

Weed & Turfgrass Science was renamed from both formerly Korean Journal of Weed Science from Volume 32 (3), 2012, and formerly Korean Journal of Turfgrass Science from Volume 25 (1), 2011 and Asian Journal of Turfgrass Science from Volume 26 (2), 2012 which were launched by The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea founded in 1981 and 1987, respectively.

*Curvularia trifolii*에 의한 크리핑벤트그래스 잎마름병 발생

성창현¹ · 구준학¹ · 김정호² · 윤정호¹ · 이정한² · 심규열² · 곽연식³ · 장석원^{4*}

¹㈜한울 기업부설 잔디과학연구소, ²한국잔디연구소, ³경상대학교 농업생명과학연구원, ⁴한국골프대학 골프코스매니지먼트과

First Report of *Curvularia* Leaf Blight Caused by *Curvularia trifolii* on Creeping Bentgrass in Korea

Chang-Hyun Sung¹, Jun-Hak Koo¹, Jung-Ho Kim², Jung-Ho Yoon¹, Jung-Han Lee²,
Kyu-Yul Shim², Youn-Sig Kwak³, and Seog-Won Chang^{4*}

¹Turfgrass Science Institute, Hanul Inc., Habcheon, 50229 Korea

²Korea Turfgrass Research Institute, Seongnam, 13522 Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52727 Korea

⁴Department of Golf Course Management, Korea Golf University, Hoengseong, 25247 Korea

ABSTRACT. *Curvularia* leaf blight of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) putting green by caused *Curvularia trifolii* was observed in Hapcheon, Korea. In July to September 2014, *curvularia* leaf blight developed on leaf blades of creeping bentgrass as small water-soaked lesions that subsequently turned into dark-colored, necrotic spots. The spots were expanded and became gray, grayish-brown, or light brown, circular to oblong lesions with purple to dark brown borders that often were surrounded by a yellow halo. The necrotic lesions coalesced, became irregular in shape and caused tip or complete blighting of the leaves. Blighted leaf blades appeared grayish-white to tan. The fungus was identified by morphological characters and 16S rDNA sequencing as *C. trifolii*. Conidia of the pathogen were short, with predominantly 3-septa, straight or often curved, with end cells frequently paler than intermediate cells. Size of the 3-septate conidia in culture are 26~28×11~12 μm. Pathogenicity of the fungus was proved by artificial inoculation on the host. This is the first report of *C. trifolii* causing leaf blight on creeping bentgrass in Korea.

Key words: Creeping bentgrass, *Curvularia trifolii*, *Curvularia* leaf blight, Pathogenicity

Received on May 9, 2016; Revised on June 2, 2016; Accepted on June 8, 2016

*Corresponding author: (Phone) +82-70-7877-2032, (Fax) +82-70-7877-2001; E-mail) changsw802@hanmail.net

© 2016 The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea

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 noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

크리핑벤트그래스(*Agrostis stolonifera* L.)는 원산지가 유라시아 대륙으로 낮은 예고에서도 높은 밀도로 잘 자란다. 그러한 장점 때문에 크리핑벤트그래스는 우리나라를 포함한 세계 각국에서 골프장 그린과 페어웨이 등 높은 잔디 품질을 요구하는 용도로 사용되고 있다(Casler and Duncan, 2003).

우리나라에서 크리핑벤트그래스에서는 탄저병(*Colletotrichum graminicola*), 브라운패치(*Rhizoctonia solani*), 피시움마름병(*Pythium* spp.), 황색마름병(*Rhizoctonia cerealis*), 동전마름병(*Sclerotinia homoeocarpa*), 설부병(*Typhula incarnata*) 등이 보고되고 있다(KSPP, 2009).

2014년 7월부터 9월까지 경남 합천, 경기 여주 등 국내 여러 지역에서 크리핑벤트그래스의 잎이 마르고 시들어 죽는 증상이 관찰되었다. 증상이 심한 식물체는 지체부와 뿌리가 적갈색으로 변하면서 고사되었다. 채집한 식물체의 병반에서는 지속적으로 *Curvularia* spp.가 분리되었다. 외국에서는 *Curvularia* spp.가 24~35°C에서 크리핑벤트그래스와 켄터키블루그래스 등에 잎끝마름병과 잎반점병을 일으키는 것으로 보고된 바 있으나(Brown et al., 1972), 우리나라에서는 *Curvularia* spp.에 의한 크리핑벤트그래스 잎마름병이 보고되지 않고 있다. 따라서 저자들은 본 논문에서

골프장 그린에서 관찰한 크리핑벤트그래스 잎 마름 증상의 원인을 규명하기 위해서 분리 병원균을 동정하고 병원성 검정 결과를 보고하고자 한다.

발병 및 병징

2014년 여름 크리핑벤트그래스 잎 마름 증상을 발견한 곳은 경남 합천군 소재 퍼팅 그린 조건의 재배 지역이었다. 잎 마름 증상은 온도와 습도가 높은 7월경부터 9월 중순까지 관찰되었으며, 초기에는 잎몸이 수침상태로 보이다가 주로 하위엽부터 노랗게 말라 죽는 현상으로 나타났다. 증상은 온도와 습도가 높을 경우 잎몸으로부터 잎집까지 내려가면서 진전되었으며(Fig. 1. A, B, C), 인접한 다른 식물체로 확대되었다. 온도가 높고 수분이 충분할 경우 잎의 위치와 관계없이 수침상이 나타나면서 병반이 발생했으며, 날씨가 건조해지면 잎이 마르고 비틀어졌다. 조사지역에서는 L-93, Penn-1, Penncross 등의 크리핑벤트그래스 품종이 재배되었으며, 모든 품종에서 증상이 관찰되었고, 품종별 병징의 차이는 찾아볼 수 없었다(데이터 미제시).

병원균의 분리 동정 및 균학적 특성

병원균을 분리하기 위하여 잔디 재배지역(각각 약 5 km 떨어진 2개 지역, 2균주)에서 병이 발생한 식물체를 채집하였다. 실험실에서 건전 부위와 감염 부위의 경계조직을 잘라 1% 차아염소산 용액에서 1분 동안 표면살균하고 멸균수로 2~3회 세척하였다. 세척한 조직은 멸균된 여과지에서 물기를 제거한 다음 물한천배지(Agar 20 g + 증류수 1 L)에 치상하였다. 25°C 항온기에서 3일간 암배양한 후, 배지에 치상된 감염

조직에서 자라난 균사체의 선단부를 떼어내 감자한천배지(Potato dextrose agar 39 g + 증류수 1 L)에 옮겨 배양하였다.

병원균의 배양적 특징은 분리한 균주를 감자한천배지에 치상하여 25°C 항온기에서 7일간 배양한 후 관찰하였다. 감자한천배지에서 *C. trifolii* 균주의 균총(colony) 가운데는 진한 회색, 가장자리는 회색을 띠었다(Fig. 1. D).

병원균의 분생포자는 균사체 가운데에서 주로 형성되었다. 분생포자는 보통 3개의 격막을 가지고 곧거나 약간 휘 모양이었다. 분생포자의 마지막 세포(End cells)는 가운데에 있는 세포(Intermediate cells)보다 투명하였다(Fig. 1. E). 배지에서 형성된 분생포자(3-septate conidia)의 크기는 26~28×11~12 μm의 범위였다. 이러한 특징은 2개 지역에서 분리한 2개 균주 사이에 큰 차이가 없었으며, Ellis (1971)의 보고와 일치하였다.

형태학적 특징을 기초로 실시한 병원균의 동정을 뒷받침하고자 ribosomal DNA (rDNA)의 ITS 영역의 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석은 *C. trifolii* 균주를 감자액체배지(Potato dextrose broth 24 g + 증류수 1 L)에서 1주일 동안 배양한 후 형성된 균사체를 사용하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였고, ITS1/ITS4 (White et al., 1990) primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 통해 band를 확인한 후, PCR purification kit (Core-one™, Core-bio, Korea)를 이용하여 정제하였다. 염기서열은 autosequencer (ABI 3030)로 분석하였으며, 최종 획득한 ITS의 염기서열은 GenBank database (National Centre for Biotechnology Information [NCBI] US

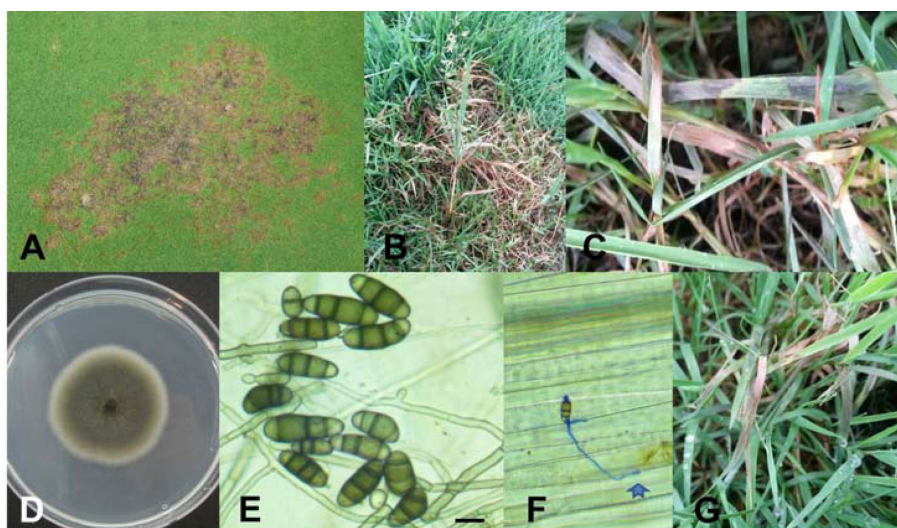


Fig. 1. Curvularia leaf blight of creeping bentgrass caused by *Curvularia trifolii* and their morphological characteristics. A-C: Curvularia leaf blight symptoms on creeping bentgrass; D and E: Mycelia and conidia on potato dextrose agar medium. Scale bar indicates 10 μm; F: Appressorium formation from germ tube of conidium. Arrow indicates an appressorium stained with 0.1% cotton blue solution; G: Curvularia leaf blight by artificial inoculation.

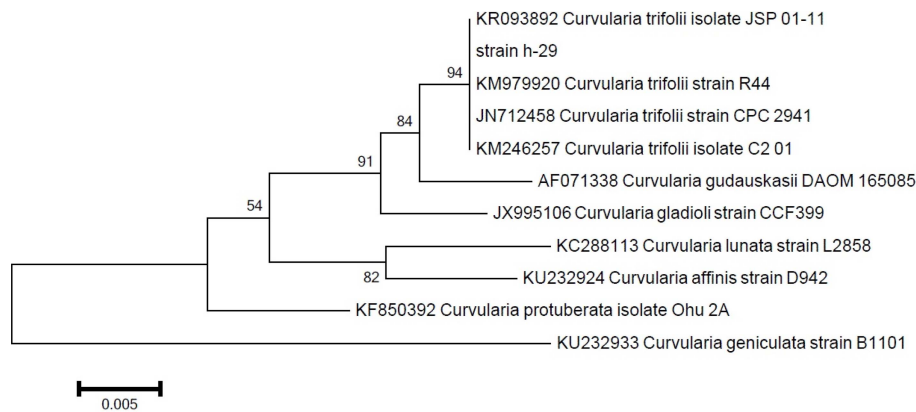


Fig. 2. Phylogenetic analysis by the neighbor-joining method comparing the sequence of the internal transcribed spacer ribosomal DNA (rDNA) region from *Curvularia trifolii* with that of other *Curvularia* spp. obtained from GenBank. The numbers above the branches represent the bootstrap value. Strain h-29 is *C. trifolii* isolate identified in this study.

National Institute of Health Bethesda, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)의 데이터베이스를 이용하여 확인하였다. 계통수 분석은 GenBank 데이터베이스에 올라와 있는 ITS의 염기서열을 활용하였다. 계통수는 MEGA 6.0 프로그램에서 neighbor-joining 방법으로 작성하였다.

그 결과 크리핑벤트그래스에서 잎마름병을 일으키는 균주의 ITS sequence 크기는 575 bp였으며, NCBI에서 *C. trifolii*로 등록된 GenBank accession number KB093892, KM979920, KM246257, JN712458과 >99%로 일치하였다. 분리된 균주는 모두 *C. trifolii*와 동일 계통군으로 확인되었다(Fig. 2).

병원성 검정

크리핑벤트그래스에 대한 병원성 검정은 Penn-A1 품종을 대상으로 실시하였다. 기주 식물체는 10×10 cm 크기의 사각 포트에 종자를 파종한 후 약 3개월간 포트에 잎이 가득 하도록 예지 없이 키운 다음 준비하였다. 접종원 생산 및 접종은 Chang and Hwang (2003)의 방법을 변형하여 이용하였다.

균주는 감자한천배지에서 1주일동안 25±1°C 에서 암배양하였다. 그리고 나서 2일간 25±1°C에서 명배양을 통해 분생포자를 유도한 후에 멸균수를 부어 끓은 다음 수거하였다. 접종원은 분생포자 현탁액으로부터 균사체를 두 겹의 천(Cheesecloth)으로 제거한 후 10⁶ conidia ml⁻¹로 조정하여 사용하였다.

접종은 분생포자 현탁액을 500 mL 핸드 분무기로 포트 식물체에 1 L m⁻¹의 양으로 살포하였다. 접종이 끝난 사각 포트는 플라스틱 컨테이너(46×32×17 cm, Komaz, Seoul, Korea)에 넣었으며, 컨테이너 내부 습도를 유지하기 위하여 약 30% 양에 달하는 젖은 상토(1:1 비율로 상토와 멸균수를 혼합)를 하부에 깔아 넣었다. 컨테이너 뚜껑을 닫기 전에 내부 습도 유지를 위해 멸균수를 분무기로 일정량을 뿌리고 랩을 덮은 다음 컨테이너 뚜껑을 닫은 후 30°C/

Table 1. Conidial characteristics of *Curvularia trifolii* isolated in this study and other *Curvularia* spp.

| Scientific name ^z | Septa no. | Conidia size of 3-septate (µm) |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <i>Curvularia borrieriae</i> | 3~9 (usually 3-septate) | 20~32×8~15 |
| <i>C. geneiculata</i> | 3~9 (usually 4-septate) | 18~48×8~14 |
| <i>C. lunata</i> | 3 | 20~32×9~15 |
| <i>C. trifolii</i> | 0~3 (usually 3-septate) | 20~34×8~14 |
| Present isolates | 0~3 (usually 3-septate) | 20~25×9~10 |

^zEllis (1971).

25°C(낮/밤)가 유지되는 생육상(SH-302, 세영과학, 부천시)에서 보관하였다. 대조구에서는 증류수를 접종하였다. 본 실험은 임의배치 3반복으로 실시되었다.

분생포자는 크리핑벤트그래스에서 접종 후 1~2일 사이에 발아하였고, 발아관 끝에 부착기가 형성되었다(Fig. 1. F). 부착기는 *Bipolaris*속, *Curvularia*속 등의 균류에서 볼 수 있으며, 기주식물에 부착하기 위하여 균사나 발아관 끝부분에 형성되는 침입균사(penetration hypha) 전 단계 기구이다(Yadav, 1981). 잎몸의 부착기 형성 부분에서는 접종 10일 전후로 포장에서와 같은 반점 증상이 나타났다. 잔디 잎의 반점은 시간이 흐르면서 확대되었다. 잎몸의 반점은 초기에 수침상으로 진녹색을 보이다가 노랗게 말라 죽었다. 온도와 습도가 높을 경우 잎몸의 병반은 잎집까지 내려가면서 진전되었다(Fig. 1. G). 병이 심한 잎은 결국 고사하였고, 말라서 비틀어지는 현상이 발견되었다. 지역별로 분리한 2개 균주는 병원성 차이를 보이지 않았다. 병원균 대신 증류수를 접종한 대조구에서는 증상이 발견되지 않았다. 병원균을 접종한 식물체에서는 접종한 균주와 동일한 균이 재분리되었다.

외국에서는 *C. trifolii*가 잔디 등 화본과 식물에 병을 일

오키는 것으로 보고된 바 있다(Ellis, 1966; Falloon, 1976). 그러나 아직까지 우리나라에서는 기주인 크리핑벤트그래스를 대상으로 보고된 예가 없다. 외국의 경우 *Curvularia* 속 중 *C. lunata*, *C. geniculata* 등이 잔디에 심하게 병을 일으킨다는 보고가 있으나(Brown et al., 1972; Hodges, 1972), 본 연구에서는 발견되지 않았다.

저자들은 2014년 여름에 경상남도 합천군 소재 크리핑벤트그래스 재배지역에서 *C. trifolii*에 의한 크리핑벤트그래스 잎마름 증상을 발견하였고, 분리균주의 배양적·균학적 특성, 병원성 검정, 분자생물학적 분석 결과를 근거로 *C. trifolii*로 동정하였다. 본 연구 결과는 국내 학계 최초 보고이므로 병명을 크리핑벤트그래스에서 발생한 *Curvularia* 잎마름병으로 명명하고자 한다.

Endo (1961)는 *C. trifolii*가 크리핑벤트그래스 유묘에 27°C와 29°C에서 가벼운 병원성을 보였다고 보고하였다. 그러나 Falloon (1976)에 따르면 *C. trifolii*가 병원성에 적합한 온도는 30°C인 것으로 보고한 바 있다. Brown et al. (1972)도 병원성에서 온도의 중요성을 이미 지적한 바 있다. 국내에서도 재배환경이 다른 지역별 실태조사와 병원성에 미치는 온도와 습도의 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 본 연구로부터 자낭균문(Ascomycota)에 속하는 균류인 *Curvularia*속 병원균의 유성포자인 자낭포자를 발견하지 못하였다. 하지만 향후 다양한 지역에서 유래한 균주로부터 자낭포자의 존재 유무를 확인하거나, 선택배지를 이용하여 무성포자 교배를 통해 포자를 유도함으로써 자낭과 자낭포아의 균학적 특성 연구도 필요할 것으로 보인다(Alcorn, 1988).

또한 Falloon (1976)은 새포아풀(*Poa annua*)과 콜로니얼벤트그래스(*A. tenuis*)가 *C. trifolii*에 매우 감수성이고, 크리핑벤트그래스에 비해 더 감수성인 것으로 보고한 바 있다. 향후 기주 및 품종 저항성, 살균제 선발에 대한 검토가 필요할 것으로 보인다.

요 약

2014년 7월부터 9월까지 경상남도 합천 지역의 크리핑벤트그래스(*Agrostis stolonifera*) 퍼팅 그린에서 *Curvularia trifolii*에 의한 *Curvularia* 잎마름병이 관찰되었다. *Curvularia* 잎마름병은 크리핑벤트그래스 잎몸에서 수침상으로 시작되어 진한 피사반점으로 변한 다음, 크기가 확대되어 회갈색 또는 밝은 갈색의 동그란 타원형 병반이 되었다. 병반의 둘레는 자주 분홍 또는 진한 갈색의 경계를 갖으며 동그런 무리(halo)를 보였다. 피사 반점들은 융합되어 불규칙한 모양이 되었고 잎끝 또는 잎 전체가 말랐다. 마른 잎몸은 회백색이나 황갈색을 나타냈다. 그 균은 균학적 특성과 16S rDNA 서열 분석에 의해 동정되었다. 병원균의 분생포

자는 크기가 짧았고, 보통 3개의 격막을 가졌으며, 곧거나 자주 휘었는데 양끝 세포는 일반적으로 가운데 세포보다 투명하였다. 3개의 격막을 지닌 분생포자의 배지상 크기는 26~28×11~12 μm였다. 기주에 대한 균의 인공접종으로 병원성이 확인되었다. 본 논문은 *C. trifolii*가 크리핑벤트그래스에 *Curvularia* 잎마름병을 일으키는 우리나라 최초의 보고이다.

주요어: 크리핑벤트그래스, *Curvularia trifolii*, *Curvularia* 잎마름병, 병원성

Acknowledgements

This work was supported by National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government (NRF-2015R1D1A1A01057334).

References

- Alcorn, J.L. 1988. The taxonomy of "Helminthosporium" species. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:37-56.
- Brown, G.E., Cole, H. and Nelson. R.R. 1972. Pathogenicity of *Curvularia* sp. to turfgrass. *Plant Dis. Rep.* 56:59-63.
- Casler, M.D. and Duncan, R.R. 2003. Turfgrass biology, genetics, and breeding. John Wiley & Sons, NY, U.S.A.
- Chang, S.W. and Hwang, B.K. 2003. Effects of plant age, leaf position, inoculum density, and wetness period on *Bipolaris coicis* infection in adlays of differing resistance. *Plant Dis.* 87:821-826.
- Endo, R.M. 1961. Turfgrass diseases in Southern California. *Ibid.* 45:869-73.
- Ellis, M.B. 1966. Dematiaceous Hyphomycetes. VII. *Curvularia*, *Brachysporium*, etc. *Myc. Papers* 106:13.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Falloon, R.E. 1976. *Curvularia trifolii* as a high-temperature turfgrass pathogen. *N. Z. J. Agric. Res.* 19:243-248.
- Hodges, C.F. 1972. Interaction of culture age and temperature on germination and growth of *Curvularia geniculata* and on virulence. *C. J. Botany* 50:2093-2096.
- KSPP (The Korean Society of Plant Pathology). 2009. List of plant disease in Korea. pp. 680-681. JY Publishing Group, Suwon, Korea.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis et al. (Eds.) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, U.S.A.
- Yadav, B.S. 1981. Behaviour of *Cochliobolus sativus* during its infection of barley and wheat leaves. *Aust. J. Bot.* 29:71-79.