

오이 탄저병 방제에 효과적인 *Streptomyces* sp. S20-465 유래 대사물질 규명

Identification of Metabolites Derived from *Streptomyces* sp. S20-465 That Are Effective in Controlling Cucumber Anthracnose

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3055

Fax: +82-63-238-3834

E-mail: mksang@korea.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-9032-7012>김지원 · 상미경* 

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과

Jiwon Kim and Mee Kyung Sang* 

Division of Agricultural Microbiology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju55365, Korea

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is substantial economic importance in South Korea, with its cultivation occupying a significant portion of agricultural land. However, sustainable cucumber production requires effective management of various diseases affecting the crop yield. In this study, we explored the potential of *Streptomyces* sp. S20-465-derived metabolites in controlling cucumber anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. This study identified 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone as a potent antifungal compound present in the *n*-hexane extract of *Streptomyces* sp. S20-465 culture filtrate. This compound exhibited significant the disease reduction, demonstrating their potential as control agents. Our findings suggest that *Streptomyces* sp. S20-465-derived metabolite could serve as an effective tool for managing cucumber anthracnose, offering a sustainable approach to enhancing cucumber production. Further research into the application and efficacy of these compounds in agricultural system will be conducted.

Keywords: Antifungal, *Colletotrichum orbiculare*, *Streptomyces*, 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone

Received March 21, 2024

Revised June 6, 2024

Accepted June 7, 2024

국내 2022년 오이(*Cucumis sativus* L.) 재배면적은 3,836헥타르, 생산량은 281,926톤으로, 시설에서 축성재배 오이가 2022년 농산물 소득조사 결과 단위면적(1,000 m²)당 소득이 가장 높았다(<https://www.kosis.kr>). 국내 농업에서 오이는 경제적으로 중요한 농작물로서 생산량 증가와 농가 소득 향상을 위해서는 오이에 발생하는 다양한 식물병을 방제하는 것이 중요하다. 현재 오이의 주요 식물병에는 흰가루병, 노균병, 잣빛곰팡이병, 검은 별무늬병, 덩굴마름병, 탄저병 등이 있으며, 효과적으로 병을 예방 및 방제하기 위해서 저항성품종과 화학농약 사용, 경종적 관리 등 다양한 방법이 이용되고 있다(Kim 등, 2018, 2021; Kim

과 Sang, 2023; Lee 등, 2016). 2022년 농촌진흥청에서 발행한 국내 소비자의 농식품 소비 트렌드 분석 보고서(<https://www.nangsaro.go.kr>)에 따르면 농식품을 구매할 때 소비자가 가장 중요하게 생각하는 요소는 건강(51.5%)과 안전(28.1%)이었다. 이러한 농식품에 대한 소비자 인식 변화에 맞추어 미생물을 활용한 친환경적인 식물병 방제 방법이 주목받고 있다.

방선균(Actinomycetes)은 토양에 널리 분포하고 있으며, 항생제를 포함한 다양한 생리활성 이차대사산물을 생산한다(Kim과 Kwak, 2023). 대표적인 방선균 속(genus)으로 *Streptomyces*가 알려져 있으며, 방선균이 생산하는 항생물질 blastidicin S, polyoxins, kasugamycin, validamycin, mildiomycin 등이 식물병 방제에 이용되고 있다(Kim 등, 1999; Olanrewaju와 Babalola, 2019). 또한, *Streptomyces* 속 균주가 생산하는 마크로라이드(macrolide) 항생물질 및 세포외효소(extracellular enzymes)가 *Colletotrichum*

*orbiculare*가 일으키는 오이 탄저병 방제에 효과가 있다는 보고가 있다(Chai 등, 2022; Kim 등, 1999).

본 연구에서 *Streptomyces* sp. S20-465는 이전의 연구(Kwak 등, 2021)에서 *C. orbiculare*와 *Botrytis cinerea*에 대해 항진균 활성을 갖는 균주로 선발하였고, S20-465가 생성하는 *C. orbiculare*에 대한 항진균 대사물질을 동정하고, 오이 탄저병에 대한 병역제 효과를 검증하고자 하였다.

S20-465의 배양 여과액을 준비하기 위해, S20-465를 250 ml의 glucose-yeast-malt extract (GYM) 배지(glucose 4 g, yeast extract 4 g, malt extract 10 g per 1 l of distilled water; pH 7.2)와 yeast extract-malt extract (YEME) 배지(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, sucrose 340 g per 1 l of distilled water)에서 28°C, 160 rpm으로 7일 동안 배양한 후, 배양액을 6,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 수거하였다. 수거한 상등액을 멤브레인 필터(0.45 µm, GVS, Italy)로 여과하여 각각, S465F_GYM와 S465F_YEME로 명명하였다. 항진균활성 평가를 위해, potato dextrose agar (PDA)에서 7일 동안 배양한 *C. orbiculare*의 균사가장자리를 코르크보러(cork borer)로 천공하여 균사디스크(직경 8 mm)를 만들고, 이를 PDA 배지 중앙에 접종하였다. 이후 S20-465 균주의 배양 여과액 50 µl와 대조구(GYM 또는 YEME 배지)를 멸균한 페이퍼디스크(직경 8 mm; Advantec, Osaka, Japan)에 흡수시킨 후, 중앙의 병원균 plug와 2 cm 간격으로 각각 양쪽에 배치하여

7일 동안 배양한 후 균사 생장을 평가하였다(Kim 등, 2021). 배양여액은 6회 독립적으로 준비하여 수행하였으며, 각 회당 3개의 페이퍼디스크를 사용하였다($n=6$). 그 결과, 대조구의 경우 *C. orbiculare*의 균사 생장이 17.93 ± 0.29 mm일 때, S465F_GYM에서는 균사 생장이 7.66 ± 0.19 mm, S465F_YEME의 경우 5.68 ± 0.32 mm로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 1A). 균사 생장 억제 기준으로 이후의 실험에서는 S465F_YEME을 사용하여 항진균 활성물질을 동정에 사용하였다.

항진균활성 효과가 있는 대사물질을 분리하기 위해, 위의 방법으로 배양하고 준비한 S465F_YEME (4 l)를 소분하여 동량의 유기용매(*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol)와 각각 혼합하였다. 12시간 동안 160 rpm으로 상온에서 진탕 처리를 한 후 12시간 동안 정치하여 유기용매층을 분리한 후 감압농축하여 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol 추출물을 얻었고, methanol을 사용하여 1 mg/ml로 맞추었다. 위와 같이 50 µl씩 처리하여 페이퍼디스크법으로 *C. orbiculare*의 균사 생장을 평가하였으며, 이 때 methanol을 무처리구로 사용하였다. 그 결과 무처리구에서 *C. orbiculare*의 균사 생장이 16.07 ± 0.69 mm일 때, *n*-hexane과 dichloromethane 추출물 처리구에서는 균사 생장이 각각 5.06 ± 0.78 mm와 10.04 ± 0.67 mm로 무처리구 대비 유의하게 균사 생장이 감소하였다(Fig. 1B). 균사 생장을 가장 효과적으로 억제한 *n*-hexane 추출물이 오이 식물체에서도 탄저병을 억제

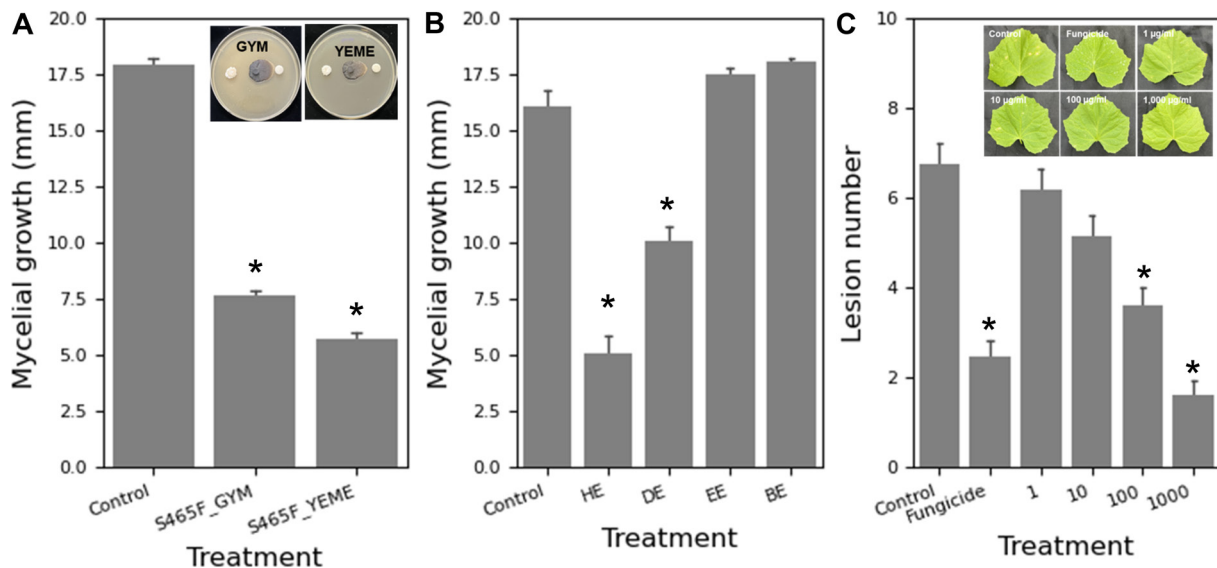


Fig. 1. Antifungal activity of culture filtrates and crude extracts of *Streptomyces* sp. S20-465. (A) Antifungal activity of S465F_GYM and S465F_YEME against *Colletotrichum orbiculare* ($n=6$). (B) Inhibition of *C. orbiculare* mycelial growth by extracts (1,000 µg/ml) of *n*-hexane (HE), dichloromethane (DE), ethyl acetate (EE), and *n*-butanol (BE) of S465F_YEME ($n=6$). (C) Cucumber anthracnose suppression by the treatment of HE (1, 10, 100, and 1,000 µg/ml) in cucumber seedlings ($n=40$). Methanol and propineb were used as negative and positive controls, respectively. Error bars represent standard errors, and an asterisk indicates statistical significance determined by Tukey's HSD test ($P<0.05$). GYM, glucose-yeast-malt extract; YEME, yeast extract-malt extract.

하는 효과가 있는지 평가하기 위해, 오이(조은백다다기; Farm Hannong, Eumseong, Korea) 종자를 9 cm 포트의 상토(바로커; Seoul Bio, Seoul, Korea)에 파종한 후, 1엽이 전개될 때까지 재배하였다. 오이 탄저병을 유도하기 위해 *C. orbiculare*의 분생포자 현탁액(5×10^5 spores/ml; 0.02% Tween 20 첨가)을 엽면 살포하여 접종한 후, 24시간 동안 dew chamber(상대습도 100%, 28°C)에서 습실 처리하였다. HE 추출물(1, 10, 100, 1,000 µg/ml; 0.02% Tween 20 첨가)은 오이 유묘 1엽에 엽면 살포하여 처리하였고, 대조약제로 안트라콜 수화제(propineb 70%; Bayer Crop Science, Leverkusen, Germany)를 사용하였다. 배양실(28°C, 상대습도 60%, 16시간/8시간 광암 조건)에서 7일 재배한 후 병반수를 평가하였다. 병반수 평가 결과, 무처리구에서 6.77 ± 0.44 개일 때, 대조약제 처리구는 2.47 ± 0.36 , *n*-hexane 추출물은 1, 10, 100, 1,000 µg/ml 처리 농도에서 각각 6.17 ± 0.47 , 5.15 ± 0.46 , 3.60 ± 0.39 , 1.60 ± 0.32 개로, 100과 1,000 µg/ml 농도에서 무처리구 대비 유의하게 병반수를 감소시켰다(Fig. 1C). 이러한 결과는 S20-465 배양 여과액의 *n*-hexane 추출물에 *C. orbiculare*의 군사 생장과 병 발생을 감소시키는 효과가 있는 항진균 대사물질이 포함되어 있음을 시사하고 있다.

S20-465 배양 여과액의 *n*-hexane 추출물에 있는 *C. orbiculare*에 대한 항진균 활성물질을 Kim 등(2023)의 방법에 따라 thin layer chromatography (TLC)와 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)로 분리 및 동정하였다. 고정상으로 silica gel 60

F₂₅₄TLC plate (0.5 mm thickness; Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, 이동상으로는 chloroform과 methanol을 9:1 (v/v)로 혼합한 것을 사용하여 전개하였으며, 254/366 nm UV 램프로 밴드의 흡광/발광을 관찰하고, *p*-anisaldehyde/sulfuric acid reagent로 염색하였다. Bio-autography는 Wedge와 Nagle (2000)이 사용한 방법을 응용하여 수행하였다(Fig. 2A). TLC plate에서 사용한 유기용매는 클린벤치에서 휘발시킨 후, *C. orbiculare*의 포자 현탁액(5×10^6 spores/ml)이 포함된 PDA (0.8% agar)로 만든 다음에 TLC 물질전개 면이 한천배지 표면에 맞게 올려 두었다. 7일 동안 28°C로 배양한 후 TLC의 밴드 위치와 clear zone 형성 위치를 비교하였다. Bio-autography에서 항진균 활성이 있는 부분에 포함된 TLC 밴드 3개와 같은 위치에 있는 밴드를 각각 분리한 후 acetone으로 추출하여 감압농축하였다. 추출한 후보물질을 methanol로 최종 10 mg/ml 농도로 맞춘 후 0.1, 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml로 희석하여 96-well plate에 100 µl씩 분주하고, Kwak 등(2021)의 방법에 따라 *C. orbiculare*의 분생포자 현탁액(1×10^7 spores/ml)을 100 µl씩 넣고 7일 동안 배양한 후 항진균 활성을 확인하였다(Fig. 2B). 가장 강한 항진균 활성을 나타낸 후보물질 2번을 DB-5MS capillary column (60 m×0.25 mm, 0.25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 장착한 Trace 1310/ISQ LT GC-MS 장치(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA)에서 분석하였다. Carrier gas로 helium을 사용하였고(1.5 ml/min), 오븐 온도는 5분 동안 50°C로 시작하여 분당 7°C씩 320°C까지 높

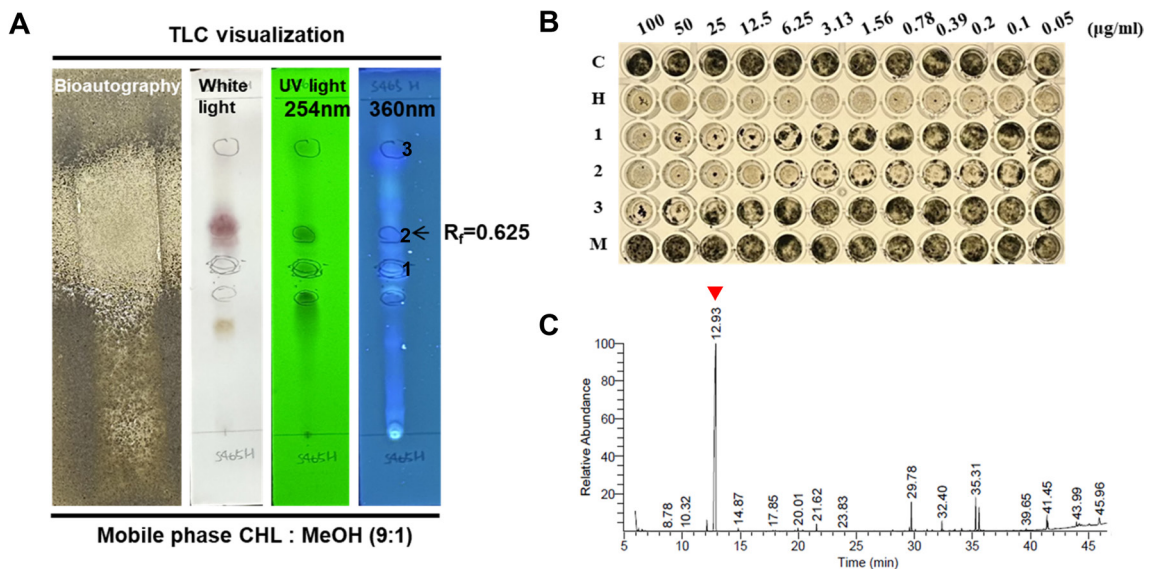


Fig. 2. Isolation and characterization of antifungal substances of *Streptomyces* sp. S20-465. (A) Thin-layer chromatography (TLC) of the *n*-hexane extract from S465F_YEME. (B) minimum inhibitory concentrations of *n*-hexane extract from S465F_YEME (H) and TLC fractions (nos. 1, 2, and 3). (C) Gas chromatography-mass spectrometry profile for TLC fraction no. 2. CHL, chloroform; YEME, yeast extract-malt extract.

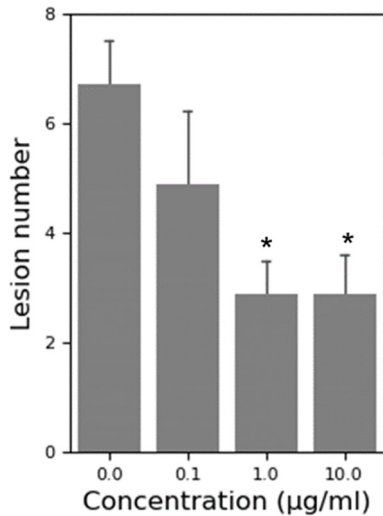


Fig. 3. Control efficacy of 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone from *Streptomyces* sp. S20-465 against cucumber anthracnose. Lesion numbers caused by *Colletotrichum orbiculare* on the 1st leaf ($n=8$) of cucumber treated with 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone (0, 0.1, 1.0, and 10 µg/ml). Error bars represent standard errors, and an asterisk indicates a statistically significant difference determined by Tukey's HSD test ($P<0.05$).

인 후 5분 동안 유지하였다. 시료(1 µl)는 split mode (20:1 ratio)로 30 ml/min 속도로 기화실(280°C)로 주입하고, 70 eV로 이온화시켰다. Ion source와 mass transfer line의 온도는 각각 275°C와 280°C로 설정하였고, scan mode로 35-350 amu 질량 범위의 이온을 모두 검출하였다. 추출물의 구성 요소는 NIST MS Search Library Software version 2.0 (www.chemdata.nist.gov)의 mass spectra 기반으로 동정하였다. 총 3회 독립적으로 배양 및 추출하여 GC-MS 분석을 수행한 결과, 분석한 시료에서 주요 성분은 retention time 12.93 min의 peak로 GC-MS profile을 NIST library와 비교한 결과 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone (92% probability)으로 확인되었다(Fig. 2C). 오이 유묘 검정을 수행하기 위해, Sigma-Aldrich에서 구매한 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone을 오이 1엽에 0, 0.1, 1, 10 µg/ml의 농도 (0.02% Tween 20 첨가)로 처리하였다. *C. orbiculare*의 분생포자 현탁액(5×10^5 spores/ml; 0.02% Tween 20 첨가)을 엽면 살포하여 접종한 후 24시간 동안 dew chamber에서 습실 처리하였다. 처리 후 배양실(28°C, 상대습도 60%, 16시간/8시간 광암 조건)에서 1주일 재배한 뒤에 오이 탄저병을 평가하였다. 무처리구에서는 병반수가 6.71 ± 0.81 개였던 반면에, 1.0 µg/ml과 10 µg/ml 처리구에서는 각각 병반수가 2.88 ± 0.01 개와 2.88 ± 0.72 개로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3). 따라서, *Streptomyces* sp. S20-465가 생산하는 4-hydroxyl-4-methyl-2-pentanone은 오이 탄저병을 억제하는 효과가 있으며, 오이 탄저병 방제 유

용 소재로 활용될 수 있을 것이다. Al-Daghari 등(2020)은 *Pseudomonas resinovorans* B11이 muskmelon에 *Monosporascus* root rot과 vine decline disease를 일으키는 *Monosporascus cannonballus*에 대해 항진균 활성이 있으며, B11이 생성하는 항진균 활성물질로 4-hydroxyl-4-methyl-2-pentanone을 보고하였다. *Chinus molle* 열매 추출물에 함유되어 있는 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone은 *Staphylococcus aureus*와 *Candida albicans* 같은 인체병원성 세균과 곰팡이에 대해 항생 효과가 있는 것이 보고되었다(Al-Andal 등, 2019). 이와 유사하게 El Zawawy 등(2020)도 대형 조류 *Cladostephus spongiosus* 추출물이 칸디다혈증(candidemia)을 일으키는 인체병원균 *Candida krusei*의 병원성과 관련된 바이오필름(biofilm) 생성과 이미 형성된 바이오필름의 viability를 감소시키며, *C. spongiosus* 추출물의 주요 활성물질 중 하나로 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone을 규명하였다. 이전의 연구 결과는 대부분 약용식물 등 식물체 또는 조류(algae) 추출물에서 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone을 동정하였으며, 인체 병원성 미생물을 대상으로 배양검정 조건에서 항생효과가 있는지 검증한 사례가 대부분이었다. 본 연구에서는 *Streptomyces* sp. S20-465이 생성하는 대사물질의 후보성분으로 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone을 동정하였으며, 식물체 엽면 살포하여 오이 탄저병을 방제하는 효과가 있는지 검증하여 식물병 방제 소재로 활용될 수 있는 가능성을 제시하는 것에 의의가 있다.

요 약

오이(*Cucumis sativus* L.)은 국내에서 경제적으로 중요한 작물이며, 지속 가능한 생산을 위해서는 다양한 식물병을 효과적으로 관리해야 한다. 본 연구에서는 이전의 연구에서 선발한 오이 탄저병 억제 *Streptomyces* sp. S20-465가 생성하는 대사산물을 동정하고, *Colletotrichum orbiculare*에 의한 오이 탄저병 방제에 대한 효과를 규명하였다. *Streptomyces* sp. S20-465는 YEME 배지에서 효과적으로 성장, 포자 형성 및 항진균 활성이 있었으며, 배양 여과액의 *n*-hexane 추출물에 함유된 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone이 오이 탄저병을 효과적으로 억제하였다. 본 연구 결과는 *Streptomyces* sp. S20-465 유래 대사산물이 오이 탄저병 등 식물병 관리에 효과적인 소재로 활용될 수 있음을 제시하며, 이는 오이 생산을 지속 가능하게 향상시키는 방안이 될 수 있을 것이다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgments

This work was supported by the National Institute of Agricultural Sciences (Project No. RS-2020-RD009033, PJ PJ01497802), Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Al-Andal, A., Moustafa, M. and Alrumman, S. 2019. Variations in chemicals and antimicrobial properties of *Schinus mole* fruits grown in Abha area, Saudi Arabia. *Arab. J. Sci. Eng.* 44: 87-101.
- Al-Daghari, D. S. S., Al-Mahmooli, I. H., Al-Sadi, A. M., Al-Sabahi, J. N. and Velazhahan, R. 2020. Production of antifungal metabolites by the antagonistic bacterial isolate *Pseudomonas resinovorans* B11. *Indian Phytopathol.* 73: 771-775.
- Chai, C. H., Hong, C.-F. and Huang, J.-W. 2022. Identification and characterization of a multifunctional biocontrol agent, *Streptomyces griseorubiginosus* LJS06, against cucumber anthracnose. *Front. Microbiol.* 13: 923276.
- El Zawawy, N. A., El-Shenody, R. A., Ali, S. S. and El-Shetehy, M. 2020. A novel study on the inhibitory effect of marine macroalgal extracts on hyphal growth and biofilm formation of candidemia isolates. *Sci. Rep.* 10: 9339.
- Kim, B. S., Moon, S. S. and Hwang, B. K. 1999. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Can. J. Bot.* 77: 850-858.
- Kim, B.-R., Hahm, S.-S., Kwon, M.-K., Kim, Y.-J., Kim, W.-S. et al. 2021. Environment-friendly control of cucumber downy mildew using chlorine dioxide. *Res. Plant. Dis.* 27: 149-154. (In Korean)
- Kim, D. R. and Kwak, Y.-S. 2023. Optimization of culture and sporulation for two plant beneficial *Streptomyces* strains. *Res. Plant Dis.* 29: 174-183. (In Korean)
- Kim, J., Kim, J.-C. and Sang, M. K. 2023. Identification of isomeric cyclo(leu-pro) produced by *Pseudomonas sesami* BC42 and its differential antifungal activities against *Colletotrichum orbiculare*. *Front. Microbiol.* 14: 1230345.
- Kim, J. and Sang, M. K. 2023. Biocontrol activities of *Peribacillus butanolivorans* KJ40, *Bacillus zanthoxyli* HS1, *B. siamensis* H30-3 and *Pseudomonas* sp. BC42 on anthracnose, bacterial fruit blotch and Fusarium wilt of cucumber plants. *Res. Plant Dis.* 29: 188-192. (In Korean)
- Kim, Y.-K., Park, S.-H., Um, D.-O., Hong, S.-J., Cho, J.-L., Ahn, N.-H. et al. 2018. Control of cucumber downy mildew using resistant cultivars and organic materials. *Res. Plant. Dis.* 24: 153-161. (In Korean)
- Kwak, H.-S., Kim, J., Park, J. W. and Sang, M. K. 2021. Selection of antagonistic soil actinomycetes against both *Colletotrichum orbiculare* and *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *Korean J. Org. Agric.* 29: 575-588. (In Korean)
- Lee, Y. J., Ko, Y. J. and Jeun, Y. C. 2016. Illustration of disease suppression of anthracnose on cucumber leaves by treatment with *Chlorella fusca*. *Res. Plant. Dis.* 22: 257-263. (In Korean)
- Olanrewaju, O. S. and Babalola, O. O. 2019. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 1179-1188.
- Wedge, D. E. and Nagle, D. G. 2000. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. *J. Nat. Prod.* 63: 1050-1054.