

RAPD 및 약제저항성을 이용한 감귤 검은점무늬병균의 유전적 다양성 분석

고영진* · 서정규 · 이태선 · 송장훈¹ · 권혁모¹ · 문덕영¹ · 문두길² · 한해룡²
순천대학교 응용생물원예학부, ¹농촌진흥청 제주감귤연구소, ²제주대학교 원예생명과학부

Genetic Diversity of *Phomopsis citri* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Fungicide Resistance

Young Jin Koh*, Jeong Kyu Seo, Tae Sun Lee, Jang Hoon Song¹, Hyeog-Mo Kwon¹, Duck Young Moon¹, Doo-Khil Moon² and Hae-Ryong Han²

Faculty of Applied Biology and Horticulture,
Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹Cheju Citrus Research Institute, RDA, Cheju 699-807, Korea

²Faculty of Horticultural Life Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

ABSTRACT: Genetic diversity of 42 isolates of *Phomopsis citri* was analyzed with random amplified polymorphic DNA(RAPD) and fungicide resistance. RAPD profiles of genomic DNA of the isolates of *P. citri* and the degrees of their resistance to the fungicides mancozeb and propineb suggested the occurrence of genetic differentiation of *P. citri* distributed in Cheju. The isolates showed genetically diverse RAPD profiles according to the host species collected even from the same collection site and also according to the geographic origin collected even from the same host species. High levels of resistance to fungicides mancozeb and propineb were observed among the isolates of *P. citri*. However, there was no correlation between RAPD profiles of genomic DNA and levels of fungicide resistance of the isolates, suggesting that fungicide resistance of *P. citri* occurred irrespective of the host and geographic origin.

Key words : citrus, *Phomopsis citri*, RAPD, fungicide resistance, genetic diversity.

우리나라에서 감귤류가 주로 재배 생산되고 있는 제주도의 온난하고 다습한 아열대 기후적인 특성은 작물 생육 뿐만 아니라 각종 병해가 월동하고 발생하기에도 적합하여 해마다 각종 병해에 의한 피해가 발생하는 것으로 알려졌는데, 지금까지 19종의 병해가 발생하는 것으로 보고되었다(2, 8). 그 중 감귤에 가장 심한 피해를 주는 병해는 검은점무늬병으로 무방제구인 경우 피해과율이 95% 이상인 것으로 조사되었다(5).

감귤 검은점무늬병은 병자각내에 α 포자와 β 포자를 형성하는 *Phomopsis citri*에 의해 발생하는 병으로 잎, 가지, 과실 등에 발생하여 피해를 주지만 가장 문제가 되는 것은 과실의 피해이다. 특히 과실의 생육기인 6월부터 8월까지 강우가 많은 제주도에서는 검은점무늬병의 발병으로 과실의 외관을 현저하게 손상시켜 상품성을 저하시키는 등 피해가 크다. 그러나, 우리나라에서 감귤 검은점무늬병에 관한 연구는 아직 미약한 실정이다(4, 6).

감귤 검은점무늬병의 세계적인 만연에 따라 살균제의

살포량과 살포횟수가 꾸준히 증가해 왔다(3, 11). 살균제를 비롯한 농약사용의 증가는 농업생태계에 대한 잔류독성 문제 뿐만 아니라 약제 저항성균의 출현과 약제를 살포하는 재배자 뿐만 아니라 감귤을 소비하는 사람에게 까지도 심각한 보건상의 문제를 제기하고 있어서 식물병 방제에도 농약 사용을 절감하려는 노력이 세계적으로 경주되고 있다(1, 11). 따라서, 감귤 검은점무늬병을 효율적으로 방제하기 위해서는 검은점무늬병균의 유전적 특성과 함께 약제저항성균의 발생실태를 파악함으로써 감귤 검은점무늬병 저항성 및 살균제 개발 연구를 위한 병리학적 기초자료로 확보하는 것이 시급한 실정이다.

본 연구는 감귤류에 경제적으로 가장 큰 피해를 주는 것으로 조사된 검은점무늬병을 일으키는 *P. citri*의 주요 약제에 대한 저항성균의 발생실태와 random amplified polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 병원균 집단의 유전적 특성을 파악함으로써 농약 사용을 절감할 수 있는 환경보전적인 감귤 병해에 대한 효율적인 관리체계를 수립하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

*Corresponding author.

재료 및 방법

공시 균주. 1996년 여름부터 겨울까지 제주도 남제주군 남원읍 소재 제주감귤연구소 품종보존구, 남원읍 신예리와 성산읍 성산리 감귤 포장, 서귀포시 서홍동과 보목동 감귤 포장 및 제주시 아라동 감귤 포장 등 제주도의 주요 감귤 재배지에서 재배되고 있는 각종 감귤나무로부터

터 직경 5~10 mm 정도의 고사지를 채집한 후 4~5 cm 길이로 절단하여 filter paper 3~4매를 깔고 살균수로 충분히 적신 petri dish에 치상하여 습실처리한 후 25°C의 항온기에서 3~7일간 배양하면서 포자피의 형성을 유도시켰다. 포자피로부터 *P. citri* 분생포자퇴를 감자한천배지(PSA, potato sucrose agar)에 이식하여 25°C의 항온기에서 배양하면서 형성된 균총말단부위(hyphal tip)를

Table 1. List of isolates of *Phomopsis citri* collected from citrus trees in Cheju, 1996

Code	Isolate	Host		Geographic origin ^a
		Scientific name	Korean name	
1	CUSS1	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	C
2	PSHY1	<i>Citrus hassaku</i>	팔삭	A
3	ICHY1	<i>Citrus</i> sp.	인창굴	A
4	SBHY1	<i>Citrus sulcata</i>	삼보감	A
5	CUSH	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	D
6	JMHY	<i>Citrus aurantium</i>	중문실생	A
7	JSHY1	<i>Fortunella margarita</i>	장실금감	A
8	DWHY	<i>Citrus unshiu</i> var. <i>zabara</i>	다원	A
9	CGHY	<i>Citrus sinensis</i> var. <i>seike</i>	청가	A
10	JGHY1	<i>Citrus arantium</i>	지각	A
11	GJHY1	<i>Citrus</i> sp.	길전	A
12	CLHY1	<i>Citrus limon</i>	제주레몬	A
13	CUSY1	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	B
14	BGHY1	<i>Citrus platimamma</i>	병굴	A
15	PSHY2	<i>Citrus hassaku</i>	팔삭	A
16	HPHY1	<i>Citrus hassaku</i> var. <i>benihassaku</i>	홍팔삭	A
17	CUBM1	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	E
18	CLHY2	<i>Citrus limon</i>	제주레몬	A
19	ICHY2	<i>Citrus</i> sp.	인창굴	A
20	ICHY3	<i>Citrus</i> sp.	인창굴	A
21	SBHY2	<i>Citrus sulcata</i>	삼보감	A
22	SBHY3	<i>Citrus sulcata</i>	삼보감	A
23	SBHY4	<i>Citrus sulcata</i>	삼보감	A
24	BGHY2	<i>Citrus platimamma</i>	병굴	A
25	BGHY3	<i>Citrus platimamma</i>	병굴	A
26	JSHY2	<i>Fortunella margarita</i>	장실금감	A
27	CUSY2	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	B
28	JGHY2	<i>Citrus aurantium</i>	지각	A
29	YZHY1	<i>Citrus junos</i>	유자	A
30	YZHY2	<i>Citrus junos</i>	유자	A
31	YZHY3	<i>Citrus junos</i>	유자	A
32	GGHY	<i>Citrus obovoidea</i>	금감자	A
33	YZHY4	<i>Citrus junos</i>	유자	A
34	JSHY3	<i>Fortunella margarita</i>	장실금감	A
35	YZHY5	<i>Citrus junos</i>	유자	A
36	CUAR1	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	F
37	CUAR2	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	F
38	CUSS2	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	C
39	CUSY3	<i>Citrus unshiu</i>	온주밀감	B
40	GJHY2	<i>Citrus</i> sp.	길전	A
41	HPHY2	<i>Citrus hassaku</i> var. <i>benihassaku</i>	홍팔삭	A
42	YZHY6	<i>Citrus junos</i>	유자	A

^aA : Cheju Citrus Research Institute, Namwon-eup, Namcheju-goon ; B : Sinye-ri, Namwon-eup, Namcheju-goon ; C : Songsan-ri, Songsan-eup, Namcheju-goon ; D : Sohong-dong, Seowgipo-si ; E : Bomok-dong, Seowgipo-si ; F : Ara-dong, Cheju-si, Cheju-do, Korea

새로운 PSA에 이식하여 균주를 확보하였으며, 단일 포자괴로부터 단일 균주만을 분리하여 총 42균주를 실험재료로 사용하였다(Table 1).

DNA의 추출 및 정제. PD broth(potato 200 g, dextrose 20 g, 증류수 1,000 ml) 50 ml에서 2주간 27°C 조건에서 정체배양시킨 균체는 cheese cloth에 싸서 깔대기에 위에 넣고 증류수 3,000 ml 정도를 부은 후 물기를 제거시켰으며, falcon tube에 넣어 하루동안 freeze dry시킨 뒤 liquid nitrogen을 넣고 막자사발로 갈아 sample를 준비하였다. DNA추출을 위해 준비된 sample 중 0.04 g을 microtube에 담은 후 lysis buffer를 750 µl를 넣고 그위에 동일양의 phenol을 첨가하고 vortex하여 15,000 rpm에서 5분동안 원심분리한 후 상층을 취해 새로운 microtube에 담고 phenol을 반복처리한 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 넣고 잘 흔들어 준 다음 15,000 rpm에서 5분동안 원심분리시켜서 상층액을 뽑아 내었다. 분리된 상층에 sodium acetate 20 µl와 isopropanol 1 ml를 넣고 15,000 rpm에 5분동안 원심분리하여 microtube 밑부분에 pellet이 생기면 조심스럽게 물층을 따른 후 vacuum dryer에서 20~30분동안 말리고 TE buffer(pH 8.0) 500 µl를 넣고 DNA를 녹였다. 다시 RNase를 30 µl(250 unit/ml)을 첨가하여 살짝 tapping한 후 37°C에서 1시간 보관하였다. 그 후에는 phenol, phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1), chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 용액들을 순서대로 처리한 후 각각 15,000 rpm에서 5분 동안 반복하며 원심분리시켰다. 회수된 상층액에 100% ethanol을 1 ml 넣고 10,000 rpm에서 2분 동안 원심분리시켰다. 이 때 남은 pellet을 1 ml의 70% 냉 ethanol로 세척하고 원심분리하여 pellet만 남기고 용액을 버리고, 남은 pellet은

vacuum dryer에서 20-30분 정도 말린 다음 멸균수에 녹여 4°C에서 보관하여 사용하였다.

DNA 증폭. DNA 증폭을 위한 random primer는 Operon사의 10-base Oligonucleotide Primer kit A와 Wako사의 12-base Oligonucleotide Primer kit A와 kit C를 이용하였다(Table 2). PCR 증폭은 5 ng/µl의 genomic DNA template와 7.5 ng의 primer, 0.4 U의 *Taq* polymerase, 1 µl의 10×reaction buffer, 2.0 mM dNTP(dCTP, dATP, dGTP, dTTP)를 혼합하여 제조한 총 10 µl의 reaction mixture를 0.2 ml PCR용 thin-wall tube에 넣어 Williams 등(13)이 제시한 방법에 의해 수행하였다. PCR 증폭조건은 94°C에서 30초간 denaturation과 36°C에서 60초간 annealing, 72°C에서 90초간 extension의 단계를 거치는 조건으로 45 cycle 반복실행하였으며, 처음 denaturation 시간은 94°C에서 2분간, 마지막 extension시간은 72°C에서 5분간 연장시킨 후 4°C에 자동 저장되는 프로그램에 의해 수행하였다. PCR산물은 TBE buffer에서 1.6% agarose gel을 이용하여 2시간 정도 전기영동으로 전개하였고 0.5 µg/ml의 ethidium bromide에서 40분 동안 염색하고 1 M의 MgCl₂에서 1시간 수세한 후 UV transilluminator에서 667type Polaroid film을 이용하여 사진을 찍었다. PCR 산물의 분자량은 1 kb DNA ladder를 이용하여 추정하였다.

RAPD 분석. PCR을 이용하여 얻은 RAPD의 data를 분석하기 위해 전기영동상의 band 유무(1 또는 0)에 따른 binomial data matrix를 NTSYS-pc, version 1.80을 이용하여 분석하였다(7). Jaccard's formula에 따라 산출된 유사계수의 값을 토대로 UPGMA clustering program에 의해 dendrogram을 작성하였다(9, 10).

약제저항성 조사. 감귤 검은점무늬병 방제약제로 농

Table 2. Nucleotide sequence of the 12 primers used for RAPD analysis, with total number of amplified DNA fragments and size of polymorphic DNA fragments produced by each primer

Code	Nucleotide sequence (5' to 3')	No. of amplified fragments	Size of fragments (bp)	Remark
OPA-03	AGT CAG CCA C	11	675~3,000	Operon Tch. Inc.
OPA-10	GTG ATC GCA G	12	500~3,000	Operon Tch. Inc.
A-01	TGC ACT ACA ACA	24	400~4,000	Wako Co.
A-06	GCC AGC TGT ACG	14	600~2,750	Wako Co.
A-07	TGC CTC GCA CCA	10	650~2,300	Wako Co.
A-08	GCC CCG TTA GCA	18	300~2,600	Wako Co.
A-25	CTC AGC GAT ACG	16	360~4,000	Wako Co.
A-30	GAC CTG CGA TCT	11	850~4,000	Wako Co.
A-41	GTG ACC GAT CCA	16	600~2,700	Wako Co.
A-43	AAG TGG TGG TAT	13	580~4,000	Wako Co.
A-44	GAC GGT TCA AGC	11	650~2,400	Wako Co.
C-31	TCT GCT GAC CGG	18	625~1,700	Wako Co.
Total		174		

가에서 많이 사용되고 있는 만코지수화제(mancozeb, 75% wp), 프로피수화제(propineb, 70% wp) 등 2종의 약제를 약제저항성 검정에 공시하였다. 각 약제별로 0, 1, 5, 25, 125, 625, 3,125 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 약제가 들어 있는 PSA plate의 중앙에 10일정도 배양한 신선한 균총의 가장자리에서 cork borer를 사용하여 떼어낸 직경 5 mm 크기의 균총 disk를 치상하여 25°C의 항온기에서 7일간 배양하였다. 각 농도에서 균주별 균사의 생육 유무를 조사하여 각 약제별 균사생장 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)를 산출하였다.

결과 및 고찰

감굴 검은점무늬병균의 유전적 분화. 감굴 검은점무늬병균 genomic DNA의 RAPD 분석에 공시한 80개의 primer들 중에서 DNA절편이 가장 뚜렷하고 재현성이 강한 RAPD pattern을 나타내는 대표적인 12개의 primer를 RAPD profile 분석에 사용하였다. DNA template, primer, dNTP 등의 농도는 명확한 band pattern을 나타내도록 초기실험을 통하여 조정하였으며, 모든 실험은 최소 2회 반복실험을 실시하여 결과를 분석하였다.

공시한 primer들은 모두 감굴 검은점무늬병균 균주들을 분류하는데 유용한 polymorphism을 나타내었다. 12개 primer에 의해 생성된 fragment는 각 primer당 10~24개의 genomic DNA fragment를 형성하였고, 총 174개의 genomic DNA fragment를 형성하였다(Table

2). 174개의 증폭된 genomic DNA fragment의 크기는 약 0.3~4.0 kb였다. 공시한 primer 중 대표적인 primer(A07, A25, A44)에 대한 감굴 검은점무늬병균 42개 균주들의 genomic DNA의 대표적인 RAPD pattern은 Fig. 1과 같다.

모든 균주들의 전기영동에서 band유무에 따라 NTSYS-pc의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 감굴 검은점무늬병균 42균주들 모두 다양한 유전적 분화를 나타내었으며 균주들간에는 65% 정도의 상동성만을 나타내었다. 이러한 genomic DNA의 RAPD profile은 비록 제주도라는 작은 지역내에서도 지역과 기주의 종에 따라 분리된 감굴 검은점무늬병균 균주들에서 유전적 분화가 다양하게 발생하고 있음을 나타낸다.

또한 지역 또는 기주 별 감굴 검은점무늬병균의 유전적 분화를 비교 조사하기 위하여 같은 지역내의 같은 종의 기주에서 분리한 균주(남제주군 남원읍 하에리 소재 제주감귤연구소 품종보존구 내의 유자에서 분리한 6균주), 같은 지역내의 다른 종의 기주에서 분리한 균주(제주감귤연구소 품종보존구 내의 각각 다른 감귤류에서 분리한 14균주) 및 같은 종의 기주지만 다른 지역에서 분리한 균주(각기 다른 지역의 온주밀감에서 분리한 9균주)들간의 유전적 근연관계를 dendrogram을 통하여 분석하였다.

제주감귤연구소 품종보존구 내의 유자에서 분리한 균주들은 83.6%의 근연관계를 나타낸 반면에, 제주감귤연구소 품종보존구 내의 각기 다른 기주에서 분리한 균주들

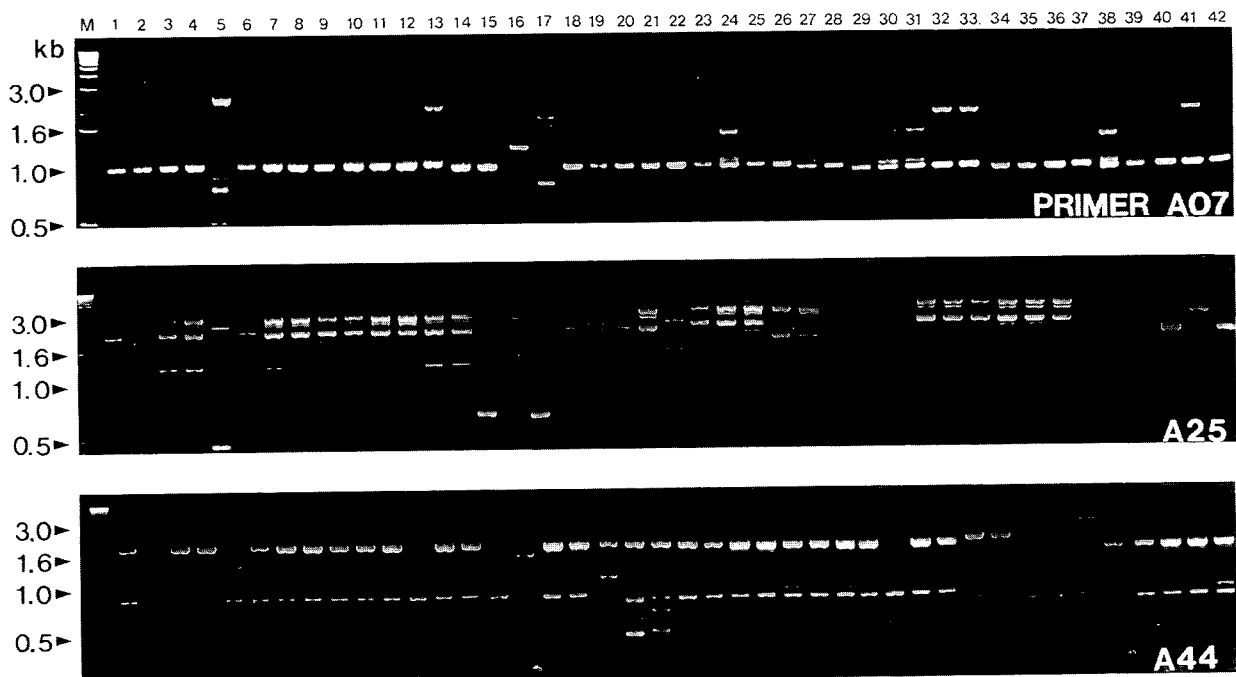


Fig. 1. Random amplified DNA polymorphisms of the 42 isolates of *Phomopsis citri* generated 3 representative primers. Lanes marked 1 to 42 are isolates listed in Table 1. M indicates molecular marker of 1 kb DNA ladder.

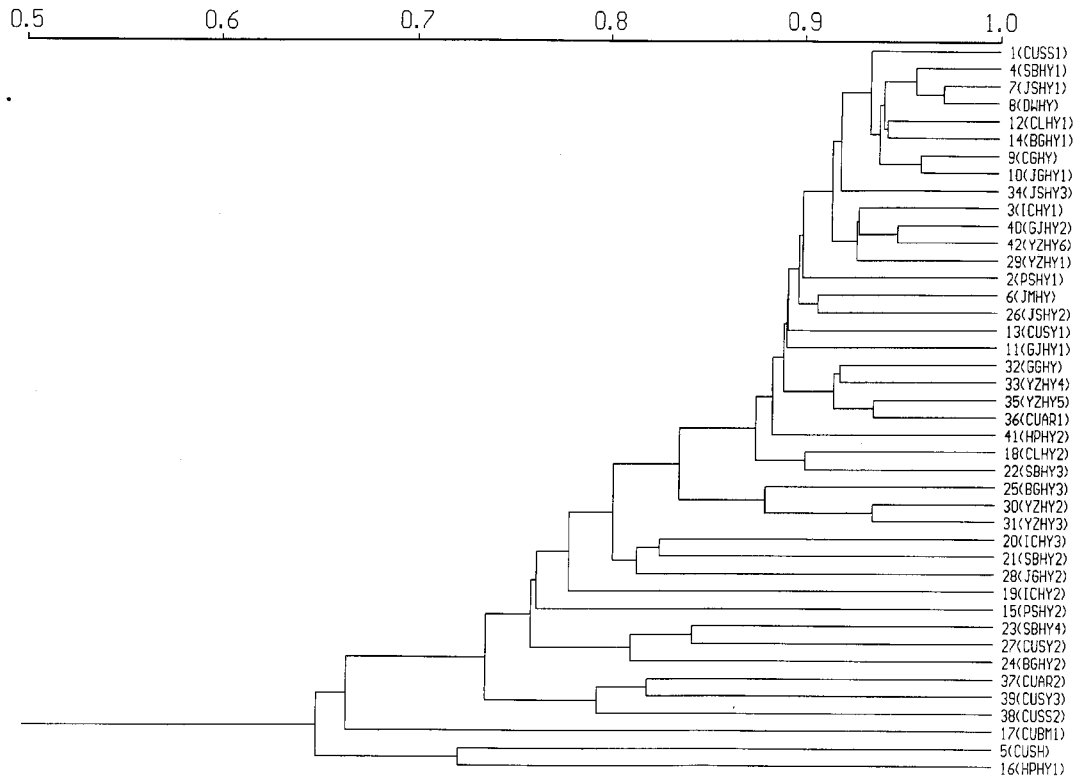


Fig. 2. UPGMA dendrogram derived from the RAPD profiles of genomic DNA in the 42 isolates of *Phomopsis citri* with 12 random primers.

간에는 64%의 상동성만을 나타내어 동일한 지역에서도 기주의 종에 따라 분리균주들간에 유전적 분화가 발생했음을 시사해준다. 또한 각기 다른 지역의 온주밀감에서 분리한 균주들간에도 65%의 상동성만을 나타내어, 기주의 종이 동일하다고 할지라도 지역에 따라 분리균주들간에 유전적 분화가 보다 다양하게 발생했음을 시사해준다.

감귤 검은점무늬병 약제저항성균 발생실태. 공시한 균주들의 균사생장 최소억제농도(MIC)를 조사하였을 때 만코지수화제에 대해서는 MIC가 1~625 µg/ml 범위

였으며, 프로피수화제에 대해서는 MIC가 1~3,125 µg/ml 범위에 속하는 것으로 조사되었다. 따라서 공시한 만코지수화제와 프로피수화제에 대한 각 균주별 MIC를 기준으로 하여 공시 균주들의 약제저항성 수준을 분류하였을 때 8개 집단으로 구분할 수 있었다(Table 3).

공시 균주중에서 만코지수화제와 프로피수화제에 대한 MIC가 모두 1 µg/ml 이하인 균주는 검출되지 않았다. 전체 균주들 중에서 42.9%를 차지하는 우점 집단은 만코지수화제 및 프로피수화제에 대한 MIC가 각각

Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of *Phomopsis citri* populations collected from citrus trees to mancozeb and propineb

Group	No. of isolates	Percentage	MIC (µg/ml)		Remark (Isolate code*)
			Mancozeb	Propineb	
I	13	31.0	1~ 25	1~ 25	1~3, 5~8, 10, 12~14, 30, 36
II	2	4.8	1~ 25	25~ 125	9, 39
III	2	4.8	25~125	1~ 25	4, 41
IV	3	7.1	25~125	25~ 125	11, 15, 28
V	2	4.8	25~125	125~ 625	18, 35
VI	1	2.4	25~125	625~3,125	32
VII	1	2.4	125~625	25~ 125	17
VIII	18	42.9	125~625	125~ 625	16, 19~27, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 40, 42
Total	42	100			

*Isolate codes are listed in Table 1.

125~625 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 인 집단인 것으로 밝혀져 각 균주들의 약제저항성 수준은 상당히 발달해 있는 것으로 확인되었다. 이것은 이러한 약제들이 제주도에서 재배되고 있는 감귤원에서 다년간 많이 사용되어온 살균제라는 사실과 무관하지 않으며 효율적인 검은점무늬병 방제를 위해서는 추후 보다 광범위한 균주 수집과 보충 시험을 통하여 약제저항성 발생 기작에 대한 구명이 있어야 할 것으로 전망된다.

그러나, 약제저항성 발달정도는 기주나 채집 장소 등과는 일정한 상관을 나타내지 않았다. 이것은 감귤 검은점무늬병균의 약제저항성이 병원균 개체 수준에서 발생함을 시사해 주며, 기주나 채집 장소 즉 재배 감귤원과는 상관없이 발생하고 있음을 시사해 준다. 따라서, 감귤이 재배되고 있는 제주도 전역에서 약제저항성균이 발생하고 있으므로 감귤 검은점무늬병을 효율적으로 방제하기 위해서는 이에 대한 적절한 대책이 강구되어야 할 것이다.

본 실험에서 감귤 검은점무늬병균의 약제저항성 정도와 RAPD 사이에는 일정한 연관성을 찾을 수는 없었다. 이것은 random primer를 사용했기 때문에 나타나는 한계로 추정되며 약제저항성과의 연관성을 찾기 위해서는 RAPD를 보완할 수 있는 RFLP 등 다른 marker의 활용을 검토할 수 있다. 그러나, 본 실험에서 얻은 다양한 RAPD pattern과 약제저항성 수준은 감귤 검은점무늬병균의 집단내에 존재하는 유전적 다양성을 나타내어 감귤 검은점무늬병에 대한 저항성 품종의 육성이나 신규 살균제 개발 연구에서 감귤 검은점무늬병균의 유전적 변이를 충분히 고려해야 소기의 성과를 얻을 수 있음을 시사해준다.

요 약

우리나라 감귤 검은점무늬병균 42균주에 대한 유전적 다양성을 random amplified polymorphic DNA(RAPD)와 약제저항성을 이용하여 분석하였다. 감귤 검은점무늬병균 genomic DNA의 RAPD profile과 만코지수화제 및 프로파수화제에 대한 약제저항성 정도는 제주도에 분포하는 감귤 검은점무늬병균 균주 사이에 다양한 유전적 분화가 발생했음을 시사해준다. 균주들은 동일한 지역에서도 분리된 기주종에 따라 유전적으로 다양한 RAPD profile을 나타내었으며, 기주가 동일하다고 할지라도 지역에 따라 분리균주들간에 다양한 RAPD profile을 나타

내었다. 감귤 검은점무늬병균 균주의 약제저항성 정도와 RAPD 사이에는 일정한 연관성을 찾을 수는 없었다. 공시한 감귤 검은점무늬병균 균주들에서 만코지수화제 및 프로파수화제에 대해 높은 수준의 약제저항성이 관찰되었지만, RAPD profile과 약제저항성 수준 사이에는 상관이 없었으며, 약제저항성은 기주나 채집 장소와는 상관없이 감귤이 재배되고 있는 제주도 전역에서 약제저항성균이 발생하고 있었다.

감사의 글

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(농업과학: 농-95-23)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Dekker, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annu. Rev. Plant Pathol.* 14: 405-420.
2. 한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명목록. 436pp.
3. 井上一男, 擇拙夫. 1975. 칸킥트黑點病의防除藥劑의殘效について. *日植病報* 41: 305-306.
4. 김창원. 1979. 감귤 주요병해 발병소장 조사. 제주시험장 시험연구보고서. pp.125-149.
5. 고영진, 송장훈, 권혁모, 문덕영, 문두길, 한해룡. 1996. 우리나라 감귤 주요 병의 최근 발생 동향. *한국식물병리학회지*. 12(4): 466-470.
6. 권혁모. 1996. 감귤 검은점무늬병의 병원, 발생 생태 및 약제 방제에 관한 연구. 제주대학교 박사학위논문. 79pp.
7. Rohlf, F. J. 1993. *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system*. State Univ. of New York, Stony Brook.
8. 유화영, 이영희, 조원대, 김완규, 명인식, 진경식. 1993. 과수병해원색도감. 농촌진흥청 농업기술연구소. 286pp.
9. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. 573pp.
10. Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. 359pp.
11. Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant Disease* 68: 1026-1031.
12. Whiteside, J. O. 1980. Timing of fungicide spray treatments for citrus melanose control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93: 21-24.
13. Williams, J. B. K., Kubelick, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

(Received March 7, 1998)