

## Chitosan이 사과 겹무늬썩음병균 *Botryosphaeria dothidea*의 생육에 미치는 영향

이승지 · 엄재열<sup>1</sup> · 이용현\*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과, <sup>1</sup>경북대학교 농과대학 농생물학과

**Effect of Chitosan on the Growth of *Botryosphaeria dothidea*, the Causal Fungus of Apple White Rot. Seung-Ji, Lee, Jae-Youl Uhm<sup>1</sup> and Yong-Hyun Lee\***. Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, <sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - To examine the potential utilization of chitosan, the biodegradable natural polymer, as a control agent of apple white rot caused by *Botryosphaeria dothidea* in a new control measure by coating it on the diseased branches, the various antifungal activities of chitosan was investigated. Chitosan showed significant inhibitory effect on the mycelial growth of *B. dothidea*, along with the morphological changes including hyphal swelling and ultrastructural changes on solid PDA medium. In liquid PD broth medium, the chitosan showed more significant effect on the growth of *B. dothidea* also forming cell clusters indicating affection on the hyphal extension. The growth of *B. dothidea* was inhibited more than 90% at the concentration of 1.0 mg/ml. Chitosan also detained the spore germination and induced the morphological change of germ tubes. Glucosamine, monomer of chitosan, did not affect on the growth of *B. dothidea* indicating the antifungal activity was caused by chitosan polymer.

사과 겹무늬썩음병은 자낭균류인 *Botryosphaeria dothidea*가 사과과실에 기생하여 부패시키는 병해로서, 국내에서 발생하는 사과 병해중 경제적 피해가 가장 크고 방제가 어렵다. 현재 전국적으로 수확기 과실 중 평균 13%가 피해를 입고 있으며 과수원에 따라서 50~80%의 높은 발병율을 보이는 예도 보고되어 있다(1-3). *B. dothidea*는 1차적으로 사과나무줄기에 기생하여 사마귀 또는 궤양 증상을 나타내며, 이 곳에서 1차 전염원인 자낭포자 및 병포자가 형성된다. 이들 포자는 빗물에 의해 누출, 비산되어 사과표면에 부착, 감염된 후 비교적 긴 잠복기를 거쳐 발병된다(4, 5).

현재 이 병의 방제를 위해 살균제를 연간 8~10회 살포하고 있으나 발병율을 10% 이하로 낮추기 어려울 뿐만 아니라, 빈번한 살균제 살포로 인한 환경오염 등 부작용도 심각하여 이에 대한 대책이 요망되고 있다(6). 최근 본 연구자들은 사과 겹무늬썩음병에 대한 새로운 방제법을 연구하고 있으며(7), 이는 병원균의 전염원이 되는 사마귀나 궤양 증상의 병반이 다량 형성된 사과 나무 줄기부위를 고분자로 코팅하여 전염원인 포자의 형성을 억제하고 또한 형성된 포자의 분산을 차단하는 연구를 수행하고 있다.

이와같은 방제법이 실용화되기 위해서는 적절한 코팅용 고분자소재의 개발이 필요한데, 그 소재로 비분해성인 합성 고분자보다는 자연계에서 쉽게 분해되어 환경오염을 유발하지 않는 생분해성 고분자를 활용하는

것이 바람직한 것으로 판단되었다.

Chitin은 자연계에서 cellulose 다음으로 양적으로 풍부한 천연고분자이며, 그 유도체인 chitosan(poly-β-D-glucosamine)은 고밀도의 양전하를 띤 선형의 polyelectrolyte 구조를 이루고 있고, 인체에 무해할 뿐만 아니라 초산과 같은 약산으로 쉽게 용해되며 피막을 형성할 수 있는 생분해성 천연고분자 물질이다(8-10). 특히 chitosan은 많은 종류의 곰팡이에 대한 항균활성이 보고되어(11-16), *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* 등과 같은 토양전염성 식물병원균류에 대해서도 생육 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다(11). Chitosan의 진균류에 대한 생육 억제활성은 amino기가 free base 상태인 pH 7.5에서 보다는 pH 6.0에서 더 높았으며(14), 7개 이상의 잔기로 이루어진 chitosan oligomer가 가장 높은 항진균활성과 pisatin 유도활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(15).

또한 chitosan은 식물세포에서 chitinase의 생성 유도작용, phytoalexin의 축적, 그리고 proteinase inhibitor의 합성 등과 같은 방어기작을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(16-19). 이와 같은 chitosan의 항진균활성과 식물세포의 방어기작 촉진 특성을 이용하여 chitosan을 온실식물의 병 방제에 활용하기 위한 연구도 수행된 바 있다(13).

본 연구는 고분자코팅을 이용한 사과 겹무늬썩음병 방제법 개발에 있어서 chitosan을 코팅용 소재로 활용하기 위한 기초 연구로써, chitosan이 사과 겹무늬썩음병균 *B. dothidea*의 생육에 미치는 영향을 중심으로 연구하였다. 이를 위하여 고체배지에서의 균사생육, 균

\*Corresponding author.

Key words: *Botryosphaeria dothidea*, apple white rot, chitosan, antifungal activity

사의 형태 변화, 그리고 포자의 발아에 미치는 chitosan의 영향을 검토하였으며, 또한 액체배지에서는 균체생육 억제효과를 검토하였다. 이와 같은 연구는 chitosan의 *B. dothidea*에 대한 생육저해기작을 유추하고 또한 chitosan의 고분자 코팅소재로서의 적합성을 검토하기 위한 기초 자료가 된다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

사용 균주는 경북대 농생물학과 식물세균병학연구실에서 분리한 사과 겹무늬썩음병균인 *Botryosphaeria dothidea* T1109와 22였다. 고체배지로는 PDA(potato dextrose agar, Difco)를 그리고 액체배지로는 PD Broth(potato dextrose broth, Difco)를 사용하였다.

### Chitosan의 정제

Chitosan은 Ghaouth등의 방법(13)에 따라 정제하였다. 즉 chitosan(crab-shell, practical grade, Sigma)을 적절한 크기로 분쇄한 후 이를 같은 무게의 0.25N HCl 용액으로 용해시킨 후 용해되지 않는 불순물들을 원심분리(15 min, 6,500×g)하여 제거하였다. 얻어진 chitosan 용액을 적당량의 2.5N NaOH 용액으로 중화시켜 응집시킨 후, 다시 원심분리하여 백색의 chitosan 침전물을 얻었다. 이를 다량의 증류수로 4~5회 세척하여 잔존하는 염을 제거한 후 동결건조시켜 분자량 약  $5.1 \times 10^6$  kd의 분말 chitosan을 얻었다.

### Chitosan의 용해

Chitosan은 Mary등의 방법(19)에 따라 위에서 얻은 chitosan을 0.01M phosphate buffer(pH 6.5)에 분산시키고 glacial acetic acid를 소량 첨가한 후 교반시켜 용해하였다. 얻어진 용액을 1N NaOH로 pH 5.5로 조정 후 배양실험에 사용하였다.

### Chitosan 함유 고체 배지에서의 군사생장 억제율 측정

상기 chitosan 용액을 멸균 후 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 그리고 3.0 mg/ml의 농도가 되도록 PDA 배지에 첨가하였다. 위의 고체배지에 지름이 5 mm인 함균한천 plug를 접종하여 28°C에서 5일간 배양하면서 24시간 간격으로 colony의 직경을 측정하였다(11). Chitosan을 첨가하지 않은 배지에서의 colony의 직경(A)를 대조구로 하고 chitosan을 첨가한 배지에서의 colony의 직경(B)로 하여 *B. dothidea*의 군사생장 억제율을 다음 식에서 구하였다.

$$\text{군사생장 억제율(\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

### *Botryosphaeria dothidea* 군사의 형태적 변화 관찰

Chitosan 함유 배지에서 자란 colony의 가장자리 군사를 광학 현미경(Olympus CHS-213E, ×400)으로 관찰하였으며, 군사의 미세 형태 변화는 군사를 osmium tetroxide로 고정하고 ethyl alcohol로 탈수시킨 후 spur로 molding 하고, 이를 초박절편하여 TEM(Transmission Electron Microscope, HITACHI H-7400)으로 관찰하였다.

### Chitosan, 저분자 chitosan, 그리고 glucosamine의 균체생육 억제효과 측정

PD broth 100 ml에 chitosan을 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/ml, 저분자 chitosan인 CHITOMATE™과 glucosamine(Sigma Co.)은 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml로 첨가하고 *B. dothidea* 군사 함유 agar plug를 접종하여 29°C, 120 rpm에서 5일간 진탕배양, 여과한 후 건조균체의 무게로 균체생육 억제효과를 비교하였다. 이때 사용한 저분자 chitosan은 chitosan을 효소적으로 부분 가수분해시킨 것으로 그 분자량이 대략 30~50 kd이며 금호화성(주)에서 공급받았다.

### *Botryosphaeria dothidea*의 포자 발아율 측정

**포자현탁액 제조** *B. dothidea*를 PDA 고체배지에서 4일간 배양한 후, 기중군사를 제거하고 40W 형광등을 1일 8시간씩 조사하여 포자 형성을 유도하였다. 포자를 채취하여 살균수 5 ml에  $10^5 \sim 10^6$  포자/ml가 되도록 현탁하였다.

**포자 발아율 측정** 포자현탁액 100 μl에 0.1M acetate buffer(pH 5.2) 50 μl와 1%(w/v) chitosan 용액을 각각 0, 10, 20, 그리고 40 μl씩을 첨가한 후 살균수로 총 부피를 200 μl가 되도록 조절하였다. 위의 혼합액 20 μl를 각각 1.5% water agar 위에 접종한 후 28°C에서 배양하면서 시간별로 한천의 일부를 절취하여 lactophenol 첨가 aniline blue 용액(phenol 20 ml, lactic acid 20 ml, glycerin 40 ml, aniline blue 0.5 g, H<sub>2</sub>O 20 ml)으로 염색한 후 광학 현미경하에서 계수하여, 발아된 포자수와 총포자수의 비로 포자 발아율을 구하였다.

$$\text{포자 발아율(\%)} = \frac{\text{발아된 포자수}}{\text{총 포자수}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### Chitosan의 *Botryosphaeria dothidea*의 군사생장 억제효과

**군사생장 억제작용** Chitosan이 고체배양 중의 *B. dothidea*의 군사생장에 미치는 영향을 검토하기 위하여 PDA 배지에 chitosan의 첨가량을 달리하여 24시간 간

격으로 5일간 배양하면서 colony 직경을 측정하여 균사생장 억제율을 측정한 결과는 Table 1과 같으며, 5일 배양후의 colony의 상태를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 균사생장은 chitosan의 첨가량이 0.1 mg/ml 이상일 때부터 저해 받기 시작하여 농도가 증가 할수록 저해율도 증가되었으며 chitosan의 농도가 3 mg/ml일 때 전과정을 통하여 약 95%의 생육 억제율을 보였다. 그러나 그 이상의 고농도에서도 100%의 생육 억제효과를 보이지는 않았다. 그리고 생육이 억제된 균사편을 PDA에 다시 이식하였을 경우, 정상적으로 성장하였다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 chitosan은 단지 균사의 성장만을 억제할 뿐 살균효과는

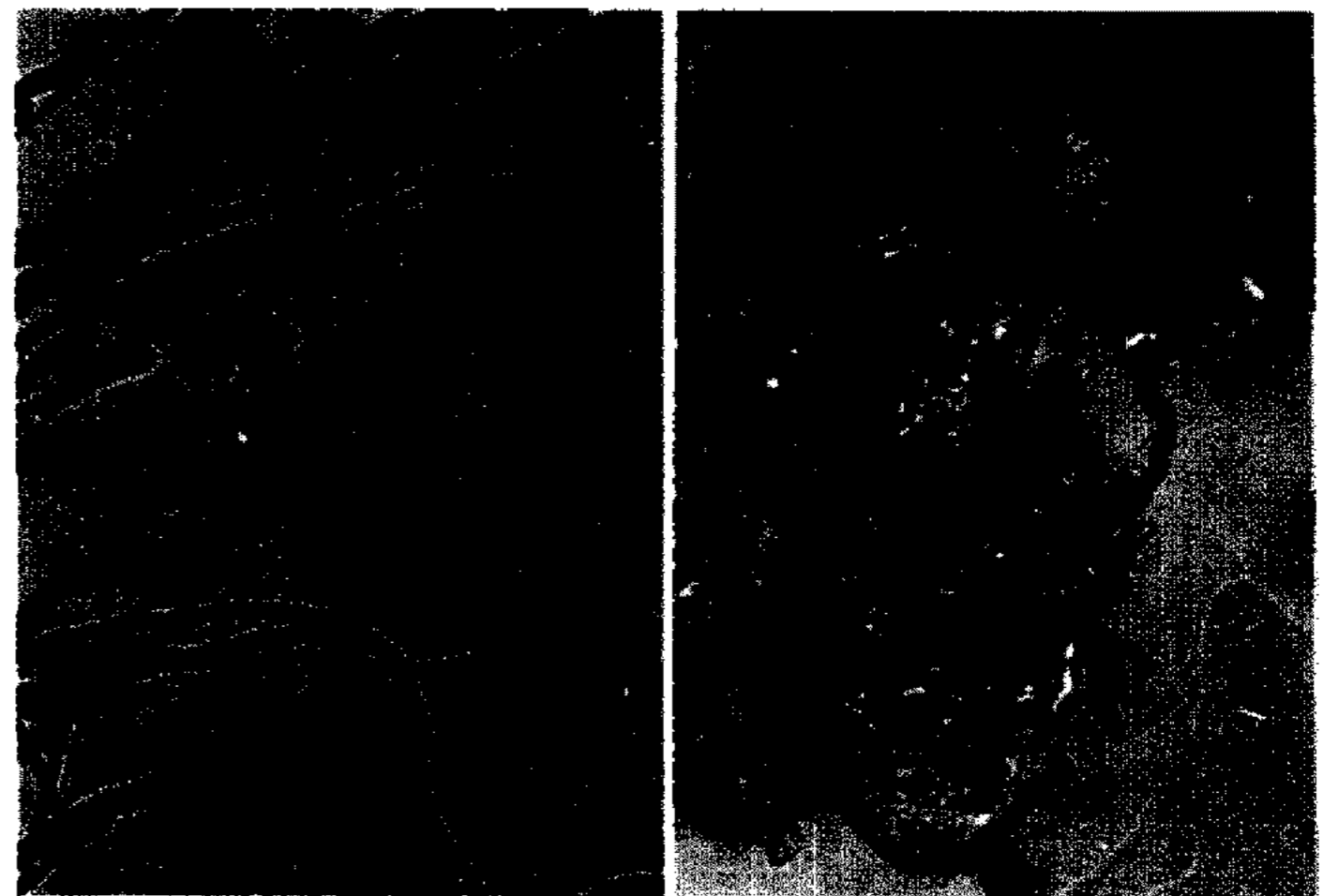
없는 것으로 생각되었다.

**균사의 형태적 변화** Chitosan을 함유한 PDA에서 배양한 균사를 광학 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. Chitosan이 함유되지 않은 배지에서 배양한 균사는 규칙적으로 격막을 형성하며 신장하였으나, chitosan이 함유된 배지에서는 균사가 신장되지 못하고 서로 응집되는 현상이 관찰되었고, 또한 균사의 지름도 2~3배 증가되었다. Gunji등(20)은 곰팡이류 세포벽의 생합성을 저해하는 polyoxin계 항생제나 또는 cell membrane attacking agent인 polyene계 항생물질에 의해서

**Table 1. Inhibitional effect on mycelial growth of *Botryosphaeria dothidea* by chitosan<sup>1)</sup>.**

Chitosan concentration (mg/ml)	Inhibition rate of mycelial growth (%)			
	Culture time (days)			
	1	2	3	4
0	0	0	0	0
0.1	0	10.4	9.4	10.0
0.5	65.2	68.0	58.8	57.7
1.0	62.1	80.0	81.3	83.8
2.0	92.4	91.7	93.3	92.5
3.0	98.8	98.9	91.8	94.5

<sup>1)</sup>*B. dothidea* was incubated for 4 days at 28°C on PDA media containing various concentration of chitosan.



**Fig. 2. Effect of chitosan on hyphal morphology of *B. dothidea*.**

A; Control (×400), B; chitosan at 2 mg/ml (×400)



**Fig. 1. Photograph of *Botryosphaeria dothidea* grown on PDA medium containing chitosan.**

A; control, B; chitosan at 0.3 mg/ml, C; 0.5 mg/ml, D; 1.0 mg/ml, E; 2.0 mg/ml, F; 4.0 mg/ml, cultivated on PDA medium at 28°C for 5 days.

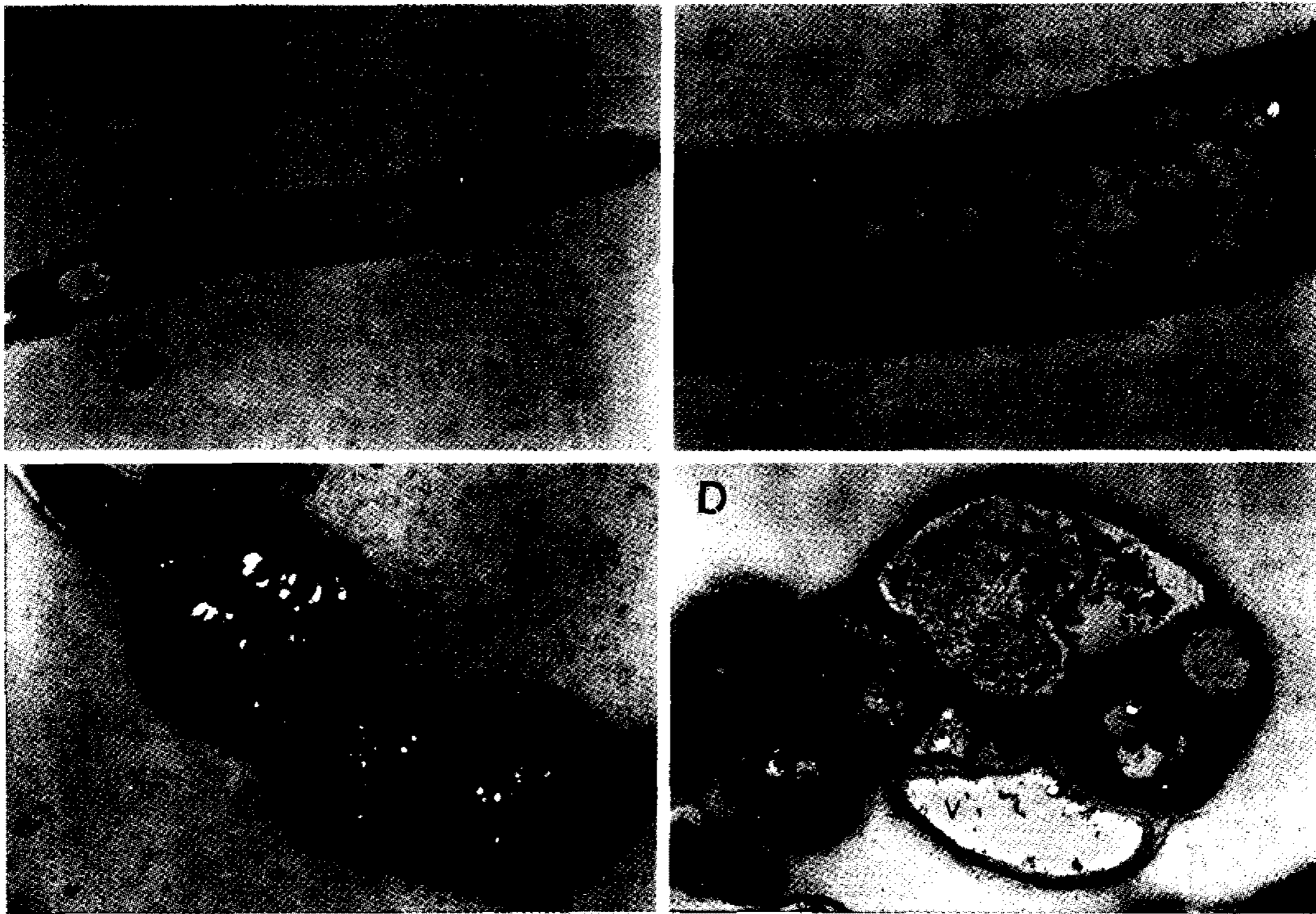


Fig. 3. Transmission electron micrographs of *B. dothidea* hyphae grown on PDA with or without chitosan. A; control ( $\times 3,000$ ), B; control ( $\times 9,000$ ), C and D; chitosan at 2 mg/ml ( $\times 3,000$ ) FW; fungal cell wall, N; nucleus, M; mitochondria, V; vacuole

균사의 팽윤현상이 야기된다고 보고한 바 있다. 따라서 이와 같은 팽윤현상은 chitosan이 세포벽이나 세포막의 기삭활성부위에 작용하는 것으로 유추된다.

**균사 형태의 미시적 변화** 균사의 미세구조를 투과형 전자현미경(TEM;  $\times 3,000$ ,  $\times 9,000$ )으로 관찰하여 비교한 결과는 Fig. 3과 같은데, chitosan이 함유되지 않은 대조구의 균사는 얇고 치밀한 세포벽으로 둘러싸여 있었고(A, B), 핵, 미토콘드리아, 그리고 액포 등의 기관들이 뚜렷이 관찰되었다.

반면 chitosan 첨가배지에서 성장한 팽윤된 *B. dothidea*의 세포는 Fig. 3(C, D)에서 보는 바와 같이 일부 세포의 경우 크게 비대해진 액포가 관찰되었고, 또한 일부 세포에서는 핵, 미토콘드리아와 같은 세포질 구성기관이 거의 손실되어 세포벽만이 관찰되었으며, 또 다른 세포에서는 세포 내부기관들이 명확히 구별되지 않고 많은 vesicle들만이 뚜렷이 관찰되었다. 또한 위에서 관찰한 바와 같이 세포의 지름이 전반적으로 약 3배 정도 팽윤되었다. 한편 세포벽의 두께는 증가된 반면 그 구조는 치밀하지 못하였으며, 몇몇 세포에서는 세포벽과 세포질 사이에 무정형의 물질들이 침착되어 있는 것이 관찰되기도 하였다.

이와같은 chitosan 처리에 의한 세포의 미세 구조변화는 *Fusarium oxysporum*과 *Pythium aphanidermatum*에 대한 chitosan의 항진균활성에서도 관찰된 바

있다(11, 13). 특히 Benhamou(11)는 chitosan의 polycationic 특성에 의해 야기되는 세포원형질막의 변형이 세포의 형태적·구조적 변화의 원인으로 추정된다고 보고한 바 있다. 그러나 chitosan에 의한 세포 구조의 미세적변화 유발과 같은 항진균활성 기작은 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없으며 앞으로 이에 대한 연구가 필요하다.

#### Chitosan이 액체 배양시 균체생육에 미치는 영향

Chitosan이 액체 배양시 *B. dothidea*의 균체생육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 chitosan의 첨가량을 달리한 PD broth 배지에서 5일간 배양한 후 균체건조 무게를 비교한 결과는 Fig. 4와 같다. Chitosan은 소량인 0.1 mg/ml 첨가할 때도 현저한 균체생육 억제효과를 보였으며 이때의 억제율은 약 50%였으며, 또한 3 mg/ml 이상에서는 균체생육이 거의 억제되었다. 이와 같은 억제효과는 고체배지의 경우보다 더욱 현저하였는데 이는 성장하는 균사의 전면이 chitosan과 직접 접촉하기 때문으로 사료된다.

또한 Fig. 5는 액체배지에서 5일간 배양한 *B. dothidea*의 균사체의 모양을 관찰한 결과로서, chitosan의 함량이 증가할 수록 균체의 생육이 억제될 뿐만 아니라 균사체도 응집된 상태로 생육하여, chitosan의 균사생육 억제현상이 균사의 응집현상과 관련된 것을 알 수 있

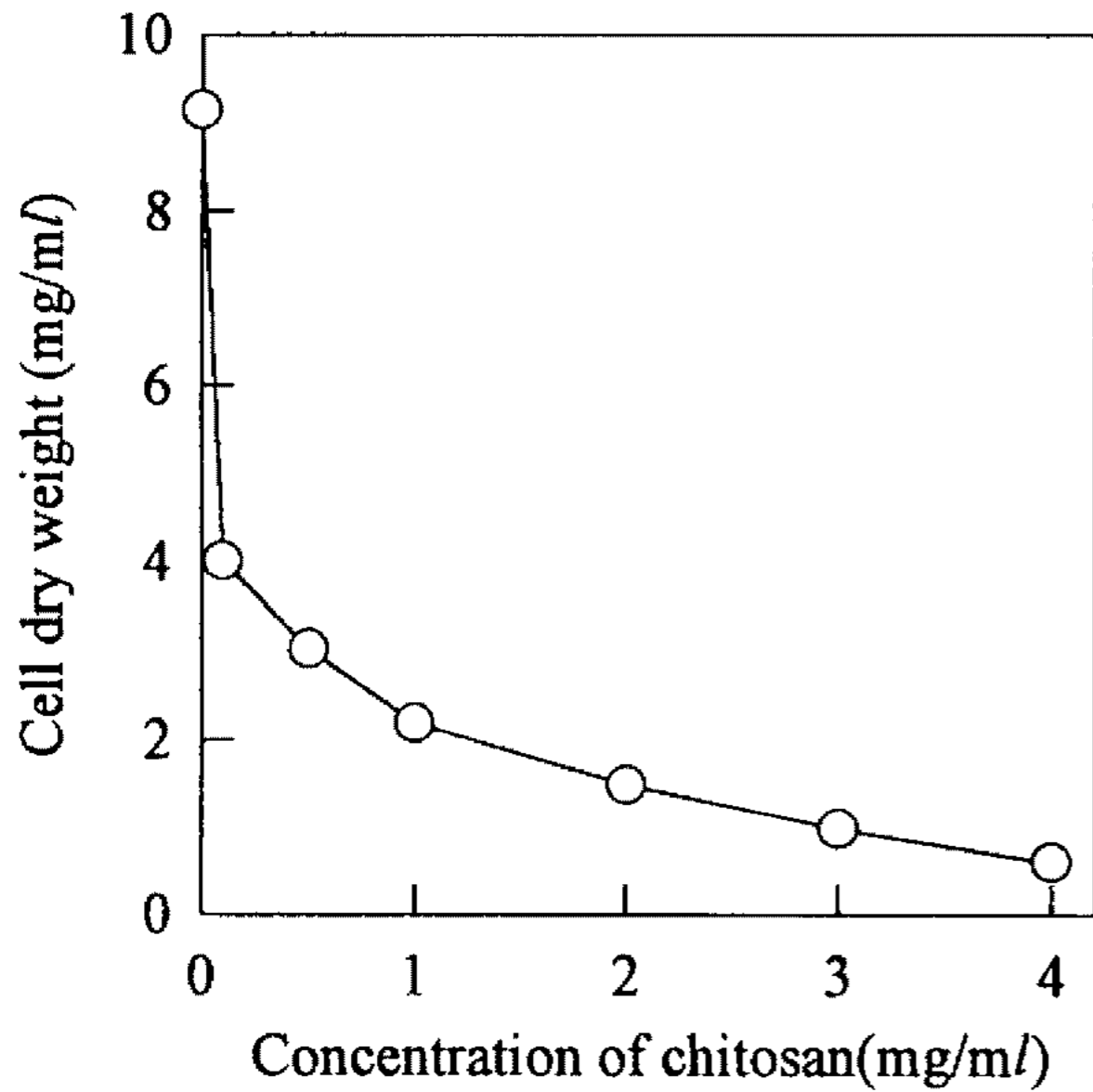


Fig. 4. Effect of chitosan concentration on growth of *B. dothidea*. Cultivated in PD broth medium at 28°C, 150 rpm for 5 days.

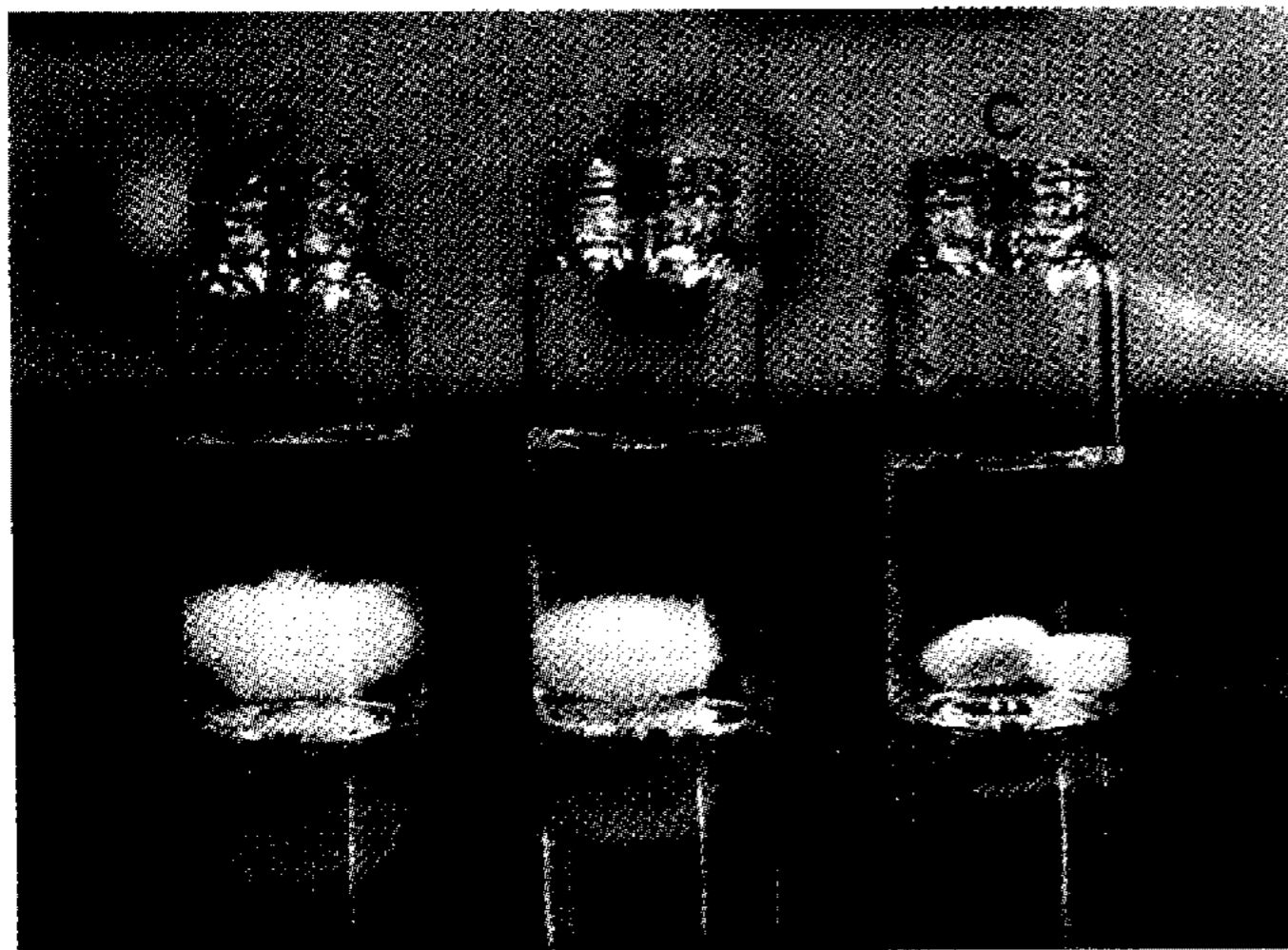


Fig. 5. Photograph of *B. dothidea* colony after 5 days cultivation in PD broth without chitosan (A) and with chitosan (B, C). A; control, B; chitosan of 0.1 mg/ml, C; 0.5 mg/ml. Cultivated at 28°C and 150 rpm.

었다.

***B. dothidea* 포자 발아에 미치는 영향**

Table 2는 chitosan이 포자 발아율에 미치는 영향을 검토한 결과이다. Chitosan이 첨가되지 않은 대조구의 경우 *B. dothidea*의 접종 3시간 후의 포자발아율은 93.4%으로서 거의 발아가 완료되었으나, chitosan 처리군의 경우는 포자 접종 후 3시간까지는 소량의 chitosan을 첨가한 경우에도 포자는 전혀 발아하지 않았으며, 접종 6시간 후부터 포자가 발아하기 시작하였다. Chitosan의 첨가 농도를 0.5~2.0 mg/ml로 변화시켰지만 그에 따른

Table 2. Effect of chitosan on the spore germination of *Botryosphaeria dothidea*.

Chitosan concentration (mg/ml)	Spore germination rate (%)			
	Incubation time (hours)			
	3	6	9	12
0	93.4	95.8	98.5	98.9
0.5	0	1.2	22.0	79.2
1.0	0	0.9	25.3	76.9
2.0	0	0.2	21.4	77.3

Reaction mixture was composed of 10 µl spore suspension (10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> spore/ml), 5 µl 0.1M acetate buffer, and 0~4 µl chitosan solution (10 mg/ml) and then filled up to 20 µl with dH<sub>2</sub>O. 20 µl of reaction mixture was dropped on 1.8% agar medium.

12시간 후의 발아율은 76.9~79.2%로 큰 차이를 보이지 않았다.

Fig. 6은 chitosan을 처리한 포자의 발아과정을 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과로 chitosan을 처리하지 않은 포자는 잘 발아하여 균사가 신장되는 것을 볼 수 있지만, chitosan을 처리한 포자의 경우 발아관의 모양이 대조군에 비해 팽윤되고 찌그러져 있는 등 기형적인 형태를 보이며 정상적으로 신장하지 못하는 것이 관찰되었다.

이러한 결과들로부터 chitosan은 사과 겹무늬 썩음병균인 *B. dothidea*에 대해서 균사 성장 억제와 발아 지연과 같은 항진균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 성질을 가진 chitosan을 적절히 활용할 경우, 사과 겹무늬썩음병의 방제에 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

**Chitosan, 저분자 chitosan, 그리고 glucosamine의 균체생육저해 효과의 비교**

Chitosan의 단량체인 glucosamine은 *Coprinus lagopus*와 *Pyricularia oryzae* 등과 같은 곰팡이의 균사 성장을 저해하는(14, 21) 것으로 알려져 있다. 따라서 *B. dothidea*에 대한 chitosan의 항진균 활성이 단량체인 glucosamine에 의한 것인지를 확인하기 위하여 glucosamine을 혼합한 PD broth에서 *B. dothidea*를 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다. Glucosamine을 혼합한 배지에서 배양한 경우, 첨가하지 않은 배지에서 배양한 군과 비교하여 균체생육이 비슷하거나 또는 오히려 조금 나은 생육상태를 보였으며, 첨가된 glucosamine의 농도에 따른 영향은 크지 않았다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, *B. dothidea*에 대한 chitosan의 항진균 활성은 고분자상태로 존재하는 chitosan에 의한 것이며, 그 가수분해물인 단량체인 glucosamine에서 비롯된 것이 아님을 알 수 있었다.

한편 분자량 약 40 kd 전후의 저분자 chitosan을 첨

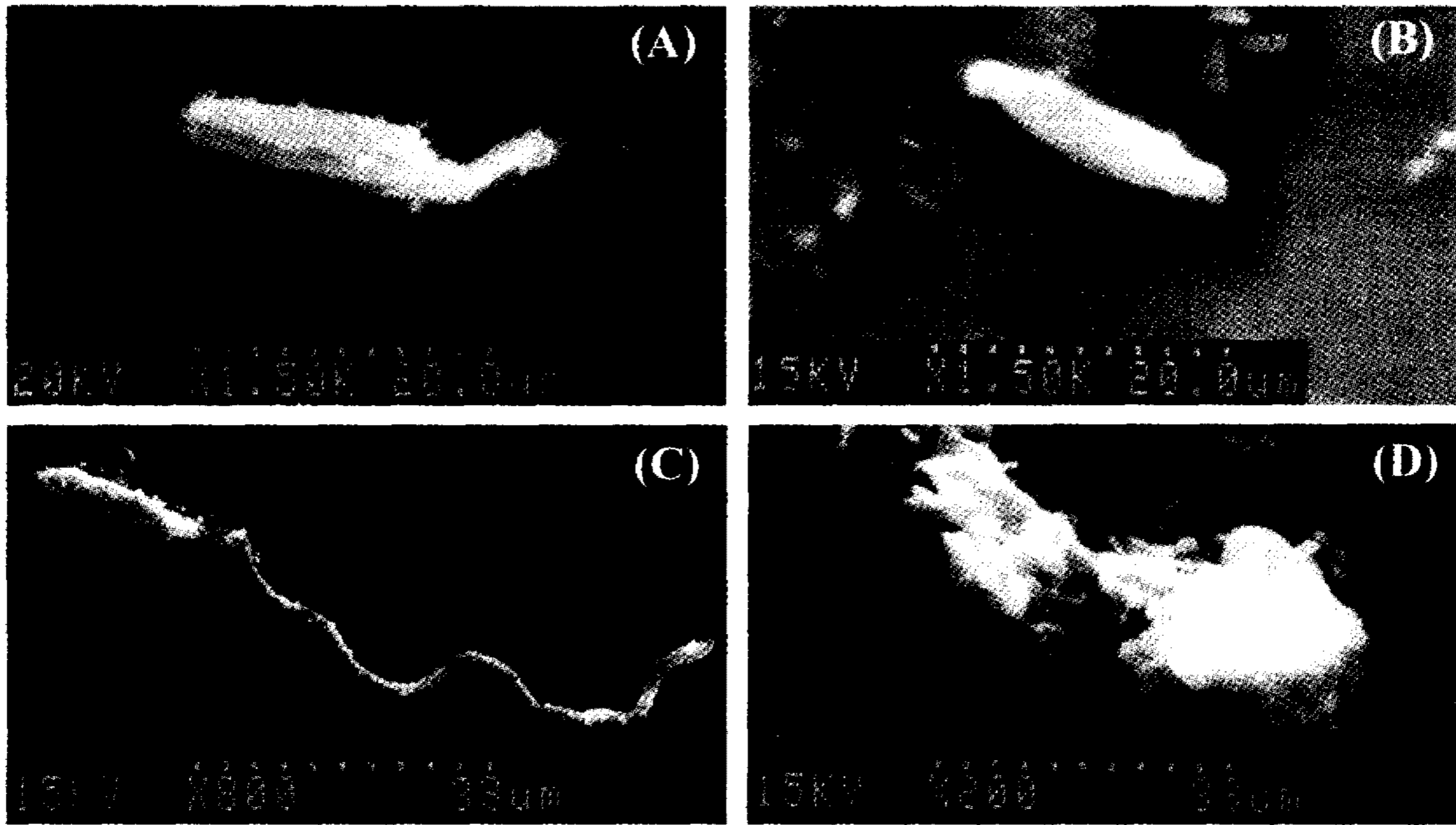


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *B. dothidea* spore germination. (A): spores incubated for 3 hrs without chitosan, (B): spores incubated for 3 hrs with chitosan, (C): spores incubated for 9 hrs without chitosan, (D): spores incubated for 9 hrs with chitosan.

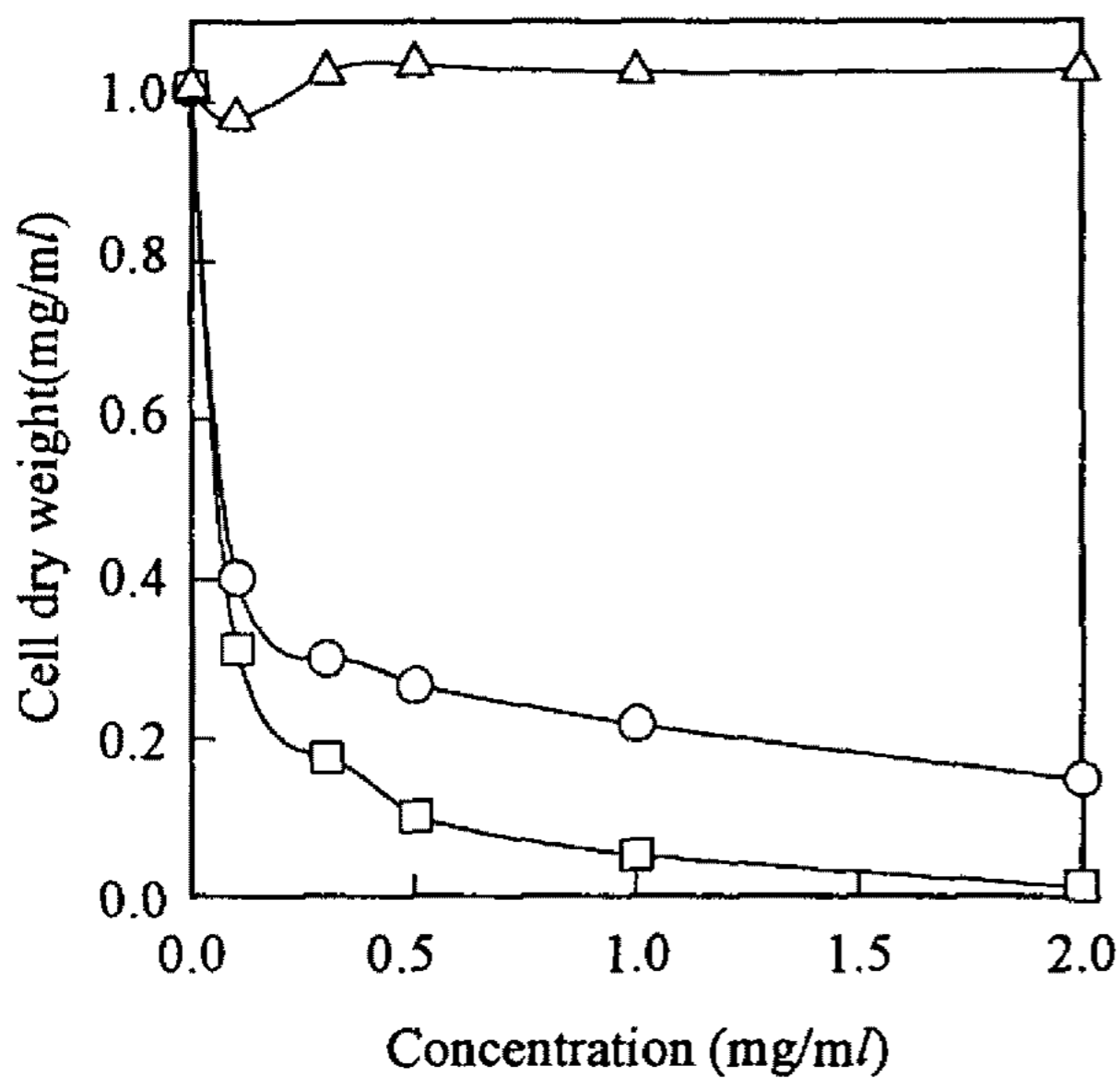


Fig. 7. Effect of glucosamine and chitosan concentration on growth of *B. dothidea*.

Cultivated in PD broth medium at 28°C, 150 rpm for 5 days.  $\Delta$ : Glucosamine,  $\circ$ : Chitosan,  $\square$ : CHITOMATE™ (Low M.W. chitosan)

가한 배지에서 배양한 경우, 같은 농도의 chitosan 용액을 첨가한 군과 비교하여 *B. dothidea*에 대한 균체 생육 억제효과는 약 30% 정도 증가하였는데, 이는 분자량이 1,000 kd 이상으로 존재하는 천연상태의 chitosan을 그대로 사용하는 것보다는 분자량을 40 kd 이하로 분해시켜 사용하는 것이 *B. dothidea*에 대한 chitosan의 항진균 활성을 높일 수 있음을 나타낸다. 앞으로

적절한 분자량의 저분자 chitosan 또는 oligo-chitosan을 확인하고, 그 물성을 검토하여 고분자코팅소재로서 활용 가능성 검토에 대한 후속 연구가 요망된다.

### 요 약

고분자물질에 의한 사과 겹무늬썩음병 방제법을 개발함에 있어서 chitosan을 코팅용 소재로 활용하기 위하여, 사과 겹무늬썩음균인 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 chitosan의 항진균활성을 고체배양 및 액체배양 조건하에서 검토하였다. Chitosan은 고체배양시 *B. dothidea*의 균사생장억제, 자라난 균사의 응집, 균사의 팽윤 및 세포의 미세구조의 변화를 유발하였다. 액체배양실험 결과 chitosan은 낮은 농도에서도 강력한 균체생육 억제효과를 보였으며, 1.0 mg/ml의 첨가농도에서 90% 이상의 억제효과를 나타내었다. 또한 균사의 신장과정에 영향을 미쳐 균사체의 응집현상이 관찰되었다. 또한 chitosan이 포자의 발아를 지연시켰을 뿐만 아니라 발아관의 형태적 변화를 유발시켰다. 단량체인 glucosamine은 *B. dothidea*의 생육저해를 유발하지 않았으며, 항진균 활성은 chitosan polymer에 의한 것임을 알았다.

### 감사의 말

본 연구는 농림수산부의 1995년도 농수산물개발사업(현장애로사업) 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 김승철. 1982. 사과나무 조피증상의 요인 및 대책. 농약과 식물보호 3: 73-78.
2. Sutton, T.B. 1981. Production and dispersal of ascospores and conidia by *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology* 71: 584-589.
3. 이두형. 1990. 사과나무 겹무늬썩음병(운문병)의 병원균, 발생요인 및 방제대책. 경북대학교 농업과학기술연구소. Pp. 25-41.
4. 홍연규, 예완해, 김충희, 조의규, 이은중. 1989. *Botryosphaeria dothidea*에 의한 사과나무 사마귀 형성의 병원학 및 병태조직학적 고찰. 한국식물병리학회지 5: 151-160.
5. 김성봉, 김진수. 1989. 사과 겹무늬썩음병의 병원성과 발생생태에 관한 연구(I). 한국원예학회지 30: 26-37.
6. 엄재열, 이준탁. 1993. 미국의 식물검역 기준에 적합한 사과 병해 방제체계 수립. 경상북도, 경북대학교 농업과학기술연구소. Pp. 3-43.
7. 김대회. 1994. 사과 겹무늬썩음병균의 포자형성 및 분산 저지법 개발. 경북대학교 석사학위논문집.
8. 조정숙, 한정준, 이철호. 1992. 꽃게 껍질에서 분리제조한 키틴산 필름의 물성에 관한 연구. 한국식품과학회지 24: 574-580.
9. 이용현, 정의준. 1994. Chitin/Chitosan 유도체의 구조, 분해효소, 이용 및 주류산업에의 활용. 주류공업 14: 73-85.
10. Sanford, P.A. and G.P. Hutchings. 1987. Chitosan-a natural, cationic biopolymer: commercial applications. Pp. 363-376. In M. Yalpani (ed.), *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications, Progress in Biotechnology*, Vol. 3, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
11. Benhamou, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82: 1185-1193.
12. Ghaouth, A.E., J. Arul, J. Grenier and A. Asselin. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
13. Ghaouth, A.E., J. Arul, J. Grenier, N. Benhamou, A. Asselin and R. Bēlanger 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology* 84: 313-320.
14. Stössel, P. and J.L. Leuba. 1984. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. *Phytopath. Z.* 111: 82-90.
15. Kendra, D.F., D. Christian and L.A. Hadwiger. 1989. Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/β-glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 215-230.
16. Hirano, S. and N. Nagao. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53: 3065-3066.
17. Yalpani, M. and P.A. Sanford. 1987. Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments, Pp. 311-335. In M. Yalpani (ed.), *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications, Progress in Biotechnology*, Vol. 3, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
18. Hadwiger, L.A. and J.M. Beckman. 1980. Chitosan as a compound of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211.
19. Mary, W.S., L. Hadwiger and C.A. Ryan. 1983. Chitosan and pectic polysaccharides both include the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 110: 194-199.
20. Gunji, S., K. Arima and T. Beppu. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2061-2069.
21. Kamimiya, S. and H. Tanaka. 1982. Effect of glucosamine on the growth of *Pyricularia oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1225-1233.

(Received 15 February 1996)