

## *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB에 의한 마 뿌리썩음병의 한국 내 발생

홍성기<sup>1\*</sup> · 이재국<sup>1</sup> · 이영기<sup>1</sup> · 이상엽<sup>2</sup> · 김완규<sup>2</sup> · 심홍식<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

### Occurrence of Stem Canker and Tuber Rot on Yam Caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB in Korea

Sung Kee Hong<sup>1\*</sup>, Jae Kook Lee<sup>1</sup>, Young Kee Lee<sup>1</sup>, Sang Yeob Lee<sup>2</sup>, Wan Gyu Kim<sup>2</sup> and Hong Sik Shim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Agricultural Microbiology Division, NAAS, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received 12, November 2012., Revised 27, November 2012., Accepted 3, December 2012)

**ABSTRACT:** Stem canker and tuber rot symptoms were observed on yam grown in Andong and Jinju, Korea in 2011. A total of 20 isolates of *Rhizoctonia* and allied fungi were obtained from the symptomatic plants. Among the isolates, 8 isolates were identified as *Rhizoctonia solani* and 12 isolates as *Ceratobasidium* sp. based on rDNA-internal transcribed spacer (ITS) sequence similarity. In the cluster analysis of rDNA-ITS sequences, 7 isolates of *R. solani* belonged to AG 2-2IIIB and remaining one to AG 1-1A. In addition, among the 12 isolates of *Ceratobasidium* sp., 7 isolates belonged to AG-Fa, three isolates to AG-A and the other two isolates to AG-Fb and AG-O, respectively. Pathogenicity tests showed that all the *R. solani* AG 2-2IIIB isolates are pathogenic on stem and tuber of yam but *R. solani* AG 1-1A and all the *Ceratobasidium* isolates are non-pathogenic. The results indicate that *R. solani* AG 2-2IIIB is an important pathogen causing stem canker and tuber rot on yams grown in the study areas. This is the first report of *R. solani* AG 2-2IIIB causing stem canker and tuber rot of yam in Korea.

**KEYWORDS :** *Rhizoctonia solani*, Stem canker, Tuber rot, Yam

## 서 론

마는 백합목 마과식물(*Dioscoreaceae*)로 현재까지 10속 650여종이 알려져 있으며, 한국, 일본, 중국 등 동북아시아 지역과 열대, 아열대 지역에 널리 분포하고 있는 다년생 덩굴식물이다(Ahn *et al.*, 2005). 국내에서 재배되는 마는 주로 *Dioscorea batatas* Decne.와 *Dioscorea opposita* Thunb.이며, 그들의 괴근은 전분, 단백질, 지질, 미네랄 및 비타민뿐만 아니라, 다양한 생리활성 물질들을 포함하여 건강기능성 식품원료로 각광받고 있다. 마의 재배가 증가되고 전국적으로 확대되면서 마의 연작재배로 인한 토양 전염성 병해로 마의 생산량과 품질이 감소되어 재배농가에 큰 피해를 주고 있어 이에 대한 연구가 시급한 실정이다. 국내에서는 마에서 발생하는 병해로 10종류가 보고되어 있고(Kim *et al.*, 2009), 마 저장 병으로서 *Penicillium* 속에 의한 푸른곰팡이병이 보고되었으나(Kim *et al.*, 2008), 마 재배 중에 발생하여 줄기 지체부와 괴근에 썩음병을 일으키는 *Rhizoctonia*에 의한 병해 연구는 이루어진 바

없다. 따라서 본 연구는 줄기 지체부와 괴근의 병든 조직을 채집하여 *Rhizoctonia*와 유사 속 균을 분리하고, 염기서열분석 및 병원성 검정을 실시하여 마 줄기 지체부 및 괴근썩음병을 일으키는 병원균을 동정하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 병원균 분리 및 배양

2011년 안동과 진주의 마 재배포장에서 지체부와 괴근에 발생하여 썩음병을 일으키는 *Rhizoctonia*와 유사 속 균을 분리하기 위해 병든 식물체를 채집하여 건전부위와 병든 부위의 경계부위를 5 × 5 mm 크기로 자르고, 1% 차아염소산나트륨 용액으로 1분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 여과지를 사용하여 남아있는 물기를 제거한 후 물한천배지(WA)에 치상하여 2~3일간 25°C 항온기에 두었다. 병든 식물체로부터 자라나는 균사선단을 떼어 내어 감자한천배지(PDA)에 옮겨 배양하였다. *Rhizoctonia*와 유사 속 20개 균주가 분리되었고(Table 1), 분리된 균주들은 4°C 냉장고에 보관하면서 균 동정을 위한 염기서열분석 및 병원성 검정을 위한 실험에 사용하였다.

\*Corresponding author <E-mail : sukihong@korea.kr>

**Table 1.** *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp. isolates obtained from diseased yam used in this study

Isolate	Location	Fungi	GenBank accession no.
Y1044	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913809
Y1059	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913810
Y1063	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913811
Y1066	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913812
Y1068	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913813
Y1069	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913814
Y1071	Jinju	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913815
Y1075	Andong	<i>Rhizoctonia solani</i>	JX913816
Y1035	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913817
Y1053	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913818
Y1055	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913819
Y1058	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913820
Y1064	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913821
Y1065	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913822
Y1073	Jinju	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913823
Y1087	Andong	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913824
Y1088	Andong	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913825
Y1089	Andong	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913826
Y10104	Andong	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913827
Y10106	Andong	<i>Ceratobasidium</i> sp.	JX913828

### 분리균주의 DNA 추출, 염기서열 분석 및 균 동정

분리된 균주의 genomic DNA를 추출하기 위해 Potato dextrose broth(PDB)배지에 접종하고, 25°C에서 3일간 배양하였다. 균사체는 miracloth로 수거하고 동결건조하여 마쇄한 후 DNeasy kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 Genomic DNA를 추출하였다. ribosomal DNA의 Internal transcribed spacer(ITS) 영역의 염기서열을 분석하기 위해 ITS1과 ITS4 프라이머(White *et al.*, 1990)가 사용되었고, PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation, 94°C에서 50초 denaturation, 52°C에서 90초 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30회 반복하였고, 최종적으로 72°C에서 7분간 post extension하였다. 증폭된 PCR 산물은 Gel extraction kit(Bioneer)를 사용하여 순화 후 염기서열을 분석하였다. 마에서 분리된 균주들의 ITS 염기서열은 GenBank에 등록하였다(JX913809~JX913828). 분리된 균을 동정하고, 균사융합군을 결정하기 위해 GenBank에 등록된 *Rhizoctonia*와 *Ceratobasidium* 속에 속하는 여러 균사융합군의 염기서열을 포함시켜 상동성을 분석하고, Phylogenetic tree를 작성하였다. 염기서열은 DNASTAR 프로그램의 seqman을 사용하여 편집하고, CLUSTAL W 분석법(Thompson *et al.*, 1994)을 사용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열은 Mega 5.0(Tamura *et al.*, 2011) 프로그램을 사용하여 Neighbor-Joining(NJ)법으로 분석하였고, 분류군간 sequence distance는 Kimura-2 parameter 법으로 계산되었고, Bootstrap 분석이 수행되었다.

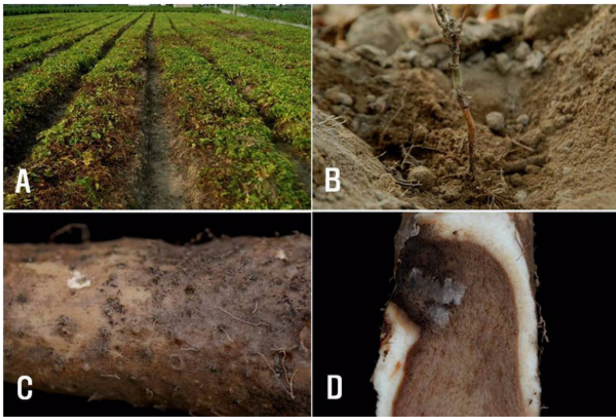
### 병원성 검정

염기서열분석에 의해 동정된 다양한 균사융합군(Anastomosis group, AG)에 속하는 *Rhizoctonia*와 *Ceratobasidium*속 10균주를 병원성 검정에 공시하였다. 각각의 공시균주를 PDA배지에 배양한 후 자라나는 균사 선단에서 직경 6 mm의 균사 disc를 절취하여 마 줄기 지체부에 접종하고, 비닐로 덮어 25±3°C 온실에 10일간 유지한 후 줄기 기부에서 병 발생 여부를 조사하였다. 괴근의 균 접종은 먼저 1% 차아염소산나트륨 용액에 괴근을 10분간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 표면소독 후 상처를 준 공시균주의 균사 disc를 마 괴근에 부착하였다. 접종된 마 괴근은 물에 적신 3매의 페이퍼 타올이 깔린 플라스틱 상자에 놓은 후 25°C 항온기에서 10일간 유지한 후 병 발생을 확인하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 병 발생 및 병징

병은 영여자를 심은 마 포장에서 50% 정도로 심하게 발생하였고 군데군데 식물체가 말라 죽는 증상이 나타났다(Fig. 1A). 지상부에서는 마 잎과 줄기가 고사하면서 조기에 낙엽이 지고, 줄기 지체부는 적갈색이나 갈색으로 썩었다(Fig. 1B). 지하부의 마 괴근은 표면이 넓고 희미한 검은색의 무늬가 나타났고(Fig. 1C), 내부 조직은 갈변하



**Fig. 1.** Symptoms of stem canker and tuber rot on yam. A, Diseased stems and leaves in a field of yam; B, Stem canker with reddish brown discoloration on basal stem of yam; C, Black scurf on the surface of a diseased tuber; D, Brown rot in the internal tissue of a diseased tuber.

면서 썩었다(Fig. 1D).

**염기서열 상동성 분석, 균 동정 및 균사융합군 분류**

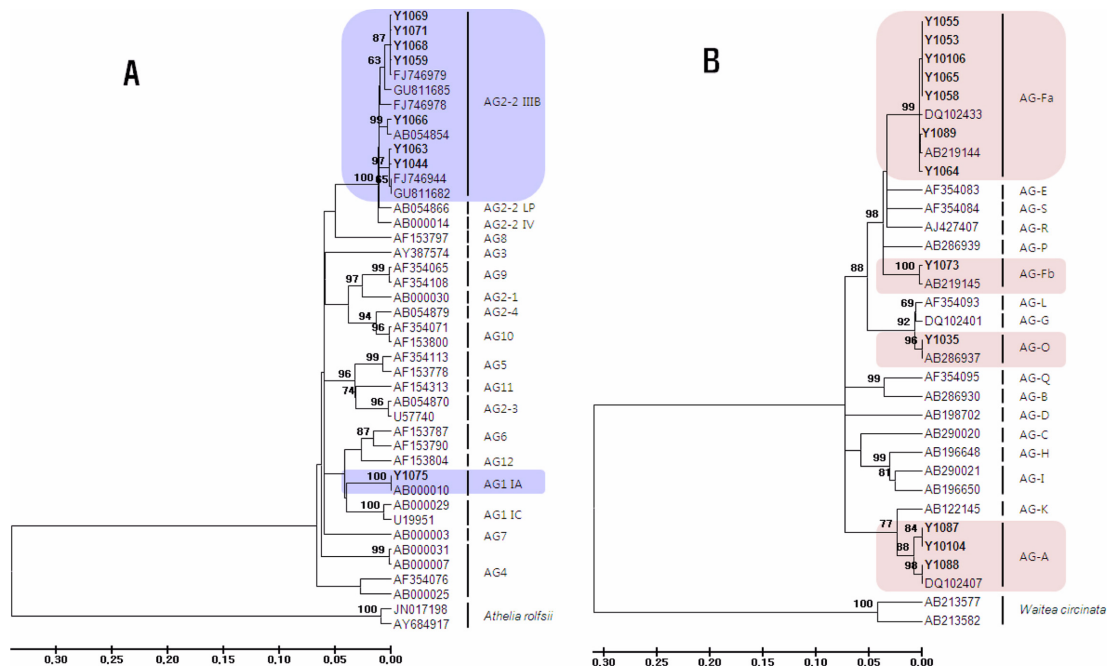
공시된 20개 균주들의 rDNA-ITS 염기서열에 대한 상동성 분석을 실시한 결과, 8균주는 *Rhizoctonia solani*, 나머지 12균주는 *Ceratobasidium* sp.로 동정되었다(data not shown). 두 속에 속하는 균주들의 균사융합군을 확인하기 위해 Genbank로부터 검색된 다양한 균사융합군의

염기서열을 기초로 cluster 분석을 실시한 결과, *R. solani*로 동정된 8균주들 중 7균주는 균사융합군 AG 2-2IIIB에 속하였고, 1균주만이 AG 1-1A에 속하였다(Fig. 2A). 또한, *Ceratobasidium* sp.로 동정된 12균주들 중 균사융합군 7균주는 AG-Fa, 3균주는 AG-A, 2균주는 각각 AG-Fb와 AG-O에 속하였다(Fig. 2B).

**병원성 검정**

*R. solani*와 *Ceratobasidium* sp.에 속하는 균사융합군 균주들의 마에 대한 병원성 검정을 실시하였다(Table 2). *R. solani* AG 2-2IIIB 속하는 Y1044, Y1059 및 Y1066 균주들은 마의 줄기와 괴근에 병원성이 있었으나, *R. solani* AG 1-1A에 속하는 Y1075균주와 *Ceratobasidium* sp.에 속하는 공시된 모든 균주는 마의 줄기와 괴근에서 병원성이 없는 비병원성균으로 확인되었다. 위의 결과로부터 마의 줄기와 괴근에 썩음증상을 일으키는 병원균은 *R. solani* AG 2-2IIIB라는 것이 확인되었다.

*R. solani*는 국내에서 재배되는 벼, 옥수수, 감자 등을 포함한 각종 작물에서 65개의 식물에 병을 일으키는 것으로 보고된 중요한 식물 병원균이다(Kim *et al.*, 1995). *R. solani*는 종 complex로서 적어도 13개의 균사융합군(AG 1-AG 13)으로 구분되고(Carling, 1996), rDNA-ITS 염기서열 분석에 의해 유전적으로 뒷받침되었다(Sharon *et al.*, 2006). *R. solani* 균사융합군 중 AG 2는 균사융합 빈도를 기초로 3개의 subgroup, AG 2-1, AG 2-2 및 AG 2-3으로 구분되고, AG 2-2균주들은 배양형과 ITS 염기서열을



**Fig. 2.** Neighbor-joining trees of *Rhizoctonia solani*(A) and *Ceratobasidium* sp. isolates(B) based on rDNA-internal transcribed spacers (ITS1-5.8S-ITS2) region sequences. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 60% out of 1,000 bootstrap replication.

**Table 2.** Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp. isolates on basal stems and tubers of yam by artificial inoculation with mycelial discs

Isolate	Fungi	Anastomosis group	Pathogenicity <sup>a</sup>	
			Basal stem	Tuber
Y1044	<i>Rhizoctonia solani</i>	AG 2-IIIB	+	+
Y1059	<i>Rhizoctonia solani</i>	AG 2-IIIB	+	+
Y1066	<i>Rhizoctonia solani</i>	AG 2-IIIB	+	+
Y1075	<i>Rhizoctonia solani</i>	AG 1-1A	-	-
Y1035	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-O	-	-
Y1055	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-Fa	-	-
Y1064	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-Fa	-	-
Y1073	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-Fb	-	-
Y1087	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-A	-	-
Y1088	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AG-A	-	-

<sup>a</sup>Pathogenicity to stem and tuber was measured 10 days after artificial inoculation +, rot; -, no disease.

기초로 AG 2-IIIB, AG 2-2IV 및 AG 2-2LP로 구분되어 왔다(Salazar *et al.*, 1999). 마의 줄기 및 괴근썩음병 증상을 일으키는 병원균으로 동정된 AG 2-IIIB 균주들의 25°C PDA상에서 균총특성은 불규칙한 균사체 덩어리와 중심원을 형성하고, 초기에 담황색이지만 후기에는 진갈색으로 변화하였다(data not shown). 이러한 배양적 특성은 기존에 보고된(Blazier and Conway, 2004) AG 2-IIIB균주들의 균총 특성과 잘 일치하는 것이다. 국내에서 AG 2-IIIB 균주들은 구릿대, 참당귀, 수박, 왕골, 갯기를 나물, 도라지, 은빛담쟁이덩굴, 옥수수, 생강에서 보고되었고(Kim *et al.*, 1995), 외국에서는 사탕무, 벤투그라스, 옥수수의 주요 병해로 알려져 있다(Salazar *et al.*, 1999). 중국에서는 AG 1-IB와 AG 2-1에 의한 부채마(*Dioscorea nipponica* Makino) 유묘의 입고병(Bai *et al.*, 2010), 일본에서는 둥근마(*Dioscorea opposita* Thunb.)에서 *R. solani*에 의한 괴근썩음병이 보고되었지만(Ozawa *et al.*, 1994), *R. solani* AG 2-IIIB에 의한 마(*Dioscorea batatas*) 뿌리썩음병은 국내뿐만 아니라 외국에서도 보고된 바 없다.

## 적 요

2011년 안동과 진주의 마 재배포장에서 줄기 지체부 및 괴근썩음 증상이 나타났다. 병징을 나타내는 부위로부터 *Rhizoctonia* 와 유사 속에 속하는 20개 균주가 분리되었다. rDNA-internal transcribed spacer(ITS) 염기서열 상동성을 기초로 8균주는 *Rhizoctonia solani*, 12균주는 *Ceratobasidium* sp.로 동정되었다. rDNA- ITS 염기서열의 cluster 분석에 의해 *R. solani*에 속하는 8개 균주 중 7개 균주는 균사융합군 AG 2-IIIB, 1균주는 AG 1-1A에 속하였다. 또한, *Ceratobasidium* sp.에 속하는 12균주 중 7균주는 AG-Fa, 3균주는 AG-A, 나머지 2균주는 각각 AG-Fb와 AG-O에 속하였다. *R. solani* AG 2-IIIB 균주들은 마의 줄기와

괴근에 병원성이었으나 *R. solani* AG 1-1A와 모든 *Ceratobasidium* sp. 균주는 비병원성이라는 것이 확인되었다. 이 결과는 조사지역에서 *R. solani* AG 2-IIIB가 마의 줄기 및 괴근썩음병을 일으키는 중요한 병원균이라는 것을 나타낸다. 이 연구는 국내에서 *R. solani* AG 2-IIIB에 의한 마 뿌리썩음병에 대하여 처음으로 보고하는 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ0074902012)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ahn, J. H., Son, K. H., Sohn, H. Y. and Kwon, S. T. 2005. *In vitro* culture of adventitious roots from *Dioscorea nipponica* Makino for the production of steroidal saponins. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 32:317-223.
- Bai, Q., Wang, N. and Gao, J. 2010. First report of seedling blight caused by *Rhizoctonia solani* on *Dioscorea nipponica* in China. *Plant Disease.* 94:915.
- Blazier, S. R. and Conway, K. E. 2004. Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates associated with patch diseases on turfgrass. *Proc. Oklah. Acad. Sci.* 84:41-51.
- Carling, D. E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh *et al.* (eds) *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 37-47.
- Kim, W. K., Hwang, Y. S. and Yu, S. H. 2008. Two Species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. *Mycobiology.* 36:217-221.
- Kim, W. G., Cho, W. D. and Ryu, H. Y. 1995. Diagnosis and control of *Rhizoctonia* diseases on crops. National Agricultural

- Science and Technology Institute, Suwon. (in Korean).
- Kim, W. G., Koo, H. M., Kim, K. H., Hyun, I. H., Hong, S. K., Cha, J. S., Lee, Y. K., Kim, K. H., Choi, H. S., Kim, D. G. and Park, B. Y. 2009. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Korean Society of Plant Pathology, Anyang. (in Korean).
- Ozawa, S., Obata, H., Yasuoka, S. and Tanaka, F. 1994. Occurrence of root rot of Chinese yam [*Dioscorea opposita*], caused by *Rhizoctonia solani* Kuehn, in Hokkaido. *Annu Rep. Soc. Plant Protect. N. Jpn.* 45:43-44. (in Japanese).
- Salazar, O., Schneider, J. H. M., Julian, M. C., Keijer, J. and Rubio, V. 1999. Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG 2 isolates based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*. 91:459-467.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M. and Sneh, B. 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*. 47:299-316.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msr121.
- 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. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes from phylogenetics. 315-322. *In: Innis MA., Gelfrand DH, Sninsky JJ and White TJ Eds. PCR Protocols*. Academic Press, SanDiego, California, USA.