

Note Open Access

## Rhizoctonia solani에 의한 큰물개구리밥 (*Azolla japonica*) 마름병

이정환 · 차재율<sup>1</sup> · 노길한<sup>1</sup> · 한기수<sup>1</sup> · 배동원<sup>2</sup> · 권영상<sup>3</sup> · 임채신<sup>4</sup> · 정성우<sup>5</sup> · 권진혁<sup>4</sup> · 박정규<sup>1</sup> · 곽연식<sup>1,6\*</sup>

경상대학교 화학과, <sup>1</sup>경상대학교 응용생물학과, <sup>2</sup>경상대학교 공동실험실습관, <sup>3</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>4</sup>경상남도농업기술원, <sup>5</sup>경상대학교 원예학과, <sup>6</sup>경상대학교 농업생명과학연구원

## Rhizoctonia Blight of *Azolla japonica* Caused by *Rhizoctonia solani*

Jung-Han Lee, Jea-Yul Cha<sup>1</sup>, Gil-Han Noh<sup>1</sup>, Ki-Soo Han<sup>1</sup>, Dong-Won Bae<sup>2</sup>, Young-Sang Kwon<sup>3</sup>  
Chae-Shin Lim<sup>4</sup>, Sung-Woo Jeong<sup>5</sup>, Jin-Hyeuk Kwon<sup>4</sup>, Chung-Gyoo Park<sup>1</sup> and Youn-Sig Kwak<sup>1,6\*</sup>

Department of Chemistry and Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>Central Instrument Facility, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>3</sup>Division of Applied Life Science (BK21 Program), Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>4</sup>Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Service, Jinju 660-360, Korea

<sup>5</sup>Department of Horticulture, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>6</sup>Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received on July 15, 2011; Revised on September 29, 2011; Accepted on October 2, 2011)

**Azolla Lam.** is a small aquatic fern with deeply bilobed leaves, which are consisted of a thick greenish, with chlorophyll, upper (dorsal) lobe and a thinner, translucent lower (ventral) lobe, without chlorophyll, submerged in the water. Azolla blight was observed at a lotus pond. Mycological characteristics of the fungus associated with Azolla blight was immediately determined as *Rhizoctonia* sp. by the thickness and branching of hypha at right angles at the point toward the distal end of septa, with branching hypha is constricted. The fungus produced brown mycelia and dark brown sclerotia on PDA. The optimum temperature for mycelial growth and sclerotia formation were 25°C and 30°C, respectively. The optimum temperature for fungal infection was 30°C, when spray inoculated. Phylogenetic analysis of rDNA-ITS revealed that the fungus was identified as *Rhizoctonia solani* (AG-1 IA) closest to one causing rice sheath blight disease. This is the first report on the blight disease of Azolla caused by *R. solani* in Korea.

**Keywords :** *Azolla japonica*, Green manure plants, *Rhizoctonia solani*

큰물개구리밥(*Azolla japonica*)은 물개구리밥과(*Azollaceae*)에 속하며 물 표면을 떠 다니며 번식하는 작은 수생 양치식물로 질소고정능력을 가지고 있는 cyanobacterium 속의 *Anabaena azollae*와 공생한다. 현재 알려진 *Azolla*종은 *A. pinnata*, *A. nilotica*, *A. filiculoides*, *A. rubra*, *A.*

*microphylla*, *A. mexicana*, *A. caroliniana* 등이 있으며 (Metzgar 등, 2007), 국내에서는 물개구리밥(*A. imbricata*)과 큰물개구리밥(*A. japonica*) 두 종류가 알려져 있다(Lee, 1979). 또한 번식이 빠른 식물로 생체량이 두 배가 되기까지 3-5일, 표면적이 2배가 되는데는 7-10일 정도 소요되며 식물체가 자라 밀집하여 이루어진 매트 두께가 5-20 cm까지 형성될 수 있다고 알려져 있다(Lumpkin과 Plucknett, 1982). 이러한 특성으로 인하여 질소비료로서의 농업적 이용가치가 높게 평가되는데 보고에 의하면 토

\*Corresponding author

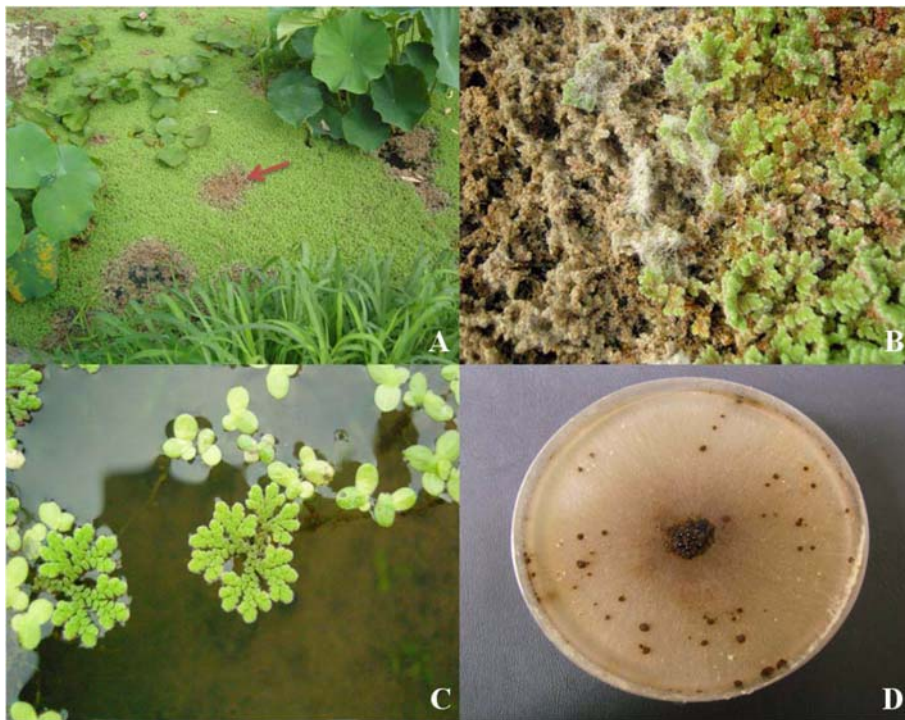
Phone) +82-55-772-1922, Fax) +82-55-772-1929

Email) kwak@gnu.ac.kr

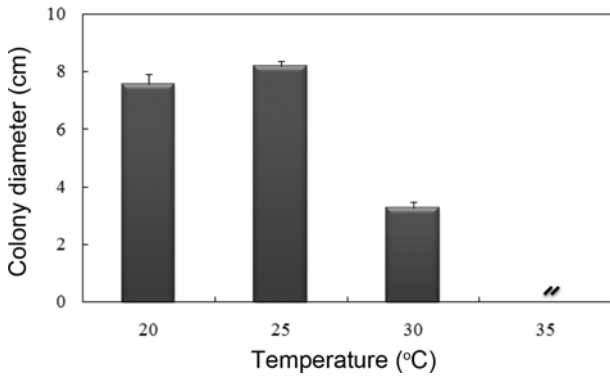
양에 1년 동안 110–330 kgN/hm<sup>2</sup>의 질소를 공급할 수 있으며 중국과 동남아시아 지역에서는 벼를 재배할 때 *Azolla*를 번식시키는 방법으로 질소비료 대용으로 사용한다 (Becking 등, 1979; Liu 등, 1989; Lumpkin 등, 1982; McConnachie 등, 2003; Singh 등, 1977). 외국의 보고에 의하면 *R. solani*, *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp., 그리고 *Rhizopus* sp.가 *Azolla*에 병을 발생시키는 균으로 보고되어 있다(Kannaiyan, 1987). 또한 *R. solani*에 대한 *Azolla*의 저항성은 종에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다. *A. pinnata* NE 13, *A. nilotica*와 *A. filiculoides*의 경우 감수성으로 나타났고, *A. caroliniana*, *A. pinnata* NE 6(Bangkok)의 경우 저항성으로 나타났다. *R. solani*에 의한 병 발생을 줄이기 위하여 50 µg/g의 카벤다짐을 처리하면 병 발생을 감소시킬 수 있다는 연구결과가 보고되었다(Kannaiyan, 1987). 국내에서는 *Azolla*를 농업에 이용하고 있지 않으나 외국의 사례에 따르면 논물에 *Azolla*를 방치할 경우 관행질소량(11 kg/10a)의 25% 매몰 시에는 50% 절감효과가 나타난다는 보고(Lee 등, 2004)가 있어 국내에서도 친환경 생물 비료로 이용할 가치가 크다고 할 수 있다. 본 연구는 경남 함안군 연 재배지에서 발견된 큰물개구리밥이 국지적으로 고사하는 현상을 관찰하여 원인균을 분리하고 균학적 특징과 병원성을 검정하였다.

**병징.** 경남 함안군의 연 재배연못에서 관찰된 큰물개구리밥은 5–10 cm 정도의 매트 형태를 형성하고 있었으며, 국지적으로 고사하는 현상을 관찰하였다(Fig. 1A). 고사된 부분을 확대하였을 때 흰색의 균사가 관찰되었으며, 병원균에 감염되지 않은 큰물개구리밥은 연한 녹색을 띠고 있었으며(Fig. 1B), 병원균에 감염되어 시간이 경과할수록 엽록소가 파괴되어 점차 갈색으로 마르는 현상이 나타났다. 또한 수생식물인 개구리밥은 병원균에 의해 고사한 큰물개구리밥 사이에서 계속 생존하는 것으로 보아 *Rhizoctonia*에 저항성인 것으로 판단되었으며, 연의 성장에도 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

**균학적 특성 및 염기서열 분석.** 병원균을 분리하여 PDA에 7일간 배양한 결과 균총은 전형적인 *Rhizoctonia*의 균총과 같은 형태였으며(Fig. 1D), 균사는 두께가 5–6 µm이고 둔각분지를 하고 있었으며 핵형은 다핵형이었다(자료 미제시). 균사생육은 25°C에서 8.18 cm로 가장 왕성하였고 20°C와 30°C에서는 각각 7.56과 3.28 cm로 나타났다. 35°C에서는 전혀 성장하지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 또한 20°C와 25°C에서는 배지에 밀착하여 성장하였으나 특징적으로 30°C에서 배양 4일째부터 기중균사가 관찰되었다. 균핵 형성은 20°C에서는 petri-dish (87Ø × 15 mm)당 약 50개 정도였으며 지름이 약 2–5 mm



**Fig. 1.** Symptoms of *Rhizoctonia* blight disease occurred on *Azolla japonica* caused by *Rhizoctonia solani*. **A**, typical symptom occurred on dense mats of *A. japonica*; **B**, close-up view of the discolored area shown with arrow in **A**; **C**, single plants of *A. japonica*; **D**, mycelial growth and sclerotial formation on potato dextrose agar medium.

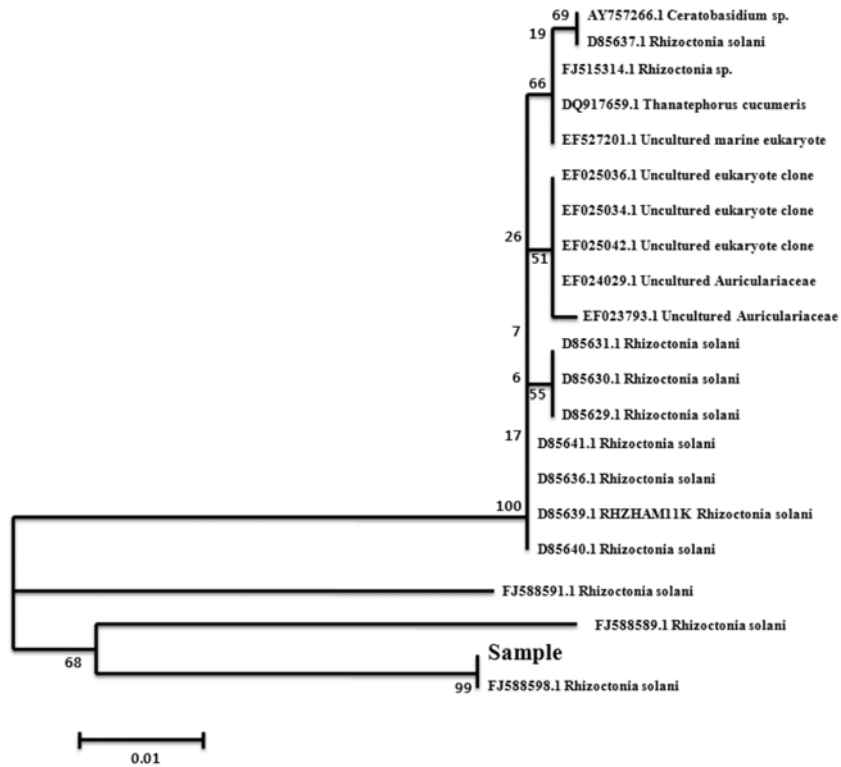


**Fig. 2.** Effect of temperature on mycelial growth of *Rhizoctonia solani* isolated from *Azolla japonica*. Mycelial growth was measured 3 days after inoculation of *R. solani* on potato dextrose agar medium (Error bars represent the standard deviation of the mean, n = 5).

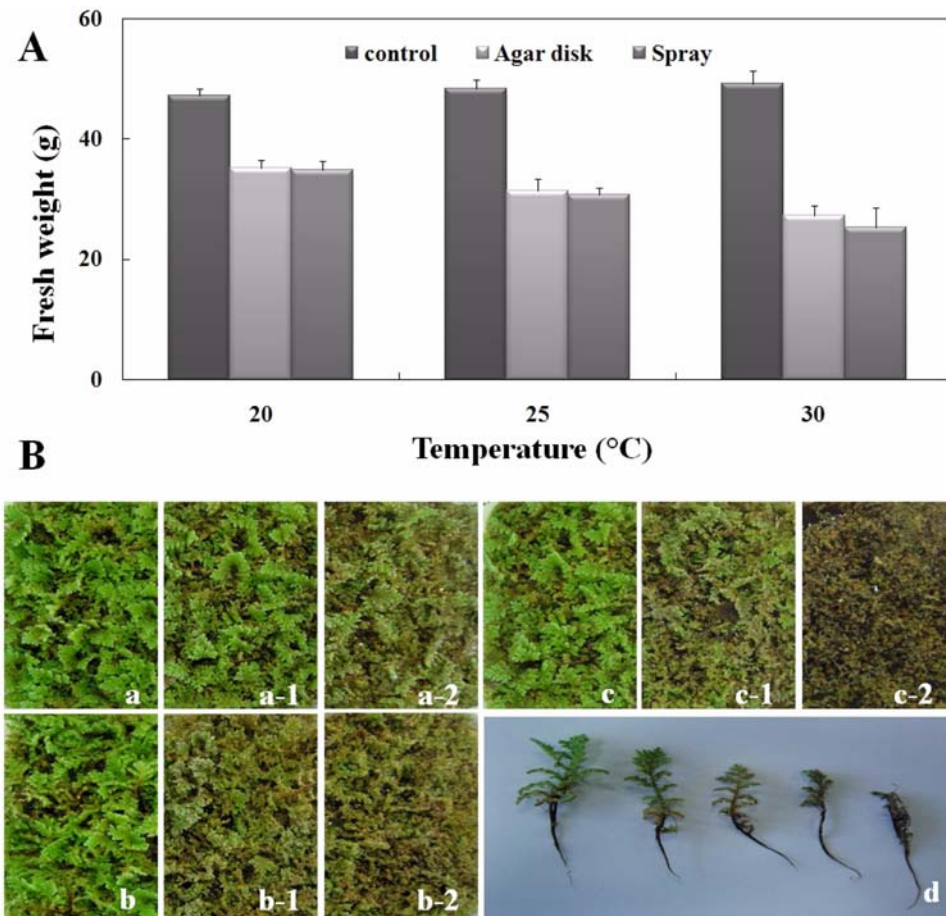
였다. 25°C에서는 20개 정도였으며 지름이 1–3 mm였고, 30°C에서는 약 400개 정도의 가장 많은 수의 균핵이 형성된 반면 지름이 0.5–1.5 mm로 가장 작았다. 35°C에서는 균사생장 및 균핵이 전혀 형성되지 않는 것으로 관찰되었다. 본 실험에서 분리한 큰물개구리밥과 병원균을 유전자 수준에서 동정하기 위해 ITS 영역을 PCR을 이용하

여 증폭한 결과 620 bp의 PCR 산물을 확인하였다. 염기서열 분석은 Genebank blast 및 MEGA의 Neighbor-Joining (Tamura 등, 2007) 방법을 이용하여 균의 계통을 비교 분석하였다. 본 연구에서 분리 동정된 *Rhizoctonia solani*는 AHL1으로 명명하고 Genebank에 ITS 염기서열을 등록하였다(Accession number: JN790939). 계통분류분석을 수행한 결과 NCBI에 등록되어 있는 *R. solani*와 같은 종으로 분류되었다(Fig. 3).

**병원성 검정.** 큰물개구리밥에 대한 *Rhizoctonia solani* AHL1의 병원성과 온도조건에 따른 발병정도를 조사한 결과 기주식물의 agar disk와 스프레이 접종방법으로 나누어 균을 접종하여 1주 후 생체중을 조사하여 발병정도를 평가한 결과 두 처리 모두 무처리구에 비해 처리구의 생체중이 약 17 g 낮게 나타났으며, 균의 접종방법에 따라서는 agar disk와 스프레이 접종방법 차이가 약 1 g으로 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 온도에 따른 병원성을 평가하기 위하여 생체중을 조사한 결과 20°C, 25°C와 30°C의 처리온도별 무처리간 차이가 없었고, agar disk와 스프레이 접종을 한 것에서는 20°C, 25°C와 30°C에서 약 34 g, 31 g, 26 g으로 온도가 높을수록 *R. solani* AHL 1에 의해 고사되어 생체중이 낮아지는 것을 조사되



**Fig. 3.** Phylogenetic tree of the present isolate, *Rhizoctonia* sp. isolated from the *Azolla japonica* based on ITS sequences. The tree was constructed from neighbor-joining analysis of rDNA-ITS sequence. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 60% (out of 1,000 bootstrap replication).



**Fig. 4.** Change of fresh weight (A) and disease incidences (B) of *Azolla japonica* according to two inoculation methods (agar disk & spray inoculation) and different temperature (Error bars represent the standard deviation of the mean,  $n = 5$ ). B (a, b, c), non-treatment at 20°C, 25°C, 30°C; B (a-1, b-1, c-1), agar disk inoculation; B (a-2, b-2, c-2), spray inoculation; B (d), disease incidences progressing of *A. japonica*.

었다(Fig. 4A). 또한 *R. solani* AHL1를 접종하여 1주일 후 20°C, 25°C와 30°C에서 무처리구[Fig. 4B(a, b, c)]에 비해 agar disk를 접종한 처리구[Fig. 4B(a-1, b-1, c-1)]에서 갈색으로 고사하였으며, 스프레이 접종방법으로 처리한 구[Fig. 4B(a-2, b-2, c-2)]는 agar disk를 접종한 것 보다 *Azolla*가 좀더 고사된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 병이 진행이 될수록 잎 부분이 마르기 때문에 *Azolla*의 크기가 작아지는 것을 관찰하였다[Fig. 4B(d)]. *Azolla*는 종에 따라 생존범위가 다르지만 일반적으로 -5~35°C까지 생존할 수 있으며 25°C에서 질소고정과 산소 방출이 가장 활발하게 이루어진다는 보고가 있다(Wong 등, 1987). 본 실험에서는 *R. solani* AHL1의 균사생장은 30°C에서 보다 25°C에서 더 잘 자라는 것으로 나타났지만 *A. filiculoides*는 *Azolla*의 다른 종인 *A. microphylla* 및 *A. mexicana*와는 달리 열에 대한 내성이 낮기 때문에(Cagauan와 Pullin, 1991) *A. japonica*에 대한 병원성은 기주식물이 약해지는

30°C에서 높게 나타난 것으로 판단된다.

## 요 약

연 재배연못에서 발견된 큰물개구리밥에 *R. solani* AHL1에 의해 국지적으로 말라 고사하는 것을 관찰하였다. 병원균을 분리하여 형태적 특징을 조사한 결과 균사는 두께가 5~6  $\mu\text{m}$ 이고 둔각분지를 하고 있었으며 핵형은 다핵형이었다. 배양적 특성으로 균사생육은 25°C에서 가장 왕성하였으며 30°C에서 가장 많은 균핵이 형성되었다. 온도에 따른 병원성과 발병정도를 조사한 결과 20°C, 25°C와 30°C에서 모두 병원성이 나타났으며 발병정도는 30°C에서 가장 높게 나타났다. 병원균을 유전자 수준에서 동정하기 위해 ITS 영역을 Neighbor-Joining 방법을 이용하여 계통분류분석을 수행한 결과 *R. solani*로 동정되었다. 본 연구에서 분리된 *R. solani* AHL1은 벼잎집무늬마름병

을 유발하는 병원균과 유사하여 벼에 대한 병 발생 여부는 추가적으로 연구가 필요하다. 현재 농업은 화학비료의 사용을 억제하는 추세로 녹비를 이용한 유기농업으로, 주요 녹비인 *Azolla* 안정적인 사용을 위하여 *Azolla*에 발생하는 병에 대한 연구가 더 이루어져야 된다고 사료된다.

## References

- Becking, J. H. 1979. Environmental requirements of *Azolla* for use in tropical rice production. In: Nitrogen and Rice, pp. 345–374. International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Philippines.
- Cagauan, A. G. and Pullin, R. S. V. 1991. *Azolla* in aquaculture: Past, present and future. In: Recent Advances in Aquaculture, ed. by J. Muir and R. J. Roberts, pp. 104–130. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Kannaiyan, S. 1987. *Azolla* Utilization: Proceedings of the workshop on *Azolla* Use, Fuzhou, Fujian, China, 31 March-5 April 1985. International Rice Research Institute, Philippines. pp. 107–118.
- Lee, C. H., He, S. B., Lee, Y. C., Oh, D. M. and Kim, S. H. (eds) 2004. Manuals for organic and eco-friendly farming. National Academy of Agricultural Science. Suwon, Korea. (In Korean)
- Lee, T. B. 1979. Illustrated flora of Korea. Hyang Mun Sa, Seoul, Korea. (In Korean)
- Liu, C. C. and Zheng, W. W. 1989. *Azolla* in China. Agriculture Publishing House, Beijing, (In Chinese)
- Lumpkin, T. A. and Plucknett, D. L. 1982. *Azolla* as a green manure: Use and management in crop production. Westview Press, Bolder, CO. 162 pp.
- McConnachie, A. J., de Wit, M. P., Hill, M. P. and Byrne, M. J. 2003. Economic evaluation of the successful biological control of *Azolla filiculoides* in South Africa. *Biol. Control* 28: 25–32.
- Metzgar, J. S. Schneider, H. and Pryer, K. M. 2007. Phylogeny and divergence time estimates for the fern Genus *Azolla* (*Salviniaceae*). *Int. J. Plant Sci.* 168: 1045–1053.
- Singh, P. K. 1977. Multiplication and utilization of fern *Azolla* containing nitrogen-fixing algal symbiont as green manure on rice cultivation. *Riso* 26: 125–137.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Wong Fong Sang, H. W., Vu, V. V., Kijne, J. W., Tam, V. T. and Planque, K. 1987. Use of *Azolla* as a test organism in a growth chamber of simple design. *Plant Soil* 99: 219–230.