

# Magnaporthiopsis poae에 의한 한지형 잔디의 여름잎마름병 보고

한주호<sup>1,2†</sup> · 안창현<sup>1,3†</sup> · 이승열<sup>1</sup> · 백창기<sup>1,4</sup> · 강인규<sup>1</sup> · 정희영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 농업생명과학대학, <sup>2</sup>롯데스카이힐 부여 CC, <sup>3</sup>주테크노그린, <sup>4</sup>국립원예특작과학원

## First Report of Summer Patch Caused by Magnaporthiopsis poae on Cool Season Grass

Ju Ho Han<sup>1,2†</sup>, Chang Hyun Ahn<sup>1,3†</sup>, Seung-Yeol Lee<sup>1</sup>, Chang-Gi Back<sup>1,4</sup>, In-Kyu Kang<sup>1</sup> and Hee-Young Jung<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>Lotte Skyhill Buyeo Country Club, Buyeo 33115, Korea

<sup>3</sup>Technogreen Co. Ltd., Yongin 17163, Korea

<sup>4</sup>National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

**ABSTRACT :** Symptoms of summer patch were observed on Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cv. "Midnight II" from mid-June in 2015 in Seoul, Korea. The symptoms appeared as leaf blight, root rot, and frog-eye patch, which are typical of summer patch. To identify the causal agent of these symptoms, a pathogen was isolated from diseased leaves and roots, and the cultural, morphological, and phylogenetic characteristics were analyzed. The isolate reached 50–60 mm on potato dextrose agar (PDA) after 10 days as a white-grey mycelium with septa, and became olive-green or brown from the center. Phialide-like structures were observed at the ends of hyphae, and conidia were rarely observed. A phylogenetic analysis was conducted based on large subunit (LSU) and RNA polymerase II large subunit (*RPB1*) sequences. According to this analysis, the isolated pathogen was confirmed to be *Magnaporthiopsis poae*. In a pathogenicity test, summer patch symptoms were observed at 20 days after inoculation using the same grass cultivar. This is the first report of summer patch disease caused by *M. poae* on cool season grass in Korea.

**KEYWORDS :** Cool season grass, Kentucky bluegrass, *Magnaporthiopsis poae*, Summer patch

*Magnaporthe poae*에 의한 summer patch병은 잔디에 발생하는 심각한 병해 중 하나로, annual bluegrass (*Poa annua*), Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*), fine fescue (*Fes-*

*tuca pratensis*) 등의 한지형 잔디 (cool season grass)에 주로 발생하는 것으로 보고되어 있다[1-3]. 한지형 잔디에 발생하는 summer patch병은 현재까지 북미지역, 캐나다, 중국에서 발생이 보고되어 있다[4-7]. *M. poae*는 잔디의 뿌리 및 관부를 감염하며, 생육적온은 25~30°C로 알려져 있다[8]. Summer patch병의 발생은 토양 내 높은 온도와 수분상태가 지속될 때 주로 발생하며, 병반은 개구리눈(frog-eye)처럼 가운데 부분은 잔디가 살아있고 가장자리 부분의 잔디는 고사하는 형태를 보이는 것이 전형적인 특징이다[3]. 이후에 중심부의 잔디로 감염이 진행되어 결국은 근부가 황갈색 또는 흑색으로 변화되며 고사한다[2].

국내에서 재배중인 한지형 잔디에는 약 20여 종의 병이 보고되었고[9], 그 중 갈색잎마름병 (brown patch) 및 동전잎마름병 (dollar spot) 등이 중요한 병해로 알려져 있다[10, 11]. 그러나, summer patch병의 발생조사만이 이루어졌을 뿐[12], 그 원인균인 *M. poae*에 대한 균학적 특징 및 계통

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 196-200  
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.196>  
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249  
 © The Korean Society of Mycology

**\*Corresponding author**

E-mail: heeyoung@knu.ac.kr

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Received** August 30, 2016

**Revised** September 7, 2016

**Accepted** September 21, 2016

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

분류학적 특징에 기초한 연구는 아직까지 수행되지 않았다. 또한 위 병원균의 경우, 최근의 분자계통학적 분석을 바탕으로 *Magnaporthiopsis*속으로 분류학적 위치가 변경되었고 [13], 이에 국내에서 summer patch병을 일으키는 *M. poae*의 계통학적 유연관계의 분석도 요구된다.

본 연구에서는 대표적인 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass “Midnight II” 품종에서 summer patch의 전형적인 병징을 관찰하고, 병원균의 균학적 및 계통학적 분석을 실시하였다. 이에 국내 골프장 및 스포츠 구장에서 발생하는 summer patch병의 원인균을 동정하고, summer patch병 방제의 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

### 병 발생과 증상

2015년 6월 초순, 서울시 송파구 소재 잔디밭에 식재된 Kentucky bluegrass “Midnight II” 품종에서 summer patch 증상으로 보이는 잎마름과 뿌리생육 불량 증상이 관찰되었다(Fig. 1A). 발병 초기 증상은 잎이 황갈색으로 변하면서, 점차 고사하여 초승달형과 원형의 patch가 형성되었다(Fig. 1B, 1C). 초기 병반의 크기는 주로 10~25 cm로 동전마름병과 유사한 잎마름 증상을 나타내다, 점차 patch 형태로 확대되었다(Fig. 1B). 시간이 지나면서 병반이 점차 확대되어, 가장자리부터 고사하는 전형적인 잎마름병 증상이 나타났으며, 크기는 직경 40~60 cm로 관찰되었다(Fig. 1C).

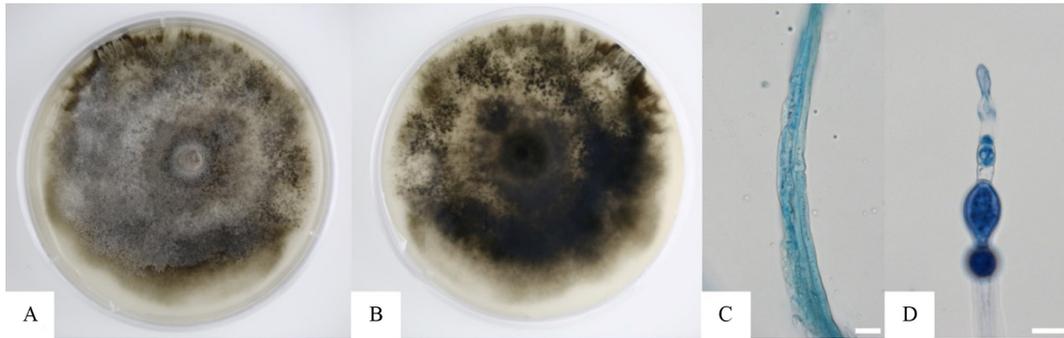
### 병원균의 분리 및 동정

Summer patch 증상을 일으키는 병원균을 분리하기 위해, 전형적인 병반이 관찰되는 시료를 채집하여 실험에 이용하였다. 병원균 분리를 위하여 이병 뿌리의 감염 조직을 잘라 1% 차아염소산나트륨에서 1분간 표면 살균 후, 70% 에탄올에서 다시 30초간 살균하였다. 표면 살균된 이병 조직은

멸균수로 3회 가법계 세척하고, 멸균된 필터 종이에서 수분을 제거한 후 water agar (WA)에 치상하여 25°C 항온기에서 배양하였다. 배양 1~2일 후, 이병 조직으로부터 자란 균사의 선단부분을 멸균된 직경 5 mm의 콜크보러로 채취하여 potato dextrose agar (PDA) 배지로 계대배양하고 30°C 항온기에서 배양하였다. 그 결과, 10일 간 배양된 균주는 약 50~60 mm로 성장하였고, 가장자리의 균사는 중앙을 향해 굴곡져 있는 모습을 관찰할 수 있었으며, 배양 초기에 회백색으로 성장하다가, 가운데부터 점차 혹은 황록색 혹은 갈색으로 변색되었다(Fig. 2A, 2B). 이러한 배양적 특징은 이전에 보고된 *M. poae*의 배양적 특징과도 매우 유사하였다 [2]. 균학적 특징을 관찰하기 위해, 약 10일간 배양된 배지에서 균총을 채취하여 1% methylene blue로 염색 후 광학현미경(Olympus BX-50, Olympus, Tokyo, Japan)상에서 관찰하였다. 그 결과, 균사는 약 2~3  $\mu\text{m}$ 의 폭을 가지고 격막이 관찰되었으며(Fig. 2C), *M. poae* 균의 고유한 형태적 특징인 경자(phialides)의 경우 [2], 그 유사조직이 균사의 말단에서 관찰되었다(Fig. 2D). 하지만 PDA 배지상에서 분생포자는 관찰되지 않았다. 분리된 병원균을 분자생물학적으로 동정하기 위해, 균총의 일부를 채취하여 HiGene Genomic DNA prep kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)를 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. Internal transcribed spacer (ITS)영역의 유전자 염기서열 분석을 위해 ITS1F / ITS4 프라이머로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하고 [14], 증폭된 PCR 산물을 ExoSAP-IT (GE Healthcare, Amersham, UK)을 이용하여 정제한 후 염기서열을 분석하였다(SolGent, Daejeon, Korea). 그 결과, 557 bp 크기의 ITS 영역 염기서열을 확보하였다. NCBI database에서 Blast를 수행한 결과, 미국에서 분리된 *M. poae* 균주와 557 bp 중 5 bp의 차이가 확인되어, 유사도는 약 99%로



**Fig. 1.** Summer patch symptoms on Kentucky bluegrass at the lawn field in Songpa-gu, Seoul. A, Brownish discolored and leaf blight; B, C, Patches with a ring or frog-eye symptom.



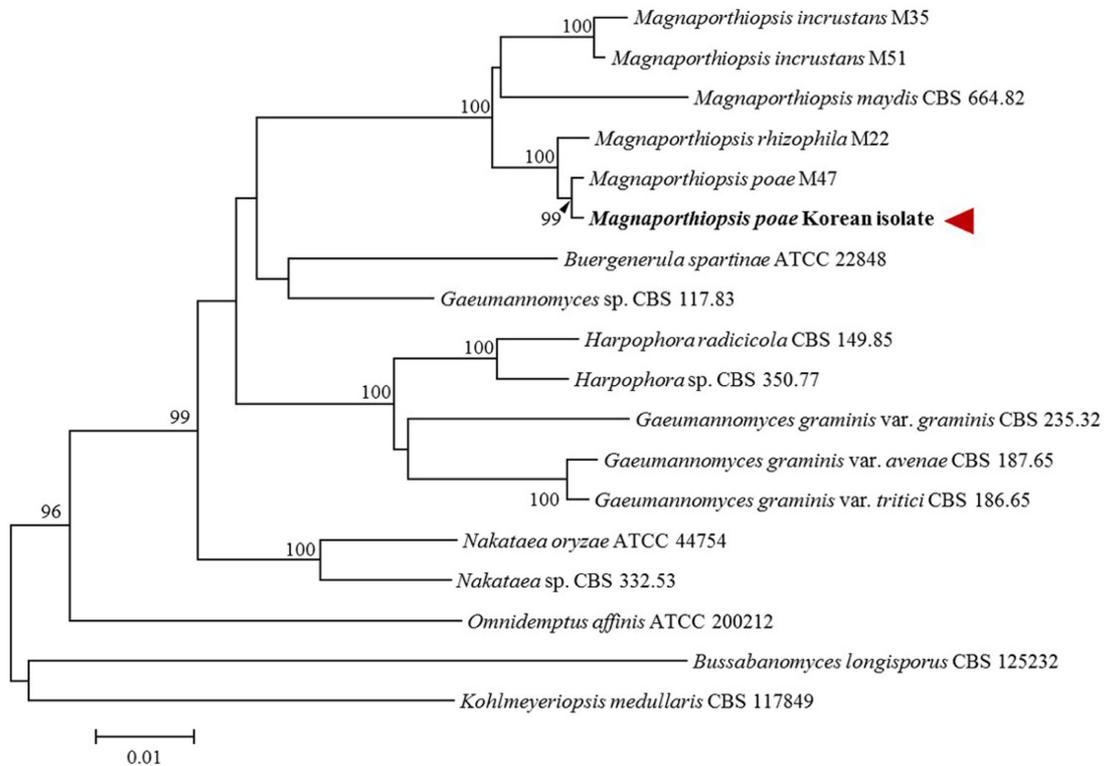
**Fig. 2.** Cultural and mycological characteristics of isolated pathogen from diseased Kentucky bluegrass. A, Inoculated pathogen on potato dextrose agar (PDA) after 10 days; B, Reverse side of A; C, D, Feature of mycelium and phialides-like structure stained with 1% of methylene blue 10 days cultured on PDA (scale bar = 10 µm).

*M. poae*와 높은 상동성을 나타내었다(Data not shown). 추가적으로 Magnaporthales 내에서 최근 새롭게 제안된 *Magnaporthiopsis*속의 계통학적 위치를 파악하기 위해 [13], large subunit (LSU) rRNA 유전자 및 RNA polymerase II largest subunit 1 (RPB1) 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다[15]. 획득된 염기서열은 NCBI Genbank에 각각 LC185498 및 LC185497로 등록하였으며, 두 유전자의 결합 염기서열을 이용하여 neighbor-joining 법으로 계통수를 작성하

였다. 그 결과, 국내 잔디에서 분리된 *M. poae*는 *Magnaporthiopsis*속과 같은 그룹에 속하였으며, 미국에서 분리된 *Magnaporthiopsis poae* M47 균주와 가장 근연관계가 깊은 것으로 확인되었다(Fig. 3). 따라서 Kentucky bluegrass에서 분리된 병원균을 *Magnaporthiopsis poae*로 동정하였다.

**병원성 검정**

국내에서 분리된 *M. poae*의 병원성을 검정하기 위하여,



**Fig. 3.** Phylogenetic analysis conducted based on the combined sequences of large subunit (LSU) rRNA and RNA polymerase II largest subunit 1 (RPB1) gene using allied species of genus *Magnaporthiopsis*. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 100 replicates (values < 80 are not shown). The bar represents a phylogenetic distance of 0.01%. Arrow head indicates the pathogen isolated from this study.

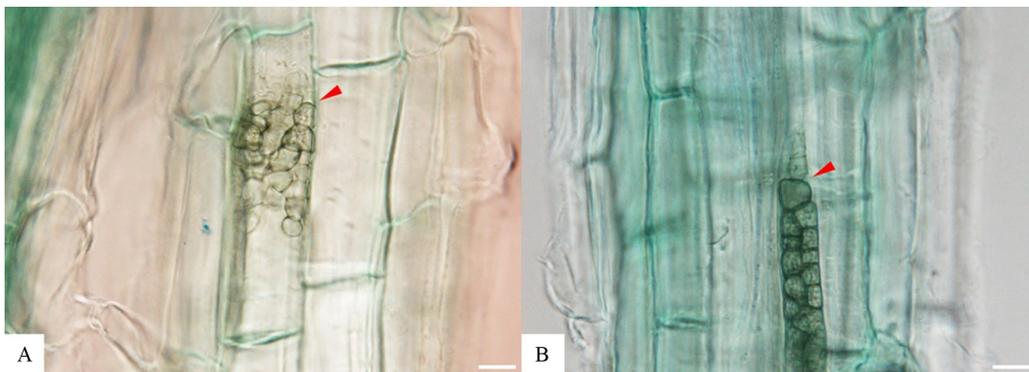


**Fig. 4.** Pathogenicity test on Kentucky bluegrass cultivar 'Midnight II'. A, Untreated control; B, Disease symptom showed on 14 days after inoculation; C, The typical symptom showed after 30 days inoculation. Arrow indicates boundary of symptoms.

1년 이상 관행적으로 관리된 “Midnight II” 품종의 잔디를 홀 컷터로 잘라내고, 멸균된 모래가 깔려있는 플라스틱 상자(40 cm × 80 cm × 10 cm)로 옮긴 후 온실에서 20일 간 배양하였다. 식물에 접종하기 위해 *M. poae*가 접종된 PDA 배지에서 20일 동안 배양된 균체를 멸균된 메스로 약 1 cm × 1 cm 로 자른 후 접종원으로 이용하였다. 이후, 플라스틱 상자에 재식된 잔디에 홀 컷터로 직경 15 cm 가량의 구멍을 파내어, 1 cm × 1 cm 로 자른 후 준비된 접종원을 약 15~20개 넣어주었다. 그 후 접종원이 들어간 부분을 잔디로 다시 덮고 비닐로 밀봉하여 6일간 25 ± 1°C 암조건의 생장상에서 배양한 후 온실로 옮겨 발병유무를 조사하였다. 병원성 검정은 위에서 제시한 접종방법에 따라, 동일한 상태의 잔디를 이용하여 3반복으로 수행되었으며, 무처리 잔디 실험구에는 병원균이 접종되지 않은 PDA 배지를 사용하여 동일하게 수행하였다. 병원성 검정결과, 접종 14일 후 접종한 부분의 주변잔디는 하단부부터 갈변되기 시작하였으며(Fig. 4B), 약 30일 후에는 잎과 줄기는 고사되는 전형적인 summer patch 증상이 관찰되었다(Fig. 4C). 또한 병원성 검정에 사용된 모든 접종 실험구에서 전형적인 병반이 관찰되었으나(Data not shown), 무처리 잔디 실험구

서는 병징을 관찰할 수 없었다(Fig. 4A). Summer patch 증상이 관찰되는 병징에서는 *M. poae*균이 감염 후 기주 뿌리 표면에 특이적으로 형성되는 비대균사조직(swollen hyphal cell)을 관찰할 수 있으므로[2], 현재 시료에서 이러한 특이적인 조직의 유무를 균근균 관찰법을 통해 확인하였다[16]. 그 결과, 전형적인 summer patch의 병징을 보이는 잔디의 뿌리에서는 *M. poae*에 의해 감염된 기주에서 특이적으로 관찰되는 비대균사 유사조직이 관찰되었다(Fig. 5). 또한 인공접종된 병반부에서 다시 병원균을 재분리하여 PDA배지에서 배양한 후 병원균의 특성과 분자생물학적 분석을 통해 접종한 균(*M. poae*)과 동일함을 확인하였다(Data not shown). 이와 같이 *M. poae*로 확인된 균은 농업유전자원정보센터(Korea Agricultural Culture Collection, KACC)에 기탁하였다(KACC 48138).

본 연구에서는 국내 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass 품종에서 잎마름증상과 뿌리썩음 증상을 동반하는 summer patch병의 원인균을 분석하고자 이병 식물체로부터 곰팡이 균주를 분리하였다. 분리된 균주의 균학적 특성 및 분자계통학적 유연관계를 분석하고, 한지형 잔디를 이용하여 병원성 검정을 실시한 결과, *Magnaporthiopsis poae*가 원인



**Fig. 5.** Observed clusters of swollen hyphal cell-like structure on inoculated Kentucky bluegrass roots. A, B, Observed swollen hyphal cell-like structure (scale bar = 10 μm). Arrow head indicates swollen hyphal cell-like structure.

균임을 확인하였다. 이에 summer patch병의 국내 병명을 여름잎마름병으로 제안하고자 한다.

## 적 요

2015년 6월 초순, 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass “Midnight II” 품종이 식재된 서울시 소재 잔디밭에서 잎마름 증상, 뿌리썩음 증상 및 개구리 눈 모양의 전형적인 summer patch 병징이 관찰되었다. 병원균의 정확한 동정을 위해 이병 잎과 뿌리에서 병원균을 분리하고, 배양학적 및 균학적 특징과 분자마커를 이용한 계통학적 유연관계 분석을 실시하였다. 그 결과, 분리된 병원균은 배양 10일 후 약 50~60 mm 가량 성장하였고, 균사는 회백색을 띄며 중앙부터 황록색 혹은 갈색으로 변색되었다. 경자(phialides)의 경우, 그 유사조직이 주로 균사의 말단에서 관찰되었으나, 분생포자는 관찰되지 않았다. 분리된 병원균의 정확한 동정과 계통학적 유연관계 분석을 위하여, large subunit (LSU)와 RNA polymerase II large subunit (RPB1) 유전자를 증폭시킨 후 염기서열 분석을 진행하고 계통학적 유연관계를 분석하였다. 그 결과, 분리된 병원균은 *Magnaporthiopsis poae* M47 균주와 가장 근연한 관계에 있는 것으로 확인되었다. 또한 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 배양된 병원균을 멸균된 메스로 잘라 동일한 품종의 잔디에 접종한 결과, 약 20일 후 잎마름 증상을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 국내 Kentucky bluegrass에 summer patch병을 일으키는 원인균을 *Magnaporthiopsis poae*로 보고하고, 위 병원균에 의한 한지형 잔디의 병징을 여름잎마름병으로 제안하고자 한다.

## Acknowledgements

This research was supported by Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ010481032016) Rural Development Administration, Republic of Korea.

## REFERENCES

1. Kemp ML, Clarke BB, Funk CR. The susceptibility of fine fescues to isolates of *Magnaporthe poae* and *Gaeumannomyces*
2. Landschoot PJ, Jackson N. *Magnaporthe poae* sp. nov., a hyphopodiate fungus with a *Phialophora* anamorph from grass roots in the United States. *Mycol Res* 1989;93:59-62.
3. Smiley RW, Dernoeden PH, Clarke BB. Compendium of turfgrass diseases. 2nd ed. St. Paul: American Phytopathological Society; 1992.
4. Tredway LP. First report of summer patch of creeping bentgrass caused by *Magnaporthe poae* in North Carolina. *Plant Dis* 2005;89:204.
5. Bassoriello MM, Jordan KS. First report of *Magnaporthe poae*, cause of summer patch disease on annual bluegrass in Canada. *Plant Dis* 2012;96:1698.
6. Liu Q, Liu M, Li T, Chen J, Zhang F, Hu J. First report of summer patch of Kentucky bluegrass caused by *Magnaporthe poae* in China. *Plant Dis* 2016. (in press)
7. Swift CE, Blessinger A, Brandt N, Tisserat N. First report of summer patch of Kentucky bluegrass caused by *Magnaporthe poae* in Colorado. *Plant Dis* 2007;91:1519.
8. Kackley KE, Grybauskas AP, Dernoeden PH, Hill RL. Role of drought stress in the development of summer patch in field-inoculated Kentucky bluegrass. *Phytopathology* 1990;80:655-8.
9. Korean Society of Plant Pathology. List of plant diseases in Korea. 5th ed. Seoul: Korean Society of Plant Pathology; 2009.
10. Shim GY, Min GY, Shin HD, Lee HJ. Occurrence of fungicide resistance isolate caused by *Sclerotinia homoeocarpa*. *Korean Turf Sci* 2001;15:1-8.
11. Chang T, Lee YS. Occurrence of brown patch disease and turfgrass survival of cool season turfgrass cultivar in species during summer season. *Korean Turf Sci* 2010;24:117-24.
12. Min GY, Lee JH, Kwak YS. A detail investigation of major diseases occurrence and pathogen population on turfgrass cultivation in nationwide. *Weed Turf Sci* 2014;3:121-9.
13. Luo J, Zhang N. *Magnaporthiopsis*, a new genus in Magnaporthaceae (Ascomycota). *Mycologia* 2013;105:1019-29.
14. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
15. Klaubauf S, Tharreau D, Fournier E, Groenewald JZ, Crous PW, de Vries RP, Lebrun MH. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Stud Mycol* 2014;79:85-120.
16. Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 1970;55:158-61.