

국내 딸기 시들음병균 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*의 유전적 다양성, 병원성과 살균제 반응

Genetic Diversity, Pathogenicity, and Fungicide Response of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Isolated from Strawberry Plants in Korea

*Corresponding author

Tel: +82-41-635-6348

Fax: +82-41-635-7931

E-mail: namtel7@korea.kr

남명현^{1*} · 김현숙¹ · 박명수² · 민지영³ · 김흥태³¹충남농업기술원 딸기연구소, ²서울대학교 자연과학대학 생명과학부,³충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

Myeong Hyeon Nam^{1*}, Hyun Sook Kim¹, Myung Soo Park², Ji Young Min³, and Heung Tae Kim³

¹Strawberry Research Institute, Chungnam ARES, Nonsan 32914, Korea²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Korea³Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fof) is the most important diseases of a strawberry field in Korea. We surveyed phylogenetic analysis, pathogenicity test, and fungicide response about Fof isolates isolated from Korea. Twenty-seven isolates of *F. oxysporum* isolated from strawberry plants were conducted in this study. Specific amplification by Fof specific primer was confirmed in all 26 isolates except Fo080701 isolate. The nuclear ribosomal intergenic spacer region and the translation elongation factor EF-1 α gene sequences of isolates revealed three main lineages. Most of all isolates were contained DNA lineage group 1, but 2 and 3 group was shown only one and three isolates, respectively. All isolates were shown in pathogenicity with cv. Seolhyang. The EC₅₀ mean values of prochloraz ranged 0.02–0.1 μ g/ml except for Fo080701 and effectively inhibited mycelial growth at low concentrations. The EC₅₀ value of metconazole was also 0.04–0.22 μ g/ml, showing a similar inhibitory effect to that of prochloraz. The EC₅₀ value of pyraclostrobin was 0.23–168.01 μ g/ml, which was different according to the strain. In the field trial, boscalid+fludioxonil, fluxapyroxad+pyraclostrobin, and prochloraz manganese were selected as the effective fungicides for controlling *Fusarium* wilt.

Keywords: *Fusarium* wilt, Phylogenetic analysis, Prochloraz

Received May 26, 2020

Revised June 26, 2020

Accepted June 29, 2020

서론

딸기에 발생하는 시들음병은 전 세계적으로 딸기를 재배하고 있는 나라에서 가장 문제가 되고 있는 주요 병해이다. 시들음병을 일으키는 대부분의 병원균은 *Fusarium oxysporum* f.

sp. *fragariae* (Fof)로 1962년에 호주에서 최초 보고되었으며 (Winks와 Williams, 1965), 그 후 일본(Okamoto 등, 1970), 한국(Kim 등, 1982), 멕시코(Castro-Franco와 Davalos-Gonzalez, 1990), 중국(Huang 등, 2005), 호주(Golzar 등, 2007), 스페인(Arroyo 등, 2009), 미국(Koike 등, 2009, Williamson 등, 2012), 세르비아(Stanković 등, 2014), 터키(Dinler 등, 2016)에서 보고되는 등 전 세계적으로 확산 추세에 있다.

딸기에 발생하는 병원성을 가진 Fof를 신속 정확하게 진단하는 기술은 딸기 재배현장에서 가장 시급한 과제이다. 식물병 진단에 분자생물학적 기법을 이용한 방법이 개발되고 있으며(Carbone과 Kohn, 1999), 딸기 시들음병 진단을 위해 2013년 최초로 일본에서 Fof 특이적 primer가 개발되었다(Suga 등, 2013). 개발된 primer는 딸기 이외의 작물에 발생하는 formae specialis의 병원균과 구별할 수 있으며, 일본의 딸기에서 분리한 병원성과 비병원성 Fof를 구별할 수 있으나 미국 California에서 분리한 Fof균 모두를 검출할 수는 없는 한계가 있었다(Koike와 Gordon, 2015). Li 등(2014)도 딸기 재배포장에서 선택배지와 real-time PCR을 이용해 토양의 *F. oxysporum*을 검출할 수 있었지만 Fof의 특이적 진단은 불가능한 한계를 보였고 국내에서는 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 이용한 딸기 시들음병균 진단기술이 개발되기도 하였다(Hong 등, 2018). 또한 Burkhardt 등(2019)은 미국에 발생하는 Fof에 특이적인 Taqman quantitative PCR과 isothermal recombinase polymerase amplification assay 기술을 개발하여 진단에 이용하고 있다. 그러나 국내 발생하는 딸기 시들음병균의 유전적 특성이 조사되지 못한 상태에서는 정확히 Fof 진단방법을 적용하기 어려운 측면이 있고 이에 따른 방제 방법을 적용하기도 쉽지 않은 실정이다.

현재 딸기에 등록된 시들음병 살균제는 dazomat과 metam sodium의 토양훈증제와 prochloraz manganese, fluxapyroxad+pyraclostrobin, fluxapyroxad+metalaxyl-M, etridiazole+thiophanate-methyl, iprodione+prochloraz manganese, pyribencarb, copper hydroxide의 7종이 등록되어 있다(<http://pis.rda.go.kr>). *Fusarium* spp.에 의한 시들음병 방제제로는 prochloraz (Amini와 Sidovich, 2010; Shin 등, 2018), prothioconazole (Miller 등, 2020), metconazole (Burlakoti 등, 2010) 과 같은 침투이행성의 demethylation inhibitor계 살균제가 대표적이다. 또한 pyraclostrobin (Cruz Jimenez 등, 2018), thiophanate-methyl (Kim 등, 1982; Masiello 등, 2019; Shin 등, 2018)도 효과가 인정되고 있으나 이런 살균제들은 저항성균 발생이 빠른 특성을 가지고 있다(Petkar 등, 2017). 최근에는 신규 succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI)계인

pydiflumetofen이 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*에 의한 수박 시들음병에 효과적이라 보고하였다(Miller 등, 2020).

따라서 본 연구는 국내 딸기 시들음병균의 유전적 다양성과 병원성을 확인하고 분리균에 대한 살균제 반응과 살균제에 대한 재배포장에서의 방제효과를 조사하여 효과적인 시들음병 진단 및 방제에 적용하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

분리균. 딸기 시들음병균 27균주는 2003년부터 2016년 동안 국내 딸기 딸기재배포장에서 시들음병에 이병된 식물체로부터 분리하였다(Table 1). 병원균 순수 분리는 딸기 관부, 엽병, 뿌리로부터의 이병조직을 70% 알콜로 30초간 표면소독 후 3회 멸균수로 세척 후 water agar 배지에 치상하였다. 25°C 배양기에서 3일간 배양 후 자란 선단의 균사를 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 27°C 배양 후 자란 colony와 분생포자 형태 및 single palide 형태를 현미경으로 조사하여 Fof로 동정하였다. 또한 더 자세한 동정을 위해 Suga 등(2013)의 Fof 특이적 primers (FofraF/FofraR primers)와 Burkhardt 등(2019)의 qRT-PCR probe (Frag_F/Fraf_R/Frag_TaqMan_probe)를 이용해 DNA 증폭 여부를 확인하였다. qRT-PCR은 CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 분석하였다. XENO Mastermix (Genotype, Daejeon, Korea)에 DNA 1 µl와 primers와 probe를 각각 1 µl씩 넣고, 16 µl의 멸균수를 넣어 최종반응액을 20 µl로 조성하였다. PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 3분, 95°C에서 denaturation 15초, 62°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초의 조건으로 50 cycles의 PCR을 수행하였다.

병원성 검정. 딸기에서 분리한 시들음병균에 대한 병원성 검정은 딸기연구소의 병 검정 비닐하우스에서 실시하였다. 시험 품종은 조직배양묘로부터 육묘한 설향 품종을 시험에 이용하였으며, 상토는 딸기전용상토(코코피트:피트모스:펠라이트=65:17:10, Purumi, SeoulBio, Eumseong, Korea)를 사용하였다. 시들음병균은 minimal medium broth 배지에 접종하여 27°C, 120 rpm의 shaking incubator에서 7일간 배양하였다. 배양여액은 멸균된 4겹의 거즈로 균사를 거른 후 hemocytometer를 이용하여 분생포자가 1×10^5 conidia/ml 농도로 조정하여 병원성 검정에 이용하였다. 식물체의 뿌리는 5 cm만 남기고 가위로 자른 다음 시들음병균 배양액에 10분간 뿌리 침지 후 상토가 담긴 포트(직경 10 cm)에 이식하였다. 비료 시비는 이식 1주일 후부터 Ferticare (20-20-20, Yara, Oslo, Norway) 1,000배액을 1주일

Table 1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates obtained from strawberry fields in this study

Isolate	Cultivar	Source	Year	Location ^a	PCR ^b	qRT-PCR ^c	DNA group ^d	Pathogenicity ^e
Fo160303	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.8
Fo160506	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	4.4
Fo160403	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.2
Fo160510	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.4
Fo160405	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	3.8
Fo160612	Seolhyang	Crown	2016	Iksan, JB	+	-	1	3.8
Fo160701	Seolhyang	Crown	2016	Hongseong, CN	+	-	1	3.8
Fo160705	Seolhyang	Petiole	2016	Nonsan, CN	+	-	1	3.4
Fo160618	Seolhyang	Crown	2016	Hongseong, CN	+	-	1	3.6
Fo160304	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.2
Fo160708	Seolhyang	Petiole	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.8
Fo160902	Seolhyang	Crown	2016	Buyeo, CN	+	-	1	4.0
Fo160712	Seolhyang	Crown	2016	Buyeo, CN	+	-	1	1.6
Fo160721	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	3.4
Fo160801	Seolhyang	Runner	2016	Nonsan, CN	+	-	1	3.6
Fo160802	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	2.4
Fo160805	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	-	1	3.2
Fo080703	Akihime	Crown	2008	Hamyang, GB	+	-	1	1.6
Fo140501	Seolhyang	Petiole	2014	Nonsan, CN	+	-	1	3.4
Fo140604	Seolhyang	Crown	2014	Dangjin, CN	+	-	1	2.8
Fo140607	Seolhyang	Runner	2014	Nonsan, CN	+	-	1	2.4
Fo140703	Seolhyang	Crown	2014	Samyae, JB	+	-	1	3.4
Fo150702	Seolhyang	Root	2015	Jinju, GN	+	-	1	1.2
Fo080701	Redpearl	Crown	2008	Ganghwa, GG	-	+	2	1.6
Fo160609	Seolhyang	Crown	2016	Nonsan, CN	+	+	3	1.8
Fo79	Summerberry	Crown	2003	Nonsan, CN	+	+	3	2.0
Fo160718	Line	Runner	2016	Nonsan, CN	+	+	3	2.4

^aCN, Chungcheongnam-do; JB, Jeollabuk-do; GB, Gyeongsangbuk-do; GN, Gyeongsangnam-do; GG, Gyeonggi-do.

^bPCR: 239-bp amplicon was (+) or was not (-) obtained using the FofraF/fofraR primers pair (Suga et al., 2013).

^cqRT-PCR: Burkhardt et al. (2019).

^dDNA group: combined analysis with nuclear ribosomal intergenic spacer region and elongation factor sequences.

^ePathogenicity test was evaluated at 52 days after inoculation as disease index: 0=no symptoms, 1=1-2 leaves rolled and yellowed leaves, 2=all leaves rolled and deformed, 3=chlorosis and early plant wilting, 4=necrosis and entire plant wilting, 5=death.

간격으로 주당 50 ml씩 관주하였다. 식물체는 각각의 시들음병 균당 5주를 시험에 이용하였다. 이병지수는 시들음병균 접종 52일에 조사하였다. 이병지수는 0 무병징, 1 신엽황색, 하엽엽병 적색, 2 짝잎, 3 1/2시들, 4 전체시들, 5 고사이다(Nam 등, 2005).

유전적 다양성분석. 딸기에서 분리한 27균주에 대한 DNA sequencing 분석을 실시하였으며 시들음병균의 DNA 분리는 Park 등(2005)의 방법을 이용하였다. Nuclear ribosomal intergenic spacer region (IGS)와 translation elongation factor EF-1 α gene (tef1) genes은 species 수준에서 각각의 균주를 분석

하기 위해 증폭하였다. IGS와 *tef1* genes의 PCR 증폭은 iNL11/CNSa/iCNS11/NLa (O'Donnell 등, 2009)과 EF1-728F/EF1-986R (Carbone과 Kohn, 1999)를 이용하였다. PCR 반응은 이전에 보고된 방법에 의해 CFX96 thermal cycler (Bio-Rad)로 실시하였다. PCR 산물은 PCRquick-spin PCR Product Purification Kit (iNtRON BioTechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 분리 후 Bioneer Corporation (Cheongwon, Korea)에 sequencing 분석을 의뢰하였다. Sequences는 MEGA 5 software (Tamura 등, 2011)를 이용해 편집 후 MAFFT v7 (Katoh와 Standley, 2013)로 align하였다. Combined data set (IGS+*tef1*)를 이용한 maximum likelihood 분석은 GTR γ G model과 1,000 bootstrap replicates을 이용해 RAxML version 7.03 (Bioinformatics Institute, Singapore) (Stamatakis, 2006)로 분석하였다.

살균제 반응. 딸기 시들음병균에 대한 살균제 반응 조사에 사용된 살균제는 prochloraz (a.i. 25%, EC), metconazole (a.i. 20%, SC), pyraclostrobin (a.i. 11%, SC), fluxapyroxad (a.i. 15.3%, SC), dimethomorph (a.i. 25%, WP), thiophanate-methyl (a.i. 70%, WP), copper hydroxide (a.i. 77%, WP)의 7종이었다. 각 살균제는 PDA 배지에서 최종농도(a.i. 기준)가 0.001에서 100 μ g/ml까지 살균제별 농도를 달리하여 첨가하였다. 실험에 사용한 살균제를 멸균증류수에 현탁한 후, PDA 배지에 정해진 농도가 되도록 맞추어 첨가하였으며 세균 오염 방지를 위해 streptomycin 300 μ g/ml를 배지에 첨가하였다. 살균제가 들은 배지에 시들음병균을 접종을 하기 위하여 준비한 Fof의 균사 선단에서 균사 조각(가로 \times 세로, 1 \times 1 mm)을 떼어 내어 살균제를 첨가한 PDA 배지에 접종하고, 27 $^{\circ}$ C의 암상태에서 5일간 배양하였으며 처리된 모든 농도에서 3반복으로 진행되었다. 살균제 효과는 5일간 배양한 후 살균제 배지에서 자란 병원균의 균총의 직경과 무처리 배지에서 병원균 균총의 직경을 조사하고, 아래 식에 의해서 균사생장 억제효과를 구하여 비교하였다.

균사생장 억제효과 (%) =

$(1 - \text{살균제 배지에서 균총의 직경} / \text{무처리 배지에서 균총의 직경}) \times 100$

살균제의 시들음병 방제효과. 딸기 육묘포장에서 살균제별 시들음병 방제효과를 조사하였다. 살균제는 boscalid+fludioxonil (a.i. 23.5+5%, S1 SC, FarmHannong, Seoul, Korea) 1,000배, fluxapyroxad+pyraclostrobin (a.i. 4.6+8.3%, Mirivon SC, FarmHannong) 2,000배, prochloraz manganese (a.i. 50%, Sporgon WP, HanKookSamGong, Seoul,

Korea) 2,000배, copper hydroxide (a.i. 40%, Daeyucucide SC, Daeyu, Seoul, Korea) 500배로 주당 100 ml씩 1주일 간격 3회 근부 관주 처리하였다. 식물체는 설향품종으로 조직배양묘로부터 육묘한 자묘를 사각포트(55 \times 19.6 \times 14.5 cm, 10 l)당 5주씩 딸기전용상토에 정식하였고 처리당 4반복으로 조사하였다. 1차 시험에서 시들음병균 접종은 위의 병원성 검정 방법에 동일하게 접종원을 만들어 포자현탁액(1 \times 10⁶ conidia/ml)을 주당 10 ml씩 4월 25일에 근부접종한 후 살균제는 4월 28일, 5월 4일, 5월 12일 3회 처리하였다. 2차 시험에서는 전년도 시들음병이 발생된 이병상토에 설향품종을 4월 27일에 정식 후 6월 20일, 6월 27일, 7월 4일에 살균제를 처리하였다. 이병지수는 위와 같이 Nam 등(2005)의 방법으로 조사하였고 방제효과는 다음과 같은 식에 따라 계산하였다.

방제효과 (%) =

$(1 - \text{살균제처리구의 이병주율} / \text{무처리구의 이병주율}) \times 100$

처리간 비교는 CoStat통계 프로그램(CoHort software, Berkeley, CA, USA)을 이용하여 Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

분리균 특징. 딸기에서 분리한 시들음병균의 특징은 Table 1과 같다. 분리균은 2003년부터 2016년까지 국내 딸기 재배포장에서 시들음 증상을 보이는 딸기의 관부, 엽병, 뿌리에서 분리되었다. 분리균의 colony 색은 PDA 배지에서 연한 분홍색의 균사를 형성하였고 초생달모양의 소형 및 대형 분생포자와 single palide형성으로 형태적 동정을 하였다(Nelson 등, 1983). 분리균은 Suga 등(2013)이 개발한 Fof 특이적 primer로 DNA 증폭한 결과 Fo080701균주(lineage 2그룹)를 제외한 모든 분리균에서 증폭이 확인되었다(data not shown). 반면 Burkhardt 등(2019)이 개발한 qRT-PCR probe는 Fo080701, Fo160609, Fo79, Fo1607818 (lineage 2, 3그룹)의 4균주만 검출되었다. 분리균의 유전적 다양성을 위한 IGS와 EF-1 α sequences의 유연관계 분석결과 국내 시들음병균은 3가지 그룹의 lineages를 보였다(Fig. 1). 대부분의 분리균은 DNA lineage 1과 3에 속하였으며 단지 Fo080701의 1균주만 lineage 2에 속했다. 3균주 Fo160801, Fo080701, Fo79의 IGS와 EF-1 α sequences는 GenBank에 등록하였다(MT671188, MT671185; MT671189, MT671186; MT671190, MT671187). 국내 DNA lineage 1 그룹에 속하는 균주는 미국이나 일본의 시들음병균과 다른 그룹을 형성하였다. 국내 DNA lineage 3그룹에 속하는 균주는 미

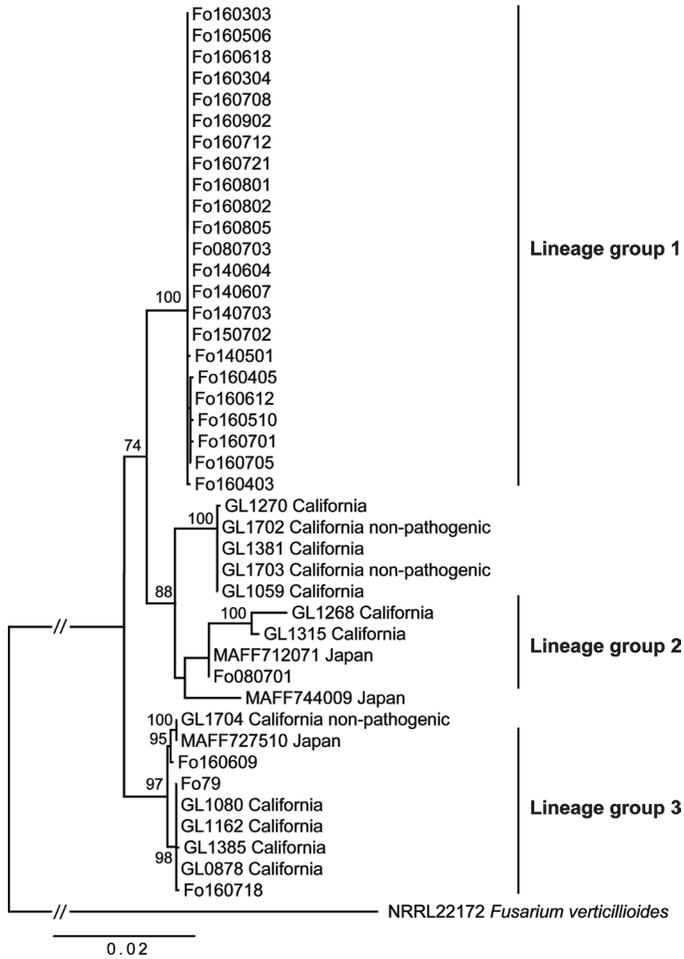


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates from strawberry plants in based on a neighbor-joining analysis of a combined intergenic spacer and elongation factor 1 α gene. Numbers beside each branch represent bootstrap values obtained after a bootstrap test with 1,000 replications. Bar indicates the number of nucleotide substitutions.

국 California의 분리군 somatic compatibility group (SCG) 1 그룹 및 일본의 시들음병균 MAFF727510과 같은 그룹을 형성하였다. 반면 국내 DNA lineage 2그룹에 속하는 Fo080701은 일본의 시들음병균 MAFF712071과 같은 그룹을 보였다. 분리군의 딸기 설향 품종에 대한 병원성 검정 결과 분리군에 따라 정도의 차이는 있지만 모든 분리군은 설향 품종에 병원성이 확인되었다. 특히, Fo160506과 Fo160902는 이병지수가 4 이상의 높은 병원성을 보였으며 lineage 1과 3그룹에 속하는 분리군은 대부분 높은 이병지수를 보인 반면 2그룹에 속하는 균주는 낮은 이병정도를 보였다.

Suga 등(2013)의 시들음병 특이적 primer는 Fo080701을 제외한 국내 대부분의 딸기 시들음병균이 검출되었으며 미국 균주에서는 SCG1의 한 균주와 SCG2에 속하는 균주가 증폭되지

않는 결과를 보였다(Henry 등, 2017). 또한 Pastrana 등(2017)도 FPOST-140, G2-4 (Spain), ATCC 18138 (Australia), NRRL 26438 (South Carolina) 균주도 증폭되지 않는 결과를 보여 Fof 특이적 primer는 Fof 모두를 검출하지는 못하는 한계를 보였으며 Fof는 나라별 시들음병균의 다양한 population이 존재한다는 것을 유추할 수 있었다. 반면 Fof 특이적 primer로 검출할 수 없는 Fof를 검출하기 위해 개발된 probe (Burkhardt 등, 2019)는 국내 lineage 2와 3만 검출이 가능한 한계를 보였다. 따라서 국내 발생하는 Fof는 Burkhardt 등(2019)의 probe보다는 Fof 특이적 primer를 이용하여 검출하는 것이 효과적이며 개발된 primer를 이용한 real-time PCR용 probe 개발도 필요하다.

딸기 시들음병에 관여하는 병원균은 대부분 Fof이며 *F. oxysporum*의 formae specialis는 제한된 기주 범위를 가지며 이 병원균은 단지 딸기에만 발생하는 특징이 있다(Kodama, 1974). 최근 분자생물학적 기법을 이용한 식물병원균 분류가 개발되었으며 병원균 DNA의 IGS와 elongation factor영역을 sequencing하여 정확히 *F. oxysporum*의 formae specialis까지 구분할 수 있게 되었다(O'Donnell 등, 2009). 국내 딸기 시들음병균의 IGS와 EF-1 α sequence분석으로 Fof는 대부분 lineage 1과 3에 속하며 이들 그룹은 설향 품종에 대한 병원성도 높은 경향을 보이는 특징을 보였다. Kim 등(2017)에 의하면 국내 딸기 시들음병균은 PCR-restriction fragment length polymorphism 분석결과 5 그룹으로 세분되었고 유전적 다양성은 재배 지역과 관련되었다고 하였다. Kim 등(2017)이 발표한 딸기 시들음병균은 IGS와 EF-1 α sequence 분석결과 모두 lineage 1그룹에 속하는 결과를 보여 국내에는 이 그룹이 우점적으로 분포하는 것으로 보인다(data not shown). 미국의 딸기 시들음병균은 vegetative compatibility group 분석 결과 3개의 그룹으로 세분되었으며(Henry 등, 2017), 호주의 시들음병균은 EF-1 α sequence 분석 시 많은 lineage그룹을 형성하였다(Paynter 등, 2016). 최근, 미국과 호주에서는 Fof의 population dynamics에 대한 연구를 수행하여 시들음병 발생 국 간 Fof의 유연관계를 밝히려는 연구가 활발히 수행되고 있다(Henry 등, 2017; Paynter 등, 2016). 위의 결과로 딸기 시들음병 발생이 높은 미국, 호주, 일본, 스페인 등의 시들음병균은 독특한 유전적 다양성을 형성하고 있으며 추후 이들 사이의 유연관계를 밝히는 것이 연구되어야 할 것으로 생각된다.

살균제 반응. 국내 딸기 시들음병균 27균주에 대한 살균제 반응은 prochloraz, metconazole, pyraclostrobin, fluxapyroxad, dimethomorph, thiophanate-methyl, and copper hydroxide의 7종을 대상으로 조사하였다(Table 2). Prochloraz는 DNA lineage 2그룹에 속하는 Fo080701균주를 제외하곤

Table 2. Effect of fungicides on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

DNA group	Isolate	Prochloraz		Metconazole		Pyraclostrobin	
		EC ₅₀ ^a	EC ₉₀ ^b	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀
1	Fo160303	0.04	0.78	0.08	6.37	24.11	31,487.14
	Fo160506	0.10	2.69	0.22	3.10	34.94	17,598.06
	Fo160403	0.05	1.00	0.08	1.45	5.27	3,263.09
	Fo160510	0.03	0.50	0.10	1.64	13.34	28,558.41
	Fo160405	0.06	0.93	0.12	2.08	63.29	74,580.29
	Fo160612	0.02	0.43	0.06	1.37	1.31	612.61
	Fo160701	0.06	2.05	0.10	2.35	1.13	469.92
	Fo160705	0.02	0.51	0.07	1.36	0.52	99.39
	Fo160618	0.02	0.45	0.07	1.30	1.11	886.67
	Fo160304	0.03	0.66	0.09	1.61	5.50	3,238.43
	Fo160708	0.06	1.02	0.05	1.81	5.13	790.87
	Fo160902	0.04	0.83	0.10	1.89	14.28	11,996.28
	Fo160712	0.07	0.93	0.08	2.05	27.61	14,825.83
	Fo160721	0.03	0.56	0.08	1.86	4.78	11,540.37
	Fo160801	0.02	0.51	0.12	1.88	13.05	4,923.23
	Fo160802	0.04	0.76	0.09	1.74	27.37	25,581.46
	Fo160805	0.04	0.75	0.06	1.77	6.01	877.81
	Fo080703	-	-	0.07	1.11	1.28	392.93
	Fo140501	0.08	1.46	0.12	2.54	168.01	299,753.63
	Fo140604	0.04	0.56	0.10	1.71	3.79	752.84
Fo140607	0.06	1.71	0.09	2.35	3.30	552.55	
Fo140703	0.05	1.15	0.10	2.28	5.97	1,031.17	
Fo150702	0.07	1.58	0.16	2.22	17.55	10,024.16	
2	Fo080701	15.93	332.56	0.07	1.34	0.23	19.28
3	Fo160609	0.03	1.13	0.04	1.48	0.84	30.40
	Fo79	0.03	0.46	0.07	1.50	2.92	793.10
	Fo160718	0.04	0.78	0.09	1.73	3.50	1240.19

^aEffective concentration ($\mu\text{g/ml}$) reducing the mycelial growth by 50%.

^bEffective concentration ($\mu\text{g/ml}$) reducing the mycelial growth by 90%.

시들음병균의 EC₅₀값이 0.02–0.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 낮은 농도에서 효과적으로 균사 성장을 억제하였다. Metconazole의 EC₅₀값도 0.04–0.22 $\mu\text{g/ml}$ 로 prochloraz와 비슷한 억제 효과를 보였다. Pyraclostrobin의 EC₅₀값은 0.23–168.01 $\mu\text{g/ml}$ 로 균주에 따라 차이가 큰 경향을 보였으며 DNA lineage 1그룹이 다른 그룹에 속하는 균보다 EC₅₀과 EC₉₀값이 균주 간 큰 차이를 보였다. 그 외, fluxapyroxad, dimethomorph, thiophanate-methyl, cop-

per hydroxide 4종은 높은 농도에서도 균사억제효과가 낮아 EC₅₀값을 계산할 수 없었다(Supplementary Fig. 1).

위의 결과로 딸기 시들음병균에 prochloraz, metconazole, pyraclostrobin이 다른 살균제보다 균사억제효과가 높아 효과적인 방제제로의 가능성을 보였다. Prochloraz는 아스파라거스의 줄기썩음병을 일으키는 *F. oxysporum*에 효과적이며(Shin 등, 2018), *Colletotrichum* spp.에 의한 탄저병에도 낮은 농도에서

Table 3. Effect efficacy of fungicides for control *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*

Fungicide	a.i (%)	1st trial		2nd trial	
		DI ^a	Control value ^b	DI	Control value
Boscalid+fludioxonil	23.5+5	0.6 bc ^c	70.0	0.6 f	83.8
Fluxapyroxad+pyraclostrobin	4.6+8.3	0.4 c	80.0	1.8 de	51.4
Prochloraz manganese	50	1.0 bc	50.0	1.4 ef	62.2
Copper hydroxide	77	1.7 abc	15.0	3.3 ab	10.8
Non-treated control		2.0 abc		3.7 a	

Fungicide spray date: 1st trial (Apr 28, May 4, May 12), 2nd trial (Jun 20, Jun 27, Jul 4).

Pathogen inoculation: 1st trial (Apr 25), Survey date: 1st trial (May 30), 2nd trial (Jul 12).

^aDI (disease index): 0=no symptoms, 1=1-2 leaves rolled and yellowed leaves, 2=all leaves rolled and deformed, 3=chlorosis and early plant wilting, 4=necrosis and entire plant wilting, 5=death.

^bThe control value of each treatment was calculated by the following formula. Control value (%)=(1-The ratio of diseased index of each fungicide-treatment/That of the treatment without any fungicide)×100.

^cMeans within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan multiple range test ($P<0.05$).

효과적인 살균제이다(Kim 등, 2006). Metconazole은 *Fusarium* spp.에 대한 EC₅₀값이 0.02–0.04 µg/ml로 상당히 낮은 농도에서 균사 억제효과가 있다고 하였다(Burlakoti 등, 2010). 그러나 metconazole은 딸기 시들음병균 억제에 효과적이지만 딸기 식물체 생육을 억제하는 효과가 커 사용에 주의를 해야 할 살균제이다. 또한 트리아졸계 살균제인 tebuconazole은 딸기 시들음병균에 대해 저항성 발달의 분포가 다양한 특성을 보인다고 하였다(Kwon 등, 2020). Prochloraz와 metconazole과 같은 트리아졸계 살균제는 식물의 apoplast로 들어가 물관, cuticle, 세포벽, 세포간극으로 이동하는 demethylation inhibitor (Arnzen 등, 1970)로 딸기 뿌리로 침입하여 물관에서 증식하는 시들음병에 다른 살균제보다 효과적인 방제제라고 한다.

Pyraclostrobin은 soybean의 seedling disease를 일으키는 *F. oxysporum*에 0.04–0.481 µg/ml의 EC₅₀값을 보여 효과적인 방제제로 선발되었다(Cruz Jimenez 등, 2018). Kim 등(2019)은 고추 탄저병균 *C. acutatum*의 pyraclostrobin에 대한 감수성 EC₅₀값은 0.5 µg/ml 이하, 저항성균은 10 µg/ml 이상으로 저항성과 감수성균의 차이를 뚜렷이 구분하였으며 *cyt b* 유전자의 점 돌연변이 부위를 이용한 대립유전자 특이적 primer로도 저항성균을 판별하였다. Pistachio에 발생하는 *Alternaria alternata*의 pyraclostrobin에 대한 EC₅₀값은 감수성 <0.01 µg/ml, 약 저항성 10 µg/ml이었고(Avenot 등, 2008), 사과에 발생하는 *Botrytis cinerea*의 EC₅₀값은 감수성 0.008–0.132 µg/ml, 저항성 0.520–180.3 µg/ml이었다(Kim과 Xiao, 2010).

위와 같은 딸기 시들음병균에 대한 살균제의 균사 억제효과 조사를 통해 prochloraz와 같은 트리아졸과 pyraclostrobin과

같은 quinol oxidation inhibitors계와 혼용하여 시들음병 방제에 사용한다면 보다 효율적인 방제효과를 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

살균제의 시들음병 방제효과. 딸기 육묘포장에서 4종의 살균제에 대한 시들음병 방제효과를 조사한 결과 boscalid+fludioxonil이 다른 살균제보다 가장 효과적이었으며, fluxapyroxad+pyraclostrobin과 prochloraz manganese도 50% 이상의 방제효과를 보였다(Table 3). 반면 copper hydroxide는 시들음병에 낮은 방제효과를 보였다.

Cho와 Moon (1985)은 Fof 방제를 위해 captafol, benomyl, thiophanate-methyl을 토양관주 처리하여 방제효과를 확인하였다. 최근에는 친환경방제제인 sodium dichloroisocyanurate (NaDCC)를 사용하여 150 µg/ml에서 Fof의 균사생장이 현저히 억제됨으로써 시들음병 방제제로의 가능성이 밝혀졌다(Kim 등, 2015). *In vitro*상에서 prochloraz와 pyraclostrobin이 균사 성장 억제효과가 우수했는데 재배포장 시험에서도 이들 살균제가 시들음병 방제에 효과적이었다. Prochloraz는 토마토의 시들음병균 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 효과적인 약제로 보고되었으며(Amini와 Sidovich, 2010), 국내 딸기재배에 시들음병 방제제로 등록되어 사용되고 있다. 위의 결과에서는 boscalid+fludioxonil이 시들음병 방제에 효과적이었는데 특히 contact 살균제인 fludioxonil보다는 systemic 살균제인 boscalid에 의한 방제효과가 클 것으로 생각된다. Fludioxonil은 *F. oxysporum*의 균사 성장 억제 효과는 없다고도 하였다(Cruz Jimenez 등, 2018). Boscalid, fluxapyroxad와 같은 SDHI계 살

균제로 pydiflumetofen은 수박의 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)을 효과적으로 방제한다고 하였다(Miller 등, 2020). 따라서 새로운 SDHI계 살균제에 대한 딸기 시들음병 방제효과를 검토해 필요가 있으며 다만, 이들 살균제는 교차 저항성 발생 가능성이 높은 약제로 이에 대한 관리도 필요하다.

추후 딸기 시들음병 방제를 위한 살균제는 Fof가 뿌리 및 관부의 도관부위에서 증식하므로 살균제가 관부의 도관부위까지 침투이행이 되어야 효과적으로 방제할 수 있을 것으로 보이며 이에 대한 살균제 선발이 시급해 보인다.

요 약

Fusarium oxysporum f. sp. *fragariae* (Fof) 에 의한 딸기 시들음병은 국내 딸기재배에서 가장 중요한 병해 중 하나이다. 국내 발생하는 Fof의 특성을 분석하고자 시들음병균의 유전적 다양성, 병원성과 살균제 반응을 조사하였다. 분리균은 Fo080701를 제외한 모든 균주에서 Fof 특이적 primer에 증폭되었다. 분리균의 nuclear ribosomal intergenic spacer region과 EF-1 α sequences 분석 결과 3개의 lineage를 형성하였다. 대부분의 분리균은 lineage 1에 속하였으며 lineage 3에 3개 균주와 lineage 2에 1개 균주가 포함되었다. 분리된 모든 균주는 설향 품종에 병원성을 보였다. Prochloraz는 DNA lineage 2에 속하는 Fo080701균주를 제외하곤 시들음병균의 EC₅₀값이 0.02–0.1 μ g/ml로 낮은 농도에서 효과적으로 균사 생장을 억제하였다. Metconazole의 EC₅₀값도 0.04–0.22 μ g/ml로 prochloraz와 비슷한 억제 효과를 보였다. Pyraclostrobin의 EC₅₀값은 0.23–168.01 μ g/ml로 균주에 따라 차이가 컸다. 딸기 재배포장에서 boscalid+fludioxonil, fluxapyroxad+pyraclostrobin, prochloraz manganese이 딸기 시들음병 방제에 효과적이었다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of Cooperate Research Program for Agricultural Science & Technology Development Rural Development Administration, Korea (PJ01188604).

Electronic Supplementary Material

Supplementary materials are available at Research in Plant Disease website (<http://www.online-rpd.org/>).

References

- Amini, J. and Sidovich, D. F. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.* 50: 172-178.
- Arntzen, C. J., Linck, A. J. and Cunningham, W. P. 1970. The effects of 3-amino-s-triazole on flax root apices. *Bot. Gaz.* 131: 14-23.
- Arroyo, F. T., Llergo, Y., Aguado, A. and Romero, F. 2009. First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry in Spain. *Plant Dis.* 93: 323.
- Avenot, H., Morgan, D. P. and Michailides, T. J. 2008. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. *Plant Pathol.* 57: 135-140.
- Burkhardt, A., Henry, P. M., Koike, S. T., Gordon, T. R. and Martin, F. 2019. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* from infected strawberry plants. *Plant Dis.* 103: 1006-1013.
- Burlakoti, P., Rivera, V. V., Burlakoti, R. R., Nelson, R., Adhikari, T. B., Secor, G. A. et al. 2010. Baseline sensitivity of Fusarium species associated with Fusarium diseases to metconazole, triticonazole, and thiabendazole fungicides. *J. Sugar Beet Res.* 47: 23-34.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Castro-Franco, J. and Davalos-Gonzalez, P. A. 1990. Aetiology of «Secadera» or root and top rot of strawberries in Irapuato, Gto. *Rev. Mex. Fitopatol.* 8: 80-86. (In Spanish)
- Cho, C. T. and Moon, B. J. 1985. Chemical control of Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Korean J. Plant Pathol.* 1: 28-32. (In Korean)
- Cruz Jimenez, D. R., Ellis, M. L., Munkvold, G. P. and Leandro, L. F. S. 2018. Isolate-cultivar interactions, *in vitro* growth, and fungicide sensitivity of *Fusarium oxysporum* isolates causing seedling disease on soybean. *Plant Dis.* 102: 1928-1937.
- Dinler, H., Benlioglu, S. and Benlioglu, K. 2016. Occurrence of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on strawberry transplants in Aydin province in Turkey. *Australas. Plant Dis. Notes* 11: 10.
- Golzar, H., Phillips, D. and Mack, S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. *Australas. Plant Dis. Notes* 2: 145-147.
- Henry, P. M., Kirkpatrick, S. C., Islas, C. M., Pastrana, A. M., Yoshisato, J. A., Koike, S. T. et al. 2017. The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, cause of Fusarium wilt of strawberry, in California. *Plant Dis.* 101: 550-556.

- Hong, S. W., Kim, D.-R., Kim, J. S., Cho, G., Jeon, C. W. and Kwak, Y.-S. 2018. Development qRT-PCR protocol to predict strawberry *Fusarium* wilt occurrence. *Plant Pathol. J.* 34: 163-170.
- Huang, Y., Zhen, W., Zhang, L., Zhang, G., Tian, L., Cheng, H. et al. 2005. Separation of causal organisms and biocontrol of strawberry (*Fragaria ananassa* Dach) replant disease. *Biotechnology* 15: 74-76.
- Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772-780.
- Kim, C. H., Seo, H. D., Cho, W. D. and Kim, S. B. 1982. Studies on varietal resistance and chemical control to the wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum*. *Korean J. Plant Prot.* 21: 61-67. (In Korean)
- Kim, D.-R., Gang, G.-H., Cho, H.-J., Yoon, H.-S. and Kwak, Y.-S. 2015. Evaluation of antimicrobial activity and disease control efficacy of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) against major strawberry diseases. *Korean J. Pestic. Sci.* 19: 47-53. (In Korean)
- Kim, J.-S., Kang, N. J., Kwak, Y.-S. and Lee, C. 2017. Investigation of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using PCR-RFLP. *Plant Pathol. J.* 33: 140-147.
- Kim, J. T., Min, J. Y. and Kim, H. T. 2006. Response to fungicides of *Colletotrichum* species isolated from infected tissues of several crops. *Res. Plant Dis.* 12: 32-39. (In Korean)
- Kim, S., Min, J. and Kim, H. T. 2019. Occurrence and mechanism of fungicide resistance in *Colletotrichum acutatum* causing pepper anthracnose against pyraclostrobin. *Korean J. Pestic. Sci.* 23: 202-211. (In Korean)
- Kim, Y. K. and Xiao, C. L. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Dis.* 94: 604-612.
- Kodama, T. 1974. Characteristics of strawberry yellows disease caused by *Fusarium* and cultivar resistance. *Bull. Nara Agric. Exp. Stn.* 6: 68-75. (In Japanese)
- Koike, S. and Gordon, T. R. 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Prot.* 73: 67-72.
- Koike, S. T., Kirkpatrick, S. C. and Gordon, T. R. 2009. *Fusarium* wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Dis.* 93: 1077.
- Kwon, S. K., Jeon, C.-W., Nam, M. H. and Kwak, Y.-S. 2020. Evaluation of fungicides sensitivities of strawberry wilt disease pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Korean J. Pestic. Sci.* 24: 34-42. (In Korean)
- Li, Y., Mao, L., Yan, D., Ma, T., Shen, J., Guo, M. et al. 2014. Quantification of *Fusarium oxysporum* in fumigated soils by a newly developed real-time PCR assay to assess the efficacy of fumigants for *Fusarium* wilt disease in strawberry plants. *Pest Manag. Sci.* 70: 1669-1675.
- Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A. F. and Moretti, A. 2019. *In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins* 11: 11.
- Miller, N. F., Standish, J. R. and Quesada-Ocampo, L. M. 2020. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and pydiflumetofen *in vitro* and efficacy for *Fusarium* wilt management in watermelon. *Plant Health Prog.* 21: 13-18.
- Nam, M. H., Jung, S. K., Kim, N. G., Yoo, S. J. and Kim, H. G. 2005. Resistance analysis of cultivars and occurrence survey of *Fusarium* wilt on strawberry. *Res. Plant Dis.* 11: 35-38. (In Korean)
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 193 pp.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A. et al. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 46: 936-948.
- Okamoto, H., Fujii, S., Kato, K. and Yoshida, A. 1970. A new strawberry disease *Fusarium* wilt. *Plant Prot.* 24: 231-235. (In Japanese)
- Park, M. S., Seo, G. S., Bae, K. S. and Yu, S. H. 2005. Characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom by PCR-RFLP and sequence analysis of ITS regions of rDNA. *Plant Pathol. J.* 21: 229-236.
- Pastrana, A. M., Basallote-Ureba, M. J., Aguado, A. and Capote, N. 2017. Potential inoculum sources and incidence of strawberry soilborne pathogens in Spain. *Plant Dis.* 101: 751-760.
- Paynter, M. L., Czislawski, E., Herrington, M. E. and Aitken, E. A. B. 2016. Differences in pathogenicity, genetic variability and cultivar responses among isolates of *Fusarium oxysporum* from strawberry in Australia. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 141: 645-652.
- Petkar, A., Langston, D. B., Buck, J. W., Stevenson, K. L. and Ji, P. 2017. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. *Plant Dis.* 101: 366-371.
- Shin, J. H., Han, J. H. and Kim, K. S. 2018. Isolation of *Asparagus* crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* and evaluation of fungicides for disease control. *J. Agric. Life Environ. Sci.* 30: 152-160. (In Korean)
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stanković, I., Ristić, D., Vučurović, A., Milojević, K., Nikolić, D., Krstić, B. et al. 2014. First report of *Fusarium* wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in Serbia. *Plant Dis.* 98: 1435.
- Suga, H., Hirayama, Y., Morishima, M., Suzuki, T., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant Dis.* 97: 619-625.
- 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. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Williamson, M., Fernández-Ortuño, D. and Schnabel, G. 2012. First report of *Fusarium* wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in South Carolina. *Plant Dis.* 96: 911.
- Winks, B. L. and Williams, Y. N. 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Queensland J. Agric. Anim. Sci.* 22: 475-479.