

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 found in 1981 and 1987, respectively.

## Zoysiagrass에 *Waitea circinata*에 의한 Waitea Ring Patch 발생

김경덕<sup>1</sup> · 홍성철<sup>2\*</sup> · 장공만<sup>1</sup> · 한무호<sup>1</sup> · 피재호<sup>2</sup> · 박대섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>제일모직(주) 식물환경연구소, <sup>2</sup>단국대학교 분자생물학과

### First Report of Waitea Ring Patch caused by *Waitea circinata* on Zoysiagrass

Kyung-Duck Kim<sup>1†</sup>, Sung-Chul Hong<sup>2†</sup>, Kong-Man Jang<sup>1</sup>, Muho Han<sup>1</sup>, Jae-Ho Pyee<sup>2</sup>, and Dae-Sup Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Plant & Environment Research Center, Samsung Cheil Industries, Gunpo, Korea

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Dankook University, Yong-in, Korea

**ABSTRACT.** A new pathogen was isolated from zoysiagrass-planted park of Jeju island in 2014. Symptoms appeared a type of irregular patches occurring brownish leaf blight, followed by stem and crown rot. The symptom was very similar to that of large patch caused by *Rhizoctonia solani*, a well-known devastating zoysiagrass disease. The isolate showed thin orange-colored mycelia and sclerotia were formed on the medium based on cultural characteristics. The causal agent of the disease was finally identified as *Waitea circinata* by analysis of ribosomal DNA. On the inoculation test, *Waitea circinatae* showed strong pathogenicity to the zoysiagrass. The mycelia were obviously observed in the inoculated tissues. This is the first report of Waitea ring patch caused by *Waitea circinata* on zoysiagrass.

**Key words:** Turf disease, *Waitea circinata*, Waitea ring patch, Zoysiagrass

Received on November 18, 2014; Revised on December 5, 2014; Accepted on December 8, 2014

\*Corresponding author: Phone) +82-31-460-3401, Fax) +82-31-460-3499; E-mail) daesup.park@samsung.com

†These two authors contributed equally to this work.

© 2014 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 & #160; (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, & #160; and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

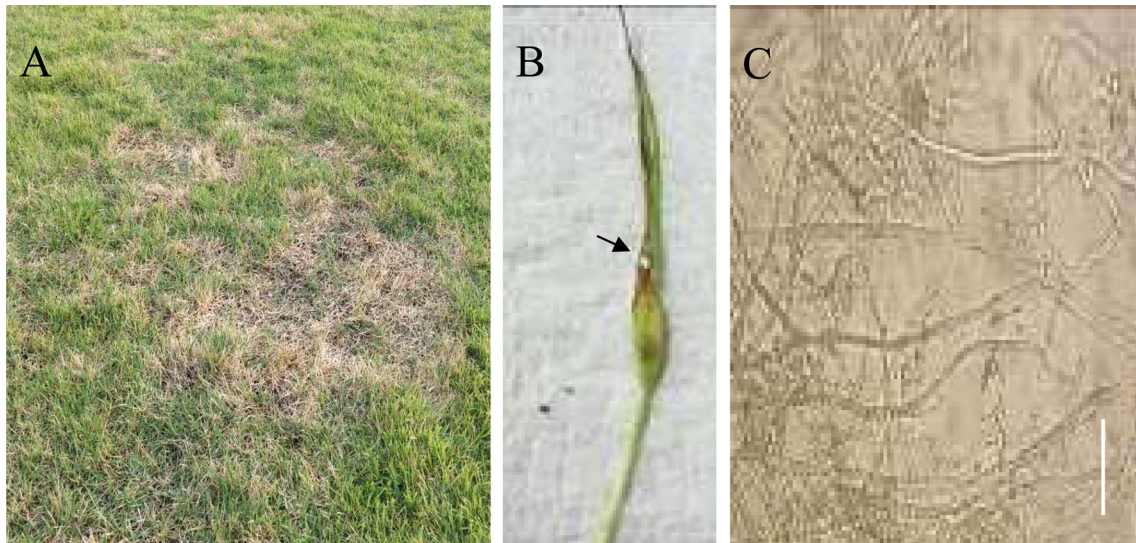
Waitea ring patch는 미국의 미시간주에서 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass에서 봄부터 가을철까지 광범위하게 발병함이 처음 확인되었다(De la Cerda et al., 2007). *Waitea circinata* var. *circinata*는 *Rhizoctonia* 무성생식의 특성을 가지고, *Rhizoctonia zea* (*Waitea circinata* var. *zea*)와 *Rhizoctonia oryzae* (*Waitea circinata* var. *oryzae*)와는 엽기 서열은 유사하나, 균핵의 색상 등 형태적 특성에 차이를 보인다(Gunnell, 1986; Leiner and Carling, 1994; Chen et al., 2009).

*Waitea circinata*는 25°C - 30°C에서 최적 생육을 보이지만, annual bluegrass에서는 15°C - 35°C에서도 뿌리 상단부와 줄기 및 잎 조직 모두 발병이 가능하다(Leiner and Carling, 1994). 또한 bentgrass에서의 Waitea ring patch 발병에 대한 보고가 있었으나, 분자생물학적인 엽기서열 분석결과로

*Waitea circinata*에 의한 발병임이 확인 되었다(Chen et al., 2009). 그러나, *Waitea circinata*가 다양한 작물 및 한지형 잔디 품종별 감염 정도와 병 기작 등에 대해서는 아직 명확하게 연구되지 않았으며 난지형 잔디에서는 아직 발병 보고가 없었다.

#### Zoysiagrass에서 발생한 Waitea ring patch

최근 제주도에 zoysiagrass가 식재 된 공원에서 새로운 ring patch의 병반이 발견되었다. *Rhizoctonia solani* AG2에 의한 large patch와는 달리 융합된 고리 형태의 모습이었다(Fig. 1A). 이병 과정을 관찰한 결과, 주로 잎 조직에서 관찰되었고, 주변조직으로 확산 및 갈변 후 괴사하는 것으로 보였으며, 다시 잎과 줄기 등을 통하여 주변 개체들로 이



**Fig. 1.** Symptoms of Waitea ring patch on zoysiagrass. A: Entire appearance of disease symptom; B: Symptom on the infected leaf; C: Mycelia of *Waitea circinata* from infected leaf; Bar: 100  $\mu$ m with  $\times 400$ .

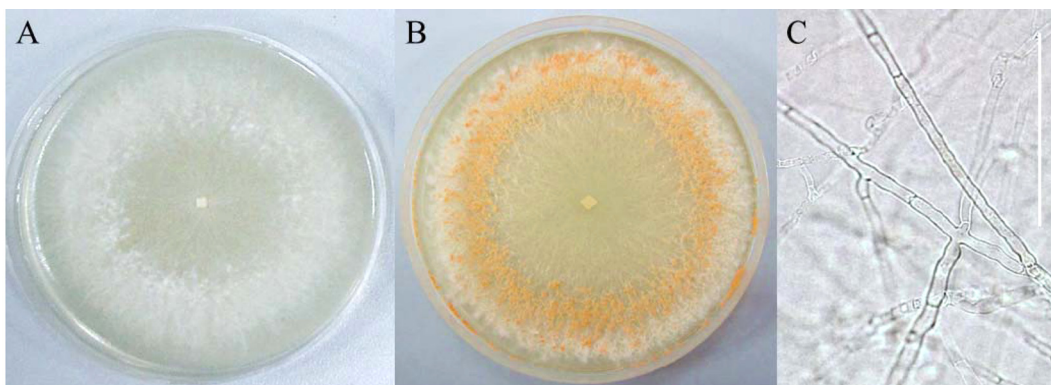
병 가능한 것으로 확인 되었다(Fig. 1B). 감염된 지역에서 채집한 잎 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, *Rhizoctonia* 속과 유사하게 분지각 90° 정도의 뿌리모양으로 자라는 격막을 갖는 균사들을 확인하였다(Fig. 1C).

한지형 잔디인 Kentucky bluegrass에 발병 증상은 작게는 2.5 cm 에서 30 cm에 이르기까지 엷은 노란색 링 패취 형태를 보이면서 주변의 건전부에 비해 확연히 차이를 보였다. Yellow patch의 병 증상과 매우 유사하며 Fairy ring 혹은 Summer patch와도 혼동 될 수 있으나, 시간이 지남에 따라 일반적인 반원형에서 링 모양의 원형 또는 불규칙한 부정형의 링 형태를 가지며 점차 잎이 갈색으로 변하면서 괴사되는 특징이 있다(Tredway et al., 2006; Turgeon and Vargas Jr, 2006).

#### 병원균의 형태적 특징

채집한 이병 잎과 줄기에서 건전부와 이병부 경계부위의 조직을 절취한 후 Chang and Lee (2013) 에서 제시된 방법으로 병원균을 분리하였다. 25°C 항온기에서 배양한 대표 균주의 계대 배양을 진행하여 본 연구를 수행하였다.

PDA배지에서 배양한 결과, 접종 후 2-3일 경과한 생육 초기에는 균사 색깔이 흰색을 띠면서 왕성하게 성장하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 배양 후 5일 이상 경과되면 균층의 전반적인 색깔이 점차 오렌지색으로 변하면서 포자의 형성 없이 배지위에서 균핵을 형성 하였다(Fig. 2B). 분리된 *Waitea circinata*의 형태적인 특성을 확인하기 위하여 PDA 배지에 접종 후 25°C 항온기에서 3일간 충분히 자란 균사조각을 분리하여 광학현미경으로 균사의 형태 및 격막 유무 등을 관찰하였다. 분리한 병원균 균사들의 현미



**Fig. 2.** Morphology of *Waitea circinata* isolates on potato dextrose agar. A and B: After 3 and 21-days incubation period, respectively; C: Mycelium; Bar: 100  $\mu$ m with  $\times 400$ .

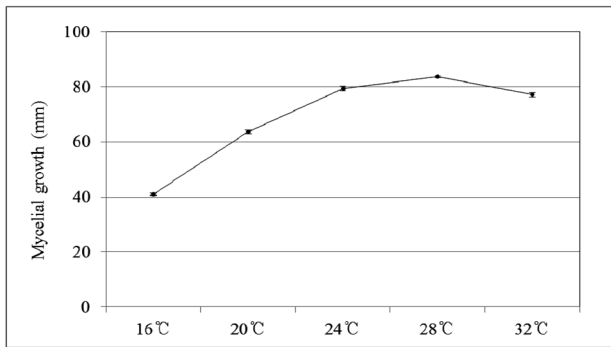


Fig. 3. Responses of temperature on the mycelium growth of *Waitea circinata* on PDA. Mycelium growth was measured after 60 hours incubation. Bars represent standard error.

경학적 관찰 결과(Fig. 1C)와 PDA배지상의 균사 분지 형태가 전형적인 *Rhizoctonia* 속과 매우 유사함을 확인하였다(Fig. 2C).

**배양적 특성**

생육 온도별 균사생장 반응을 조사하기 위하여 PDA 배지 중앙에 3일간 배양된 균총의 가장자리에서 직경 5 mm 균사 조각을 떼내어 접종하여 16°C, 20°C, 24°C, 28°C 및 32°C의 5가지 온도가 설정된 항온기에 넣어 60시간 배양한 후 균총 직경을 측정하였다.

Large patch 균주의 경우는 일반적으로 25°C - 30°C 사이 구간에서 균사의 최적 생육을 보인다(Chang and Lee, 2013). 분리된 *Waitea circinata*는 24°C - 32°C가 적정 생육온도로 보이며, 이는 Leiner and Carling (1994)의 보고한 결과와 일치하였고, 흥미롭게도 저온인 16°C에서도 활발한 생육을 보이는 등 적정 온도 범위가 넓은 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

**유전자 분석에 의한 동정**

PCR 유전자 증폭법을 이용한 분자생물학적인 동정을 위하여 PDA에서 3일간 배양 후, 배양된 곰팡이 균사로부터 리보솜 DNA (rDNA)를 추출하여 45-1로 임의로 명명하였다. 추출된 rDNA를 이용하여 Chang and Lee (2013)가 제시한 조건에서 유전자 간 스페이서(ITS) 센스 및 안티센스 프라이머인 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 과 ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3')을 사용하여 증폭하였다. PCR 증폭 산물을 pGEM®-T 운반체로 도입 후 염기서열을 분석 하였다. 45-1의 rDNA 염기서열을 비교 분석한 결과, 유전자은행에서 알려져 있는 *Rhizoctonia zeae* (*Waitea circinata* var. *zeae*)와 98% 이상 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 4).

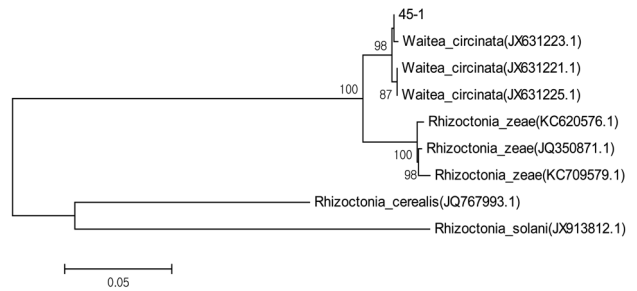


Fig. 4. Genetic similarity among the isolate 45-1, *Waitea circinata* and *Rhizoctonia* spp. by DNA sequence analysis. A phylogenetic tree was produced by carrying out Neighbor-joining (NJ) and NJ Bootstrap analysis using the MEGA 6 program based on the ITS sequence data obtained from the isolate and derived from the genbank. Sequences were aligned with Clustal-X, and parsimony analysis was performed and distance analysis was performed using NJ search.



Fig. 5. Pathogenicity test of *Waitea circinata* on Zoysiagrass. A: Symptoms on the inoculated leaves; B: Mycelia (arrow indicates) of *Waitea circinata* from the infected leaf tissues; Bar: 100 μm with ×200.

**병원균 검정**

병원성을 검정하기 위해 zoysiagrass ‘안양중지’(출처: 삼성 제일모직 식물환경연구소 잔디 포트)에 동정한 *Waitea circinata* (45-1)을 직접 접종하였다. 잔디는 관행 관리에 의해 1년 이상 재배된 잔디를 이용하였으며, 그린용 컷터로 잔디를 잘라 포트(직경 15 cm)에 옮겨다. 3일 동안 안정을 시킨 후, 잔디 병원균 검정에 이용하였다. 접종균은 PDB (Potato Dextrose Broth)배지를 이용하여 24°C에서 5일간 배양하였으며, 접종원 준비 및 접종은 Chang and Lee (2013)가 제시한 방법에 따랐다. 접종 후 포트는 수분을 충분히 공급하여 밀봉한 후 병 발생을 유도하였다.

그 후 54시간 동안 24°C에서 배양 한 후에 발병 정도를 지속적으로 관찰하면서 조사하였다. 접종한 45-1에 의한 zoysiagrass 에서의 초기 병 증상으로 잎의 선단 부분부터 시작하여 갈변 후 시간이 경과됨에 따라 잎과 줄기가 고사하는 병징을 보였다(Fig. 5A). 광학현미경 관찰 결과 균사

의 격막과 전체적인 형태가 접종한 균과 동일한 것으로 확인 되었다(Fig. 5B).

## 요 약

Zoysiagrass 는 대표적인 난지형 잔디로 Curvularia leaf spot, Large patch, Rhizoctonia blight, Spring dead spot, 그리고 Dollar spot 등의 다양한 병에 직면해 있으며 최근에는 많은 병원균들의 복합 감염에 의한 잔디병 양상을 보이고 있다. 최근에 패취형태의 병반을 가진 zoysiagrass 엽조직으로부터 *Rhizoctonia* 속과 유사한 곰팡이를 분리하였다. 리보솜 DNA의 염기서열을 분석하여 *Waitea circinata* 균주들과 98% 이상의 상동성을 보였고, Koch's 법칙에 따라 zoysiagrass에서 병원성을 확인하여 이 병의 주 원인균은 *Waitea circinata*로 판명되었다. 따라서 본 병은 zoysiagrass에서 *Waitea circinata*에 의해 최초로 국내에서 발생한 병으로 사료되며, 기본 병명과 동일하게 Waitea ring patch로 사용하기를 제안하고자 한다.

**주요어:** 잔디병, *Waitea circinata*, Waitea ring patch, 돌잔디

## References

- Chang, T. and Lee, Y.S. 2013. Occurrence of brown patch on Kentucky bluegrass caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IB. Kor. Turfgrass Sci. 2(1):88-94. (In Korean)
- Chen, C.M., de la Cerda, K.A., Kaminski, J.E., Douhan, G.W. and Wong, F.P. 2009. Geographic distribution and rDNA-ITS region sequence diversity of *Waitea circinata* var. *circinata* isolated from annual bluegrass in the United States. Plant Dis. 93:906-911.
- De la Cerda, K.A., Douhan, G.W. and Wong, F.P. 2007. Discovery and characterization of *Waitea circinata* var. *circinata* affecting annual bluegrass from the Western United States. Plant Disease 91(7):791-797.
- Gunnell, P.S. 1986. Characterization of the telemorphs of *Rhizoctonia oryzae-sativae*, *Rhizoctonia oryzae*, and *Rhizoctonia zae*, and the effect of cultural practices on aggregate sheath spot of rice caused by *Rhizoctonia oryzae-sativae*. PhD Diss., California State Univ., Davis.
- Leiner, R.H. and Carling, D. 1994. Characterization of *Waitea circinata* (*Rhizoctonia*) isolated from agricultural soils in Alaska. Plant Dis. 78:385-388.
- Tredway, L.P., Stowell, L.J. and Gelernter, W. 2006. Yellow spot and the potential role of cyanobacteria as turfgrass pathogens. GCM. Nov. 2006:83-86.
- Turgeon, A.J. and Vargas Jr, J.M. 2006. The turf problem solver. John Wiley and Sons, NJ, USA. pp. 162-163.

Chang, T. and Lee, Y.S. 2013. Occurrence of brown patch on