것을 감안할 때 병자각 형성의 유효 파장을 200~400 nm의 근자외선 영역까지로 보는 것이 타당할 것으로 생각된다. 그러나 보다 상세한 병자각 형성에 관여하는 action spectrum이 검토되어야 할 것이다. 형광등하에서도 병자각 형성이 이루어지는 것은, 형광등이 주로 자외선을 방사하는 방전관 벽에 여러 가지 형광물질을 발라 백색광을 내게 하는 것이어서 다소의 근자외선이 함께 방출되기 때문인 것으로 추측된다. 이처럼 병자각 형성 유기에 반드시 광이 필요하다는 것은 병자각 형성이 유전 정보만으로 결정되는 것이 아니고, 광에 의해 제어되는 광형태형성(photomorphogenesis)이며, 미지의 어떤 광화학 반응계가 이의 '방아쇠' 역할을 하는 것으로 생각된다. 그러나 UV조사에 의해 병자각을

형성한 균총의 계대배양에서 광조사없이 병자각이 형성되지 않았던 실험 경험을 고려하면, 이는 光化學殘效果(photochemical aftereffect)가 길지 않다는 것을 시사한 것으로 생각해 볼 수 있다.

균에 따라서는 균사체에 기계적인 손상(절단)이나 온도 충격에 의해 포자형성이 유기되는 경우도 있으나, 덩굴마름병균에서는 이와 같은 기계적 손상에 의해 결코 병자각이 형성되지 않으며(Table 1), 온도 충격을 주기 위한 광조사 전 혹은 광조사시의 변온도 이균의 병자각형성 유기에 효과가 없는 듯하다(Table 3). 이는 광반응에 의해 번식기관이 유기되는 5가지 형식(14) 중의 한 형식으로, 병자각 형성유기 기작이 오직 광화학 반응에 의존하고 있음을 시사한 것이다. 이러한 사실은 균핵평균들처럼 병자각 형성에 관여하는 파장 영역을 인위적으로 제어하므로써 방제의 방법(8, 9)을 마련할 수 있음을 시사한 것이다. 한편 배지의 종류 및 두께(Table 1 및 2), 온도, 광 조사시간 및 조사횟수(Table 3 및 4)는 모두 병자각 형성에 부수적인 요인인 것으로 생각된다. 이유는 이들 요인이 병자각 형성유기에는 관계없고 다만 유기량에 관련되어 있기 때문이다.

포자의 발아는 그 포자가 형성된 환경에 의해 영향을 받을 수 있고(6), 또 UV는 생물활성이 높은 energy를 갖고 있기 때문에 세균에서는 돌연변이 유기원으로도 이용되고 있다. 따라서 덩굴마름병균에 이를 조사했을 경우 만약 DNA에 손상을 주어 포자의 발아율이나 병원성에 영향을 준다면 접종원으로써 중요한 문제가 된다. 이를 검토하기 위해 형성된 병포자의 발아율과 병원성을 조사해 보았다. Table 4 및 5에서와 같이 자연상태에서 형성된 병포자의 발아율이 76%(Table 5)이었는데, FL조사구에서는 멸균 증류수에서 70~85%, 0.1% glucose에서 82~89%(Table 4)로서 이는 자연생 포자의 그것과 큰 차이가 없었고, UV조사구(Table 5)에서도 마찬가지였다. 따라서 UV조사에 의해 형성된 병자각 내의 병포자의 발아율에 아무런 영향이 없는 것으로 생각된다.

한편 이들 포자의 병원성을 유묘검정법으로 조사한 결과(Table 6), 수박, 멜론, 참외, 호박 및 오이에서 분리한 134균주 중 3균주를 제외하고 수박 품종 '금천'에 대해 모두 병원성을 나타냈다. 이러한 결과로 보아 하루에 12시간씩 2~3일 UV조사에 의해 유기된 병포자의 병원성에 아무런 영향이 없는 것으로 보인다. 병원성을 나타내지 않은 3개 균주는 모두 호박에서 분리한 것으로써, 호박덩굴마름병 이병엽에 2차적으로 침입한 것인지 비병원성 계통인지는 아직 명확하지 않

다. 다만 대조군으로서 각 균주의 자연형성 포자를 공시하지 않았기 때문에 명확한 결론을 내리기는 어려우나, 별도의 저항성 검정의 반복 실험에서 301균주 중 병원성이 약한 균주들은 항상 약하게, 강한 것은 항상 강하게 나타난 것으로 보아 병원성에 큰 영향은 없는 것으로 추정된다. 한편 UV조사에 의해 접종원을 얻어 저항성 검정을 오랫동안 실시하고 있는 연구 결과에서도 아직 이로 인한 병원성의 변이가 지적된 바는 없다(15).

이상의 여러 가지 결과들을 종합하면, 병자각 형성량을 극대화시키기 위해서는 배양배지로 가장 일반적인 PDA를 이용하는 것이 좋고, 배지 두께를 3.2~3.8 mm(배지량으로 9 cm경 petridish당 20~25 ml)로 하여 암상태 하에서 배양한 2일 후의 균층에 UV를 조사하는 것이 바람직하다(Table 1 및 2). 광처리전 균층배양일수가 길어지면 기중균사가 무성하여 광조사 후 병자각 형성량이 적을 뿐만 아니라 병자각이 기중균사 속에 매몰되어 형성되므로 포자현탁액 조제시 균사편의 혼입이 많아져, 이를 제거하기 위해 cheesecloth로 걸러내야 하는 불편이 있고, 또 포자가 cheesecloth에 흡착되므로 많은 양의 포자 손실을 가져온다. 광처리전 배양온도와 광처리시의 온도는 26°C로 일정하게 유지시켜 주는 것이 병자각 형성량을 증가시킨다(Table 3). 광조사는 UV살균 등을 25~30 cm 높이에서 하루에 12시간씩 2~3회 조사해 주는 것이 가장 좋으며, 광조사 후 2일째에 배지 전면에서 걸쳐 일시에 많은 병자각이 형성된다(Table 4). UV의 지속적인 조사는 균에 많은 손상을 가져올 뿐 아니라 병자각 형성도 전혀 유기되지 않는다(Table 1). 병자각 내 병포자의 완속은 병자각이 형성된지 5일째로서(Table 5), 실험재료로 활용하기 위해서는 병자각이 형성된지 5일 이후에 채취하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

이상의 방법에 의한 덩굴마름병균 포자생산은 총 11~13일을 요한다. 지금까지 연구자에 따라 채용해 온 각양 각색의 방법으로는 7~16일(7, 10, 19, 20)이 소요된다. 그러면서도 포자의 질과 양에 있어서 만족할 만한 수준이 아닌 것이다. 따라서 제시한 방법은 기왕의 방법들보다는 실험 결과의 신빙성을 증가시킬 수 있고, 시간적인 낭비를 최소화할 수 있는 방법이라 생각되므로, 이를 표준적인 덩굴마름병균의 포자형성법으로 제시하는 바이다.

## 요 약

박과작물에 발생하는 덩굴마름병균 *Didymella bryo-*

*niae*는 배지상에서 광조사 없이는 병자각을 형성하지 않으므로, 많은 양의 접종원을 얻기 위해 연구자마다 여러 가지 다른 방법들을 사용해 오고 있다. 그러나 이러한 방법들은 접종원 생산의 효율성, 접종원의 활성 및 동조성 등에 대한 평가가 이루어지지 않아 이 균을 사용하는 각종 실험에서는 물론 특히 저항성 계통 선발을 위해 다량의 접종원이 필요한 경우에는 그 생산방법을 표준화해야 할 필요성이 절실히 요구되고 있다. 이 연구에서는 병원균의 배양배지 및 이의 두께, 배양온도, 조사광 및 조사시간, 형성된 포자의 발아율에 근거한 포자활성, 접종원의 병원성 등을 종합적으로 검토하여 덩굴마름병균 포자 대량 생산방법을 표준화하였다. 이를 요약하면, 초기의 암상태 하에서 26°C에서 2일간 배양하고, 이어 동일한 온도하에서 하루 12시간씩 UV를 2~3일간 조사한 다음, UV조사를 중지하고 암상태에 다시 2일간 두면 배지 전면에서 병자각이 형성된다. 이후 4~5일간 암상태 하에서 포자를 성숙시킨다. 이 방법을 이용하면 단시일 내에 간편하면서도 同調的인 많은 양의 접종원을 얻을 수 있었다. 따라서 이 방법을 *Didymella bryoniae*의 접종원 생산을 위한 표준적인 방법으로 제안하고자 한다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1995년도 전남대학교 학술연구비와 농림부 첨단 농업기술 개발사업의 “수출 및 수입 대응 고품질, 내병성 수박 품종육성”(주관 (주)서울종묘산업)의 협력 연구과제 “수박 주요병해 및 바이러스 내병성 계통 육성(제1연차)”의 연구비 일부로 이루어졌다. 서울종묘산업연구소 기술고문 한상주 박사님, 최성근 연구소장님의 조언과 지원에 감사를 표하며 아울러 전남대학교, 농림부 및 서울종묘 연구소 관계관들에게 감사를 표한다.

## 참고문헌

1. Abad, Z. G. and Wehner, T. C. 1992. Development of a screening test for resistance to gummy stem blight in cucumber. *CGC* 15: 23-27.
2. Calopouzou, L. and Lapis, D. S. 1970. Effects of light on pycnidium formation, sporulation, and tropism by *Septoria nodorum*. *Phytopathology* 60: 791-794.
3. 조명철. 1993. 멜론 덩굴마름병(*Mycosphaerella melonis*) 抵抗性 幼苗檢定 方法에 관한 研究. 서울대학교 석사학위논문, 49 pp.
4. Chiu, W. F. and Walker, J. C. 1949. Morphology

- and variability of the cucurbit black rot fungus. *J. Agr. Res.* 78 : 81-102.
5. Curren, T. 1969. The sporulation of two isolates of *Mycosphaerella citrullina* on agar media. *Can. J. Bot.* 47 : 2108-2109.
  6. Dahlberg, K. R. and van Etten, J. L. 1982. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20 : 281-301.
  7. Giessen, A. C., van der, and den Nijs, A. P. M. 1981. In vitro growth and sporulation of *Didymella bryoniae* and a glasshouse method for screening for resistance of cucumber. *CGC* 4 : 6-7.
  8. Honda, Y. and Yunoki, T. 1981. An action spectrum for photoinduced conidium formation in *Alternaria solani* (Ellis et G. Martin) Sorauer. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 47 : 327-334.
  9. 本田雄一. 1982. 紫外線除去フィルム及び青色光の夜間照射による病害防除. 植物防疫 36 : 457-465.
  10. Keinath, A. P., Farnham, M. W. and Zitter, T. A. 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. *Phytopathology* 85 : 364-369.
  11. 李斗珩. 1977. *Didymella bryoniae*(Auersw.) Rehm(오이 덩굴마름병균)의 柄子殼 및 子囊殼 形成에 미치는 光線 및 培地の 影響. 한식보호지 16 : 211-215.
  12. McGrath, D. J., Vawdrey, L. and Walker, I. O. 1993. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. *HortScience* 28 : 930-931.
  13. Meer, Q. P., van der, van Bennekom, J. L. and van der Giessen, A. C. 1978. Gummy stem blight resistance of cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 27 : 861-864.
  14. Moore-Landecker, E. 1990. Sporulation, In: Fundamentals of the Fungi (3rd eds.) pp. 333-355. Prentice Hall, New Jersey.
  15. Nijs, A. P. M., den, and van der Giessen, A. C. 1981. Pathogenicity of isolates of *Didymella bryoniae* and resistance of the fungus out of symptomless plants. *CGC* 4 : 17-19.
  16. Norton, J. D. 1979. Inheritance of resistance to gummy stem blight in watermelon. *HortScience* 14 : 630-632.
  17. Rankin, H. W. 1954. Effectiveness of seed treatment for controlling anthracnose and gummy stem blight of watermelon. *Phytopathology* 44 : 675-680.
  18. Schenck, N. C. 1968. Epidemiology of gummy stem blight (*Mycosphaerella citrullina*) on watermelon: ascospore incidence and disease development. *Phytopathology* 58 : 1420-1422.
  19. Steekelenburg, N. A. M., van. 1981. Comparison of inoculation methods with *Didymella bryoniae* on *Cucumis sativus*. *Euphytica* 30 : 515-520.
  20. Svedelius, G. and Unestam, T. 1978. Experimental factors favouring infection of attached cucumber leaves by *Didymella bryoniae*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 71 : 89-97.
  21. Wasilwa, L. A., Correll, J. C., Morelock, T. F. and McNew, R. F. 1993. Reexamination of races of the cucurbit anthracnose pathogen *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* 83 : 1190-1198.
  22. Wiant, J. S. 1945. *Mycosphaerella* black rot of cucurbits. *J. Agr. Res.* 71 : 193-213.
  23. 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.
  24. Zhang, Y., Kyle, M., Anagnostou, K. and Zitter, T. A. 1997. Screening melon (*Cucumis melo*) for resistance to gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* in the greenhouse and field. *HortScience* 32 : 117-121.
  25. Zitter, T. A. and Kyle, M. M. 1992. Impact of powdery mildew and gummy stem blight on collapse of pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *CGC* 15 : 93-96.

(Received March 20, 1997)