*Sclerotium rolfsii*에 의한 오이 흰비단병 발생권진혁^{1*} · 이상대¹ · 최옥연² · 신순선³ · 심홍식⁴¹경상남도농업기술원, ²경상대학교 농업생명과학연구원, ³중국 하남농업대학교, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원Occurrence of Sclerotium Rot of Cucumber Caused by *Sclerotium rolfsii*Jin-Hyeuk Kwon^{1*}, Sang-Dae Lee¹, Okryun Choi², Shun-Shan Shen³ and Hong-Sik Shim⁴¹Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea²Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea³College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China⁴National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received on July 16, 2013; Revised on September 13, 2013; Accepted on September 14, 2013)

Sclerotium rot of cucumber (*Cucumis sativus* L.) occurred at the experimental field of Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services in July 2012. The typical symptoms included wilt, rot, and water-soaking on stems and fruits and severely infected plants eventually died. White mycelial mats spread over lesions, and then sclerotia were formed on fruit and near soil line. The sclerotia were globoid in shape, white to brown in color and 1–3 mm in size and the hyphal width was 4–8 μ m. The optimum temperature for mycelial growth and sclerotia formation on PDA was 30°C. The typical clamp connections were observed in the hyphae of the fungus grown on PDA. For further identification, the complete internal transcribed spacer (ITS) rDNA region was amplified and sequenced. On the basis of mycological characteristics, ITS rDNA region comparison, and pathogenicity to host plants, this fungus was identified as *Sclerotium rolfsii* Saccardo. This is the first report of sclerotium rot on cucumber caused by *S. rolfsii* in Korea.

Keywords : Cucumber, *Cucumis sativus* L., *Sclerotium rolfsii*, Sclerotium rot

2012년 5월 경상남도농업기술원 비닐하우스 시험포장에 심어 놓은 오이에서 지체부위 줄기가 부패되는 이상 증상을 관찰하였다. 포장에서 조사한 결과 시들어 죽어 가는 오이 줄기 아랫부분에서 토양 표면에 닿은 부위가 흰색의 곰팡이와 갈색의 작은 둥근 균핵이 관찰되었다. 이러한 병든 식물체를 채집하여 실험실내에서 병원균을 순수 분리하여 병원균의 균학적 특징과 병원성을 검정한 결과 *Sclerotium rolfsii* Saccardo에 의한 오이 흰비단병으로 동정되었다.

지금까지 우리나라에서 오이 흰비단병에 대한 병해 발생 보고는 없다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 따라서 본 연구에서는 오이에 발생한 흰비단병의 병징과 병원균의 균학적 특징 및 병원성 조사한 결과를

보고한다.

병징. 오이의 줄기에 발생하여 병든 부위가 수침상으로 물러지고 썩으면서 갈변하여 포기 전체가 결국 시들어 말라 죽는다. 병든 줄기의 아랫부분이 지체부와 토양 표면에 닿은 부분에서 흰색의 곰팡이가 생기고 균사체에서 시간이 경과함에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다(Fig. 1A). 오이 과실에서 흰비단병이 발생할 경우 과실이 지표면에 닿아 병원균에 감염될 경우 수침상으로 물러지고 부패되면서 흰색의 균사와 균핵 시원체가 형성되어지고 시간이 경과됨에 따라 작은 갈색의 둥근 균핵을 많이 형성하였다(Fig. 1B).

발생환경. 2012년 경상남도농업기술원 비닐하우스 시험포장에 심어 놓은 오이가 생육이 왕성한 중기 이후 덩굴이 서로 엉켜져 통풍과 채광이 부족한 환경에서 재배되었다. 또한 생육 중 과실이 성숙함에 따라 덩굴이 늘어져 과실이 토양표면에 닿은 부분에서 수침상으로 물러지고 부패되어지는 증상이 나타났으며, 시설 내 온도와 습

*Corresponding author

Phone) +82-55-771-6423, Fax) +82-55-771-6419

Email) kwon825@korea.kr

Fig. 1. Symptoms of fruit rot of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and mycological characteristics of the pathogenic fungus, *Sclerotium rolfsii*. **A** and **B**, Typical symptom infected stem and fruit in the field, respectively; **C**, Mycelial mats and sclerotia produced on PDA after 18 days of incubation; **D**, Clamp connection (arrow) under SEM; **E**, Symptoms induced by artificial inoculation.

도가 알맞게 유지 되었을 때 줄기와 과실에 흰비단병이 잘 발생하였다. 과실과 줄기에 발생할 경우 흰색의 균사체와 균핵이 형성되기 때문에 육안으로 쉽게 관찰이 가능하다. 병이 발생한 포기는 결국 말라 죽는다.

균학적 특성. 오이에서 발생한 흰비단병의 병원균을 분리하기 위하여 병든 식물체를 채집하여 건전부와 병반 경계 부위의 조직을 5×5 mm 크기로 자른 다음 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 알콜 램프에 화염 소독한 거름종이를 이용하여 물기를 완전히 제거한 후 크린 벤치 안에서 페트리디쉬 안에 넣고서 24시간 보관하면서 건조시켰다. 감자한천배지 위에 옮겨 25°C 항온기내에서 4일간 배양한 후 자라 나온 균사를 떼어 내어 새 감자한천배지 위에 옮겨 30°C 항온기내에서 18일 동안 배양하고 병원균의 균학적 특성을 조사하였다(Table 1). 감자한천배지 위에서 균충은 흰색이며 균사가 솜털처럼 왕성하게 자라며 흰색의 균핵 시원체가 형성되고 배양시간이 길어짐에 따라 지름 1–3 mm의 작은 둥근 갈색 균핵을 많이 형성하였다(Fig. 1C). 균사생육 및 균핵 형성 적온은 30°C이었다. 주사전자현미경(SEM)으로 5일간 배양한 균충에서 균사 특유의 clamp connection 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 1D). 균사의 폭은 4–8 μm

Table 1. Comparison of mycological characteristics between the isolate studied and *Sclerotium rolfsii*

Characteristics		Present isolate	<i>S. rolfsii</i> ^a
Colony	color	white	white
Hypha	size	4–8 μm	4.5–9 μm
	clamp connection	present	present
Sclerotium	shape	globoid	spherical
	size	1–3 mm	1–2 mm
	color	white to brown	brown

^aDescribed by Mordue (1974).

이었다.

병원성 검정. 오이에 대한 병원성을 확인하기 위하여 2012년 4월 상순에 경상남도농업기술원 유리온실에서 50 구공 트레이에 1알씩 파종하여 40일간 육묘하였다. 이것을 다시 1/5,000a 와그너 포트에 정식하여 10일 동안 육묘한 다음 활착이 된 후 병원성을 검정하였다. 접종원을 준비하기 위해 가는 체(2.0 mm)로 친 토양을 고압 멸균기에 30분간 5일 간격으로 3회 멸균하였다. 감자한천 배지에 7일간 배양한 균충 30개를 수거하여 플라스틱 용기(56×35×13 cm)에 넣고 살균한 흙 3 kg과 잘 섞은 다

음 골고루 잘게 마쇄하였다. 유리 온실에서 10일간 건조시킨 후 실온에 보관하면서 필요시 접종원으로 사용하였다.

접종하기 전에 와그너 포트 내 토양이 건조하지 않게 하기 위해 포트당 물 300 ml씩 주고서 미리 만들어 놓은 전염원을 100 g씩 접종한 후 수분증발 방지위해 1회용 비닐(30×45 cm)을 가지고 와그너 포트 토양표면과 지체 부위 줄기를 느슨하게 감싸 주었다. 처리 후 온실 내 격리재배하면서 발병을 유도하였다. 접종 5일 후 오이의 줄기가 수침상으로 물러지면서 부패되어지고 시들어져 말라 죽으면서 접종부위에 흰색의 균사와 갈색의 작은 둥근 균핵을 형성하였으며 흰비단병 특유의 병징이 나타났다(Fig. 1E).

ITS rDNA 영역 염기서열 분석. 병원균 동정을 확립하기 위해 White 등(1990)이 사용한 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 ITS(internal transcribed spacer) rDNA 부분을 PCR로 증폭하였다. PCR 조건은 최종농도 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs이고 10 pmol의 프라이머와 0.1 unit의 rTaq DNA polymerase(Takara)를 사용하였으며, 50 µl로 반응용량을 맞추었다. PCR 반응조건은 predenaturation (98°C, 2 min), denaturation(98°C, 30초), annealing(60°C, 30초), extension(72°C, 30초), total cycle(30 cycles), final extension(72°C, 4분) 등이었으며, 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴

드는 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)를 사용하여 분리 정제하였고 pGEM-T Easy 클로닝 벡터(Promega)에 클로닝한 후, *Escherichia coli* DH5α에 transformation하였으며 M13F와 M13R 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

병원 곰팡이의 분자적인 동정을 위해 ITS rDNA 영역의 염기서열(684-bp)을 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 BLASTN 프로그램을 이용하여 분석하였으며 옥잠화 흰비단병(GenBank accession no. HM355751)과 100% 그리고 부추와 난에 흰비단병을 일으키는 *S. rolfsii*(GenBank accession nos. JF966208와 GQ358518)와 99%의 상동성을 나타내었다.

계통학적 분석을 위해, 염기서열은 DNASTAR 프로그램(DNASTAR Inc., USA)에서 CLUSTAL W 방법으로 정렬하였다(Thompson 등, 1994). 계통학적 분석은 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법에 따라 수행하였다(Saitou와 Nei, 1987). Sequence distance는 Tamura-Nei parameter model로 계산하였고(Tamura 등, 2007), bootstrap 분석은 1,000회 반복으로 수행하였으며 outgroup으로 *Chloroscypha enterochroma*와 *Sclerotinia sclerotiorum*을 선택하였다. 분석 결과, 오이 흰비단병균은 *Sclerotium rolfsii*와 같은 그룹에 속하는 것으로 분석되었다(Fig. 2).

이상과 같이 오이에 발생한 흰비단병의 병징과 병원균의 균학적 특성, 병원성, ITS 염기서열 분석한 결과, Mordue(1974)가 보고한 *Sclerotium rolfsii*와 일치하였으며, 최근 보고된 들깨 흰비단병(Kwon 등, 2012)의 병징과 균

Fig. 2. Phylogenetic tree using internal transcribed spacer sequences showing closest known relatives of *Sclerotium rolfsii*, including sclerotium rot fungus infecting cucumber (*Cucumis sativus* L.). DNA sequences from the NCBI nucleotide database were aligned using ClustalW, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method and visualized with TreeView. Numbers above the branches indicate the bootstrap values. Bars indicate number of nucleotide substitutions per site. The present isolate infecting *S. rolfsii* is marked in bold.

학적 특징이 일치하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 결과를 가지고 이 병을 *S. rolfsii* Saccardo에 의한 오이 흰비단병으로 명명하고자 한다.

요 약

경상남도농업기술원 시험포장에서 *S. rolfsii*에 의한 오이 흰비단병 증상이 발생하였다. 전형적인 병징으로 시들음, 썩음, 줄기와 과실 수침상을 보였고 감염된 식물체는 결국 시들어 말라 죽었다. 병반부와 토양 표면에 흰색의 곰팡이가 발생하며 갈색의 작고 둥근 균핵이 형성되었다. 감자한천배지에서 균충은 흰색이고 잘 자라며 배양기간이 경과됨에 따라 갈색의 작은 둥근 균핵을 많이 형성하였다. 균핵의 크기는 1–3 mm이며 균사의 폭은 4–8 μ m였다. 균사생육과 균핵 형성 적온은 30°C이었다. 주사전 자현미경 검경결과 균사 특유의 clamp connection이 관찰되었다. 코흐의 가설을 만족하기 위해, 50일간 키운 오이 유묘를 이용하여 병원성 검정을 실시한 결과 흰비단병 특유의 병징을 유도하였다. 오이에서 발생한 병징과 병원균의 균학적 특징, 그리고 ITS rDNA 염기서열 비교분석 결과, 이 병을 *Sclerotium rolfsii* Saccardo에 의한 오이 흰비단병으로 명명하고자 제안한다.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science &

Technology Development (Project No. PJ009192)” Rural Development Administration, Korea.

References

- Kwon, J. H., Choi, S. L., Lee, H. S. and Shim, H. S. 2012. Stem rot of perilla caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. *Korean J. Mycol.* 40: 177–178.
- Mordue, J. E. M. 1974. *Sclerotium rolfsii*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 410. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea, 5th ed. 853 pp. (In Korean)
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24: 1596–1599.
- Thomson, 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. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673–4680.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, pp. 315–322. Academic Press Inc., New York, USA.