

AFLP를 이용한 단감나무 탄저병 병원균 *Colletotrichum* spp.의 유연관계 분석

김희종 · 정봉구¹ · 이윤수*

¹강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, ²충북대학교 농과대학 농생물학과

Analysis of genetic relationships of *Colletotrichum* spp. isolated from sweet persimon with AFLP

Hee Jong Kim, B. K. Chung¹ and Youn Su Lee*

Kangwon National University, College of Agriculture and Life Sciences, Division of Applied Plant Sciences, Chuncheon, Korea,
¹Chungbuk National University, College of Agriculture, Department of Agricultural Biology, Chungju, Korea

ABSTRACT: *Colletotrichum* species are important fungal pathogens that cause great damages on various host plant species worldwide. In Korea, *Colletotrichum* species cause massive economic losses on apple, peach, grape, and especially, sweet persimon productions. In the past, identification of the pathogen and the studies on the genetic relationships among the pathogenic isolates were mainly based on morphology, cultural characteristics, and the difference in pathogenicity. However, in recent years, these traditional methods have been replaced with molecular methods including AFLP. AFLP method with the merits of both RAPD and RFLP has been widely used for the genetic relationship studies of various organisms. Therefore, in this study, AFLP method was employed for the studies of genetic relationships among the different isolates of *Colletotrichum* species collected from various parts of sothern Korea. As a result, two specific band pattern groups were observed among different isolates of *Colletotrichum* species.

KEYWORDS: *Colletotrichum* spp, AFLP, Sweet persimon

1980년에 2,700ha에 불과했던 국내의 단감나무 재배는 단감의 특유한 맛과 농가의 수익성 보장 등으로 인하여 98년 현재 국내 단감의 재배면적은 23,500ha, 생산량은 208,900M/T으로서 급격히 늘고 있는 실정이다(Williams 등, 1990; 장 등, 1998). 주요 단감 품종으로 부유, 서촌, 대안 등이 재배되고 있으며, 이중 부유 품종이 전체의 81.5%를 점유하고 있다. 단감나무 재배면적의 지속적인 증가와 단일 품종의 편중 등의 원인으로 1990년부터 주요 재배지인 경상남·북도와 전라도에 걸쳐 이제까지 문제시 되지 않았던 *Colletotrichum* spp.에 의한 단감나무 탄저병이 빈발하고 있다. 이 병원균은 감나무를 비롯하여 넓은 기주범위를 가지고 있고, 이로 인한 과실의 생육저하와 수세의 악화 및 이듬해의 개화에 심한 악영향을 끼쳐 재배상의 문제점으로 등장하고 있다(Agrios, 1998; Vaillancourt and Hanau, 1992). 탄저병은 주로 잎, 줄기, 또는 과실에 발생하는데 짙은색의 점무늬를 형성하거나 가장자리가 약간 융기되고 안쪽은 나소 들어간 특징적인 병반을 형성하고 단감나무 탄저병의 경우 이들 병원균에 의해 낙과 및 과실부패를 일으킨다(Agostini 등, 1992; Gunnell and Gubler, 1992).

최근에는 PCR등의 분자생물학적인 기법이 발달함에 따

라 병원균 분리동정이 가능하게 되었고 이를 이용하여 유연 관계 분석시 고전적인 여러 가지 분리보다도 정밀한 자료를 제공한다(Choi 등, 1997a, 1997b; Innins and Gelfand, 1990; Mesquita 등, 1998; Sreenivasaprasad 등, 2000). 특히 AFLP기법은 RAPD의 간편성과 RFLP군의 정확성을 겸비한 기법으로 band수가 50-100개로 많은양의 band가 나타나 같은 속간에도 심한 변이를 보이므로 유연 관계 분석에서 각광을 받고 있다(Old and Primrose, 1994; Reineke and Karlovsky, 2000; Rusell 등, 1997).

본 연구에서는 1998년 9월에서 11사이에 이병된 단감나무로부터 순수 분리한 탄저병원균을 1차로 포자의 형태와 군사생장의 차이에 따라 분류시킨 병원균을 사용하여 이들간에 유연관계를 분석하여 단감나무에 피해를 주는 병원균의 유연관계를 탐색하고자 실시하였다.

재료 및 방법

Colletotrichum 균 분리 및 배양

1998년 9월부터 11월 사이에 경주, 경남 창녕, 창원, 밀양 및 김해 등지에서 채집한 이병된 잎과 과실로부터 *Colletotrichum* spp.를 분리하였고 이를 PDA 배지에 치상하여 성장하는 군사 선단 부분을 분리하였다. 분리된 균주 170개 중 배양적 특성에 따라 분리, 대표적인 24균주를 선

*Corresponding author <E-mail: younslee@kangwon.ac.kr>

Table 1. Isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from various locations

Group No.	Isolate No.	Isolate Name
G-1	1	Kyungju 1
	2	Kyungju 2
	3	Kyungju 3
	4	Kyungju 5
	5	Kimhae 10
	6	Changnyung 17
G-1-1	7	Kimhae 11
	8	Kimhae 27
	9	Milyang 18
	10	Milyang 19
	11	Milyang 20
	12	Changwon 3
	13	Changwon 15
	14	Changwon 29
	15	Milyang 11
G-2	16	Kimhae 22
	17	Kyungju 6
	18	Changwon 4
	19	Changwon 8
	20	Changwon 19
	21	Milyang 7
	22	Changwon 27
	23	Changnyung 16
	24	Changnyung

발하였다(Table 1). 분리된 24개 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 7일간 배양한 후, 균사의 선단부위를 절단하여 250 ml의 PDB(Potato Dextrose Broth) 배지에 15일간 배양하였다.

Genomic DNA의 분리

*Colletotrichum*의 genomic DNA는 Choi 등(1997a and Choi 1997b) 방법을 이용하여 추출하였다. 먼저 15일간 배양한 탄저병원균을 광목천으로 각 균주의 균사를 걸러내고 배지 성분을 제거하기 위해 멸균수로 2-3회 세척한 후 균사를 동결 건조하였다. 동결 건조된 균사는 액체질소를 이용하여 마쇄 후 균사 5 g에 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 3% sodium dodecyl sulfate; 1% 2-mercaptoethanol)를 첨가하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였고 0.8% agarose gel상에서 확인하였다(Sambrook 등, 1989).

AFLP

본 실험에서는 genomic DNA 2 µg을 *EcoR* I(BRL, Germany) 5 unit를 첨가하여 37°C에서 12시간동안 절단한 후 2.5배의 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 12시간동안 처리 후, 14,000rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 절단된 DNA를 침전시켰다.

Table 2. Oligonucleotide adaptors and primers used for AFLP analysis

<i>EcoR</i> I-adaptor ^a	CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA
<i>Mse</i> I-adaptor ^a	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
AFLP primer ^b	
<i>EcoR</i> I+0: GACTGCGTAC CAATTC	<i>Mse</i> I+0: GATGAGTCCTGAGTAA
<i>EcoR</i> I+2	<i>Mse</i> I+3
E1 GACTGCGTACCAATTC+AT	M1 GATGAGTCCTGAGTAA+CAG
E2 GACTGCGTACCAATTC+AC	M2 GATGAGTCCTGAGTAA+CAC
E3 GACTGCGTACCAATTC+TA	M3 GATGAGTCCTGAGTAA+CTA
E4 GACTGCGTACCAATTC+TG	M4 GATGAGTCCTGAGTAA+CTT
Primer combinations analyzed in this experiment	
E1/M1 E1/M4	

^a *EcoR* I and *Mse* I adaptors were ligated onto the ends of restriction fragments of template genomic DNAs.

^b *EcoR* I+0 and *Mse* I+0 primers were used in the preamplification of template DNA.

The AFLP fingerprint was generated using pairs of *EcoR* I+2 and *Mse* I+3 primers.

침전된 DNA는 실온에서 충분히 말린 후 *Mse* I(Gibco, USA)을 이용하여 65°C에서 절단 후, 위와 동일한 방법으로 다시 침전시켰다. 침전된 DNA는 멸균된 3차 증류수에 녹인 뒤 5 unit의 T4 DNA ligase(Promega, USA)와 0.5 µM의 *EcoR* I adaptor와 *Mse* I adaptor를 첨가한 후 14°C에서 12시간 ligation시켰다. Ligation 된 DNA는 1:10으로 희석하여 pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다.

Pre-amplification은 adaptor에 상보적인 염기서열을 가진 primer를 이용하여 제한효소로 절단된 DNA의 특정부위의 DNA만 증폭시켰고 PCR 반응조건은 희석된 DNA 5 µ에 1X buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 µM dNTP, 0.5 µM *EcoR* I-0/*Mse* I-1 primer, 1 unit *Taq* DNA polymerase (Dynazyme™)를 첨가하여 Perkin-Elmer thermal cycler에서 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분을 한 주기로 최종 20회 반복하고 반응을 종료하였다. 증폭된 산물은 1:50으로 희석하여 2차 PCR 반응을 수행하기 위한 재료로 사용하였다(Table 2). 2차 PCR 반응의 조건은 pre-amplification한 PCR product를 1:50으로 희석하였고, 희석된 DNA 5 µ에 1X buffer, 200 µM dNTP, 0.5 µM *EcoR* I-2/*Mse* I-3 primer, 1 unit *Taq* DNA polymerase(Dynazyme™)를 첨가하여 최초 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응시킨 후, annealing 온도를 1°C씩 감소시키면서 11주기를 반복한 뒤, 마지막으로 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분을 23회 반복하고 반응을 종료하였다.

최종반응이 끝난 후 PCR산물 6 µ를 취하여 formamide loading dye(95% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% bromo phenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 4 µ와 혼합한 뒤 95°C에서 5분간 가열한 후, 그 중 6 µ를 55°C로 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel

(acrylamide:bisacrylamide, 19:1), 7.5 M urea, 1X TBE에 loading하고 1,800V 80W에서 2시간 30분 동안 전기영동한 다음 silver staining으로 결과를 분석하였다.

유연관계분석

각 균주간의 다형화현상을 수치화하기 위해 전기 영동 상에서 확인된 DNA 단편들은 binominal matrix code(0, 또는 1)를 작성하고 유사도 지수를 선출하였다. 각 균주간의 유사도 matrix를 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)으로 분석하여 각각의 균주를 군집화(clustering)를 하고 이를 토대로 계층도(dendrogram)를 작성하였다. 이러한 작업은 수리분류분석용 프로그램인 NTSYS-pc를 이용하였다(Rohlf, 1992).

결과 및 고찰

Colletotrichum spp.는 광범위한 기주 범위를 갖는 다범성 균으로 특히 과실에 많은 피해를 주어 문제시 되고 있는 중요한 식물병원진균이다. 최근 국내에서 널리 재배되고 있는 단감, 사과 복숭아, 포도 등에 탄저병이 발생하여 많은 경제적 손실을 주고 있다(Mills 등, 1992; Sreenivasaprasad 등, 2000)

탄저병 병원균의 경우 기존에는 주로 형태적 특징이나 배지 상에서의 특성, 기주에 대한 병원성의 차이에 의존하여 분류를 해왔으나 최근에는 병원균의 보다 신속하고 정확한 분류를 위해 분자생물학적인 방법을 이용하고 있다(Wang 등, 1993). 최근에 분자생물학적 방법으로는 RFLP(restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism) 및 rDNA를 이용한 핵산의 차이로 병원균의 분류 및 동정을 많이 하고 있다(Breithwaite 등, 1990; Choi 등, 1997b; Noli 등, 1997). 분자생물학적 기법인 RAPD는 염기의 수가 9~12 mer 정도의 짧은 short oligonucleotide primers를 이용하여 genomic DNA에 무작위로 배열되어 있는 부위를 증폭하는 PCR법의 하나로, 증폭 후 산물을 전기영동 상에서 관찰할 수 있는 방법인데, 이때 나타나는 다형화 현상은 genomic DNA에서 primer 증폭부위의 삽입(insertion), 결실(deletion)등에 의해 나타나게 되는데, 이 방법은 아주 간편하고 빠른 시간 안에 분석 결과를 얻을 수 있어 많은 실험실에서 사용하고 있는 방법이다(Lee 등, 1998; Mackill, 1995; Vakalounakis and Fragkiakakis, 1999; Vilarinhos 등, 1995). 그러나 RAPD의 기법은 재현성이 다소 떨어진다는 단점이 있어 이를 극복하기 위하여 AFLP기법을 사용하게 되었다. AFLP기법은 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 증폭반응을 하면 증폭양상이 단순화되며 bands의 상대적인 강도가 변하여 재현성이 높게 되며 RFLP의 정확성과 RAPD의 간편함을 동시에 수용할 수 있어 편리한 기법으로 각광받고 있다(Dresler-Nurmi 등, 2000; Mackill 등, 1996; Vose 등,

1995). AFLP기법은 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 약 50-100개 정도로 각 개체간 변이가 아주 심하여 marker 개발에 아주 유용하게 사용되고 있으며 AFLP가 어떤 새로운 기원의 식물체 DNA를 fingerprinting 하는데 아주 유용한 도구일 뿐만 아니라 유전분리 집단분석에 매우 유용한 것으로 보고하였다(Dresler-Nurmi 등, 2000; Mackill 등, 1996; Vos 등, 1995).

본 실험에서는 탄저병 병원균의 유연 관계를 밝히고자 최근 가장 각광받고 있는 AFLP기법을 이용하였다. AFLP 분석결과 탄저병원균의 DNA는 1.5 kb-100 bp 사이에서 증폭이 되었으며 40-50개의 band가 증폭되었다(Fig. 1, 2). 형태적인 분류에서는 G-1, G 1-1, G-2로 구분을 하였으나 AFLP분석에서는 크게는 2개의 그룹으로, 작게는 5개의 그룹으로 나뉘어 형태적인 분류와는 조금 상이한 결과를 얻을 수 있었다. 큰 그룹에 속하는 균주는 경주1, 경주3, 창원15, 경주2, 김해10, 창녕17, 김해11, 밀양1, 창원3, 창원27, 창녕16, 창녕, 김해27, 창원29, 밀양19, 밀양20이었고 또한 하나의 그룹은 밀양11, 창원4, 밀양7, 창원8, 경주6, 김해22, 창원19였다(Fig. 3). 프라이머 조합중 E1+M1의 primer 조

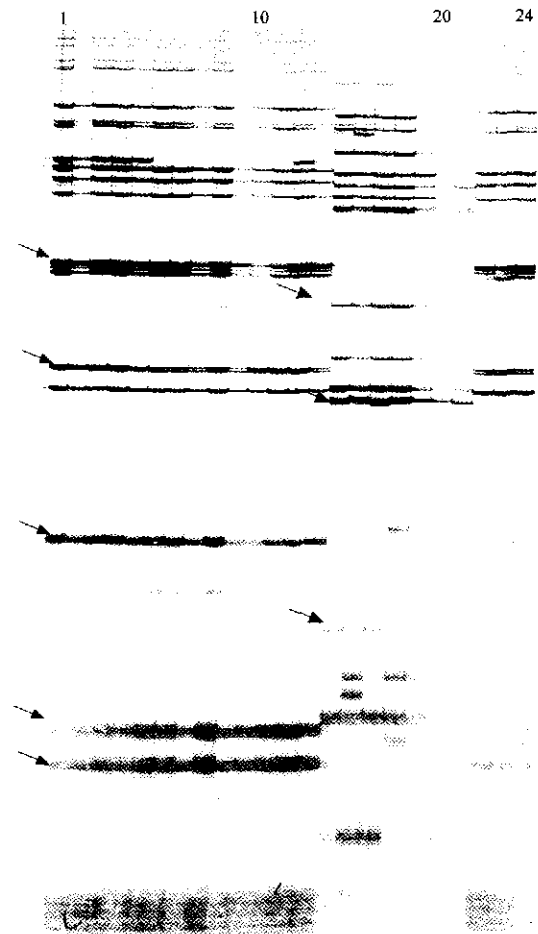


Fig. 1. AFLP profile with *Colletotrichum* spp. using primer combination E1+M1.

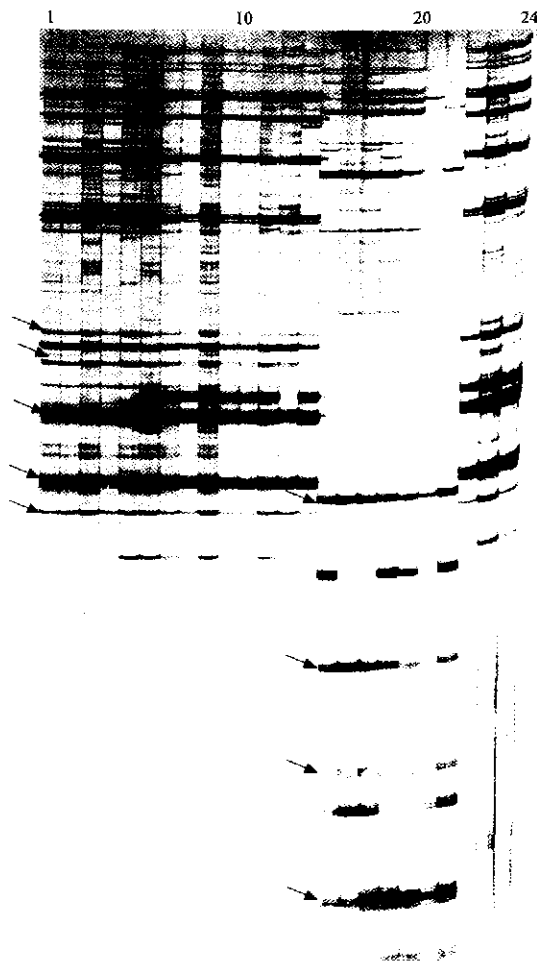


Fig. 2. AFLP profile with *Colletotrichum* spp. using primer combination E1+M4.

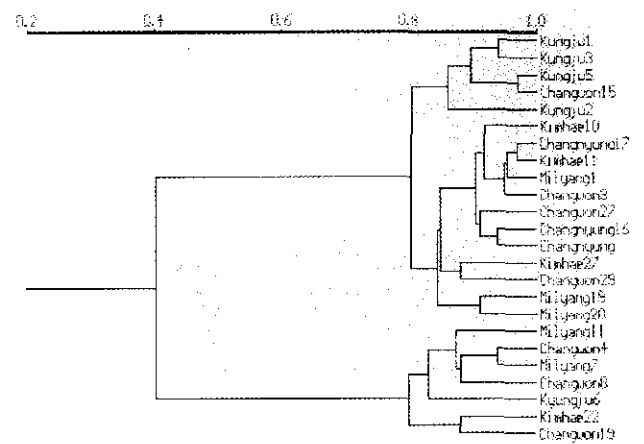


Fig. 3. UPGMA dendrogram among the twenty-five *Colletotrichum* spp. based on the bands on 6% acrylamide gel in AFLP.

합에서는 각각의 큰 그룹에 속하는 특이적인 band를 검출할 수가 있었는데 첫 번째 그룹에서는 6개, 두 번째 그룹에서는 3개의 band를 검출할 수 있었다(Fig. 1). 다른 조합인 E1+M4에서는 5개와 4개의 특이적인 band를 찾을 수 있었다(Fig. 2). 큰 그룹에 속하는 균주들 간의 유사도는 0.76-0.97로서 높은 상동성을 보였으나 다른 그룹에 속하는 균주들 간에는 0.26-0.47로서 상대적으로 낮은 유사도를 나타내었다(Table 3). 이러한 사실을 미루어 볼 때 단감나무 피해를 주는 탄저병은 2개의 종이 복합적으로 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 각각의 그룹에 속하는 특이적인 band를 이용한다면 단감나무 탄저병에 특이적으로 반응하는 균주를 검출하는데 유용하게 이용하리라 사료된다. 따라서 현미경에 의한 형태적 분류와 분자생물학적인

Table 3. Similarity matrix based on the number of shared bands by the compared *Colletotrichum* spp. on 6% acrylamide gel in AFLP analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	1.00																								
2	0.82	1.00																							
3	0.94	0.88	1.00																						
4	0.88	0.88	0.94	1.00																					
5	0.85	0.85	0.91	0.91	1.00																				
6	0.79	0.79	0.85	0.85	0.94	1.00																			
7	0.82	0.76	0.88	0.82	0.91	0.97	1.00																		
8	0.73	0.79	0.79	0.79	0.82	0.88	0.85	1.00																	
9	0.82	0.76	0.82	0.82	0.91	0.97	0.94	0.85	1.00																
10	0.79	0.79	0.85	0.85	0.82	0.88	0.85	0.82	0.85	1.00															
11	0.76	0.82	0.82	0.82	0.79	0.85	0.82	0.85	0.82	0.91	1.00														
12	0.76	0.76	0.82	0.82	0.91	0.97	0.94	0.91	0.94	0.85	0.88	1.00													
13	0.85	0.85	0.91	0.97	0.88	0.82	0.79	0.82	0.79	0.82	0.79	0.79	1.00												
14	0.73	0.73	0.79	0.79	0.82	0.88	0.85	0.88	0.85	0.82	0.79	0.85	0.82	1.00											
15	0.41	0.41	0.35	0.35	0.26	0.26	0.29	0.32	0.29	0.32	0.35	0.29	0.32	0.32	1.00										
16	0.47	0.52	0.41	0.47	0.38	0.38	0.35	0.44	0.41	0.44	0.47	0.41	0.44	0.38	0.82	1.00									
17	0.50	0.50	0.44	0.44	0.35	0.41	0.44	0.47	0.44	0.47	0.50	0.44	0.41	0.35	0.79	0.85	1.00								
18	0.41	0.47	0.41	0.41	0.32	0.38	0.41	0.44	0.41	0.44	0.47	0.41	0.38	0.32	0.88	0.76	0.85	1.00							
19	0.50	0.44	0.44	0.44	0.35	0.41	0.44	0.47	0.44	0.47	0.50	0.44	0.41	0.41	0.85	0.79	0.82	0.85	1.00						
20	0.41	0.47	0.35	0.41	0.32	0.38	0.35	0.50	0.41	0.50	0.52	0.41	0.44	0.44	0.76	0.88	0.79	0.76	0.79	1.00					
21	0.47	0.47	0.41	0.41	0.32	0.38	0.41	0.44	0.41	0.44	0.47	0.41	0.38	0.32	0.88	0.82	0.85	0.94	0.91	0.82	1.00				
22	0.76	0.70	0.82	0.76	0.85	0.91	0.94	0.85	0.88	0.85	0.82	0.88	0.79	0.85	0.23	0.29	0.38	0.35	0.38	0.41	0.35	1.00			
23	0.79	0.73	0.79	0.79	0.88	0.94	0.91	0.82	0.91	0.88	0.85	0.91	0.76	0.82	0.26	0.38	0.41	0.32	0.41	0.44	0.38	0.91	1.00		
24	0.73	0.79	0.79	0.79	0.88	0.94	0.91	0.82	0.91	0.88	0.85	0.91	0.76	0.82	0.26	0.38	0.41	0.38	0.35	0.44	0.38	0.91	0.94	1.00	

기법이 복합적으로 분석한다면 병원균의 분류동정 히는게 있어서 정확한 data를 제공하리라 여겨지고 이러한 data를 축적함으로써 병원균에 대한 이해를 좀더 정확히 할 수 있으리라 기대된다.

적 요

Colletotrichum spp.는 광범위한 기주 범위를 갖는 다범성 균으로 각종 작물에 피해를 야기시키는 중요한 식물병원 진균이다. 최근 국내에서 널리 재배되고 있는 단감, 사과, 복숭아, 포도 등에 탄저병이 발생하여 많은 경제적 손실을 초래하고 있다. 탄저병 병원균의 경우 기존에는 주로 형태적 특징이나 배지상에서의 특성, 기주에 대한 병원성의 차이에 의존하여 분류를 해 왔다. 그러나 최근에는 병원균의 분류에 있어 문제점을 해결하기 위하여 분자생물학적 방법을 이용하고 있다. 최근에는 RAPD(ramdonly amplified polymorphic DNAs)와 RFLP(restriction fragment length polymorphism)의 장점만을 살린 AFLP(amplified fragment length polymorphism)기법이 유연관계 분석에 있어서 각광을 받고 있고 rDNA 부위를 증폭하여 제한효소를 이용하여 다양성을 보는 방법이 많이 이용되고 있다. 이에 본 실험에서는 AFLP 기법 이용하여 단감나무에 탄저병을 일으키는 균들간에 유연관계를 밝혔다. AFLP 결과에서 variation이 심하여 각각의 균주에 특징적인 band를 검출할 수 있었다. 특히 단감나무에 병해를 일으키는 탄저병 병원균은 2개의 종이 복합적으로 관여하는 사실을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 농림부 현장애로기술개발과제 연구비 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사 드립니다.

참고문헌

Agrios, G. N. 1998. Plant pathology. Academic Press. 4th ed. Pp. 331-333.

Agostini, J. P., Timmer, L. W. and Mitchell, D. J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* **82**: 1377-1382.

Breithwaite, K. S., Irwin, J. A. G. and Manners, J. M. 1990. Restriction fragment length polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. *Mycol. Res.* **94**: 1129-1137.

Choi, H. S., Kim, K. S., Kim, M. J. and Lee, Y. S. 1997a. RAPD analysis for the evaluation of genetic diversity among the *Fusarium* species from various sources. *Korean J. Mycology* **25**: 202-208.

Choi, H. S., Kim, K. S. and Lee, Y. S. 1997b. Molecular analysis of genetic diversity among the *Fusarium oxy-*

sporum and their forma specialis from various sources. *J. Agricultural Science* **8**: 29-36.

Dresler-Nurmi, A., Terefework, Z., Kaijalainen, S., Lindstrom, K. and Hatakka, A. 2000. Silver stained polyacrylamide gels and fluorescence-based automated capillary electrophoresis for detection of amplified fragment length polymorphism patterns obtained from white-rot fungi in the genus *trametes*. *J. Microbiol Methods*. **41**: 161-72.

Gunnell, P. S. and Gubler, W. D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* **84**: 157-165.

Innis, M. A. and Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. Pp. 3-12, *In* M. A. Innis, Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, New York.

Lee, Y. S., Choi, H. S. and Kim, K. S. 1998. Analyses of genetic relationships of *Rhizoctonia solani* isolated from various crop species and rapid identification of anastomosis group with RAPD method. *Korean J. Mycology* **26**: 373-379.

Mackill, D. J. 1995. Classifying japonica cultivars with RAPD markers. *Crop Sci.* **35**: 889-894.

Mackill, D. J., Zhang, Z., Renona, E. D. and Colowit, P. M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* **39**: 969-977.

Mesquita, A. G. G., Paula, T. J. Jr., Moreira, M. A. and de Barros, E. G. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Disease* **82**: 1084-1087.

Noli, E., Salvi, S. and Tuberosa, R. 1997. Comparative analysis of genetic relationships in barley based on RFLP and RAPD markers. *Genome* **40**: 607-616.

Old, R. W. and Primrose, S. B. 1994. Polymerase chain reaction. Pp. 178-190. *In* Principles of Gene Manipulation. Blackwell Science, Cambridge, MA. USA. 473Pp.

Reineke, A. and Karlovsky, P. 2000. Simplified AFLP protocol : replacement of primer labeling by the incorporation of alpha-labeled nucleotides during PCR. *Biotechniques* **28**: 622-623.

Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 137-144.

Rohlf, S. B. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, vesion 1.7. Applied Biostatistics Inc., New York, USA.

Rusell, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 714-722.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Manitis, T. 1989. Molecular cloning : A laboratoty manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1992.

- DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **41**: 265-281.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E. and Mill, P. R. 2000. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.* (In press).
- Vaillancourt, L. J. and Hanau, R. M. 1992. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Exp. Mycol.* **16**: 219-2293.
- Vakalounakis, D. J. and Fragkiakakis, G. A. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber : Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* **89**: 161-168.
- Vilarinhos, A. D., Paula, T. T. Jr., Barros, E. G. and Moreira, M. A. 1995. Characterization of races of *Colletotrichum lindermuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. *Braz. Phytopathol.* **20**: 194-198.
- Vos, P., Hoders, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vade, Lee T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* **23**: 4407-4414.
- Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4153-4154.
- Williams, J. G. K., Kubelik, 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 Res.* **18**: 6531-6535.
- 장태현, 임태현. 1998. 단감나무 등근 갈색무늬병균의 분생포자 발아에 미치는 환경요인. *한국식물병리학회지* **14**: 120-124.