



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사학위논문

Cinnamon bark 등 식물체 정유 4종,
정유 유래 성분 및
trans-cinnamaldehyde 유도체의 수목
병원균 3종에 대한 항균 활성 및
작용기작

Antimicrobial activity and mode of action of four
plant essential oils, their constituents and
trans-cinnamaldehyde derivatives against three
tree pathogens

2018년 2월

서울대학교 대학원
산림과학부 산림환경학전공
이 지 은

Cinnamon bark 등 식물체 정유 4종, 정유
유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde
유도체의 수목 병원균 3종에 대한 항균
활성 및 작용기작

Antimicrobial activity and mode of action of four plant
essential oils, their constituents and *trans*-cinnamaldehyde
derivatives against three tree pathogens

지도교수 박 일 권

이 논문을 농학석사학위논문으로 제출함

2018년 2월

서울대학교 대학원

산림과학부 산림환경학전공

이 지 은

이지은의 석사학위논문을 인준함

2018년 2월

위 원 장 강 규 석 (인)
부 위 원 장 박 일 권 (인)
위 원 박 필 선 (인)

초 록

본 연구는 cinnamon bark, cumin, lemongrass 및 wintergreen 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체를 대상으로 참나무시들음병(*Raffaelea quercus-mongolicae* K.H. Kim, Y.J. Choi & H.D. Shin), 모잘록병(*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn), 그리고 근두암증병(*Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend)에 대한 훈증 및 접촉 항균 활성을 검정하고 작용기작을 규명하였다.

식물체 정유에 대한 훈증 항균 활성을 검정한 결과, *R. quercus-mongolicae*에서는 cinnamon bark (*Cinnamomum verum*)와 lemongrass (*Cymbopogon citratus*)가 5 μ l/paper disc 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다. *R. solani*에서는 cinnamon bark가 1.25 μ l/paper disc 농도에서, lemongrass가 2.5 μ l/paper disc 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다. *A. tumefaciens*에서는 wintergreen (*Gaultheria fragrantissima*), lemongrass, cinnamon bark 및 cumin (*Cuminum cyminum*)이 10 μ l/paper disc 농도에서 각각 2.20 cm, 1.76 cm, 1.50 cm, 1.04 cm의 생육저지환(inhibition zone)이 나타났다.

식물체 정유에 대한 접촉 항균 활성을 검정한 결과, *R. quercus-mongolicae*에서는 cinnamon bark, cumin 및 lemongrass의 MIC 값이 각각 250 μ g/ml, 800 μ g/ml, 450 μ g/ml 으로 나타났다. *R. solani*에서는 cinnamon bark, cumin 및 lemongrass의 MIC 값이 각각 200 μ g/ml, 850 μ g/ml, 400 μ g/ml 으로 나타났다. *A. tumefaciens*에서는 cinnamon bark, cumin 및 lemongrass의 MIC 값이 각각 250 μ g/ml, 900 μ g/ml, 450 μ g/ml 으로 나타났다.

식물체 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체에 대한 훈증

항균 활성을 검정한 결과, *R. quercus-mongolicae*에서는 salicylaldehyde가 0.625 $\mu\text{l}/\text{paper disc}$ 농도, eugenol 및 hydrocinnamaldehyde가 2.5 $\mu\text{l}/\text{paper disc}$ 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다. *R. solani*에서는 *trans*-cinnamaldehyde는 0.3125 $\mu\text{l}/\text{paper disc}$ 농도, neral과 hydrocinnamaldehyde은 1.25 $\mu\text{l}/\text{paper disc}$ 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다. *A. tumefaciens*에서는 salicylaldehyde, hydrocinnamaldehyde, cuminaldehyde 및 *trans*-cinnamaldehyde가 각각 2.80 cm, 2.26 cm, 2.08 cm, 1.92 cm의 생육저지환(inhibition zone)이 나타났다.

식물체 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체에 대한 접촉 항균 활성을 검정한 결과, *R. quercus-mongolicae*에서는 neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, *trans*-anethole, eugenol, cinnamyl alcohol 및 hydrocinnamaldehyde의 MIC 값은 각각 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 850 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 농약인 benomyl, propiconazole 그리고 tebuconazole의 MIC 값은 각각 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. *R. solani*에서는 neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, *trans*-anethole, eugenol, cinnamyl alcohol 및 hydrocinnamaldehyde의 MIC 값은 각각 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 농약인 benomyl, propiconazole, 그리고 tebuconazole의 MIC 값은 각각 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. *A. tumefaciens*에서는 neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol 및 cinnamyl alcohol의 MIC 값은 각각 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 650 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350

µg/ml로 나타났다. 항생제인 streptomycin sulfate salt의 MIC 값은 3.125 µg/ml로 나타났다.

결론적으로 수목병원균 3종에 대한 혼증 및 접촉 항균 활성이 우수한 정유는 cinnamon bark, lemongrass이고, 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체는 neral, geranial 그리고 *trans*-cinnamaldehyde이다.

또한 수목병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 항균 활성이 우수한 cinnamon bark 및 lemongrass 정유를 대상으로 인공혼합물에 따른 상대적 항균 활성을 비교한 결과, cinnamon bark 정유 유래 성분 중 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 인공혼합물이 수목병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 항균 활성이 크게 낮아졌고 lemongrass 정유 유래 성분 중 neral, geranial이 각각 제거된 인공혼합물이 수목병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 항균 활성이 크게 낮아졌다.

결론적으로 cinnamon bark 정유의 수목병원균 3종에 대한 혼증 및 접촉 항균 활성에는 *trans*-cinnamaldehyde가 가장 기여도가 높으며, lemongrass 정유의 수목병원균 3종에 대한 혼증 및 접촉 항균 활성에는 neral 및 geranial이 기여도가 높았고 그 중에서도 geranial이 가장 기여도가 높았다.

또한 식물체 정유, 정유 유래화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 작용기작을 규명하기 위하여 활성이 우수한 *trans*-cinnamaldehyde 그리고 salicylaldehyde을 혼증 처리한 *A. tumefaciens*의 차등발현유전자(differentially expressed genes) 및 유전자 집단(Gene ontology)을 탐색하였다. 그 결과 모든 실험군에서 hydroxyl radical(활성산소종, Reactive oxygen species)을 조절하는 유전자의 발현이 억제되었음을 확인하였다. 이를 바탕으로 유전자 발현이 실제

생체반응으로 이어지는지 세포 내 활성산소종 발현 및 세포막 파괴를 검정한 결과, 수목병원균 3종에 대하여 식물체 정유인 cinnamon bark와 lemongrass, 정유 유래화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체인 *trans*-cinnamaldehyde, neral, geranial, salicylaldehyde 그리고 hydrocinnamaldehyde를 혼증처리시 대조구에 비하여 활성산소종이 과발현되었으며 세포막이 파괴되는 것으로 나타났다.

결론적으로 식물체 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체를 처리한 수목 병원균 3종은 활성산소종을 조절하지 못하게 되고 이로 인해 세포막이 손상되어 사멸한 것으로 추측된다.

주요어: 식물체 정유, 참나무시들음병, 모잘록병, 근두암종병, 혼증 항균 활성, 접촉 항균 활성, 활성산소종, 세포막 파괴

학 번: 2016-21461

목 차

제 1 장 서 론	1
제 2 장 연구사	5
1. 식물체 정유 향균 활성 연구	5
2. 향균활성의 작용기작	9
3. 향균 활성에 따른 차등발현유전자	12
제 3 장 재료 및 방법	13
1. 공시균주	13
2. 식물체 정유 및 화합물	14
3. 정유 성분의 분석	17
4. 혼증법을 이용한 향균 활성 검정	18
4-1. 혼증법을 이용한 향진균 활성 검정	18
4-2. 혼증법을 이용한 향세균 활성 검정	19
5. 직접 접촉법을 이용한 향균 활성 검정	19
5-1. 직접 접촉법을 이용한 향진균 활성 검정	19
5-2. 직접 접촉법을 이용한 향세균 활성 검정	20
6. 인공 혼합물(artificial blends)에 따른 상대적 향균 활성 검정	21
7. RNA염기서열분석 결과	22

7-1. 분석 데이터 전처리	23
7-2. 레퍼런스 어셈블리(Reference assembly)	23
7-3. 차등발현유전자 검색	24
7-4. 차등발현유전자집단 검색	25
8. 세포 내 활성산소종(ROS) 발현검정	26
8-1. 진균 활성산소종 발현 검정	26
8-2. 세균 활성산소종 발현 검정	27
9. 세포막 파괴 검정	28
9-1. 진균 세포막 파괴 검정	28
9-2. 세균 세포막 파괴 검정	29
10. 통계	30
제 4 장 결과	31
1. 식물체 정유(plant essential oil)	31
1-1. 훈증 항균 활성	31
1-2. 접촉 항균 활성	35
1-3. 4종의 식물체 정유 성분 동정	36
2. 식물체 정유 유래 성분 및 <i>trans</i> -cinnamaldehyde 유도체의 항균활성	41
2-1. 훈증 항균 활성	41

2-2. 접촉 항균 활성	48
3. 인공혼합물에 따른 상대적 항균활성 결과	51
3-1. 훈증 항균 활성	51
3-2. 접촉 항균 활성	58
4. RNA염기서열분석 결과	62
4-1. 분석데이터 전처리	62
4-2. 레퍼런스 어셈블리	64
4-3. 차등발현유전자	66
4-4. 차등발현유전자집단	83
5. 세포 내 활성산소종(ROS) 발현결과	90
5-1. Confocal을 이용한 활성산소종 발현 관찰	90
5-2. Microplate reader를 이용한 활성산소종 발현량 측정	99
6. 세포막 파괴 검정 결과	100
6-1. Confocal을 이용한 세포막 파괴 관찰	100
6-2. Microplate reader를 이용한 세포막 파괴량 측정	109
제 5 장 고찰	110
1. 식물체 정유의 항균 활성	110
2. 식물체 정유 유래 성분 동정	112

3. 식물체 정유 유래 성분 및 <i>trans</i> -cinnamaldehyde 유도체의 항균활성	113
4. 인공혼합물에 따른 화합물의 상호작용	117
5. 식물체 정유의 항균 활성 작용기작	120
5-1. 정유 유래 성분 및 <i>trans</i> -cinnamaldehyde 유도체의 구조와 항균활성	120
5-2. <i>trans</i> -Cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde의 차등발현유전자	124
제 6 장 결론	128
인용문헌	130

List of Tables

Table 1. Tree pathogenic fungi and bacteria used in this study	13
Table 2. List of plant essential oils used in this study	14
Table 3. List of compounds used in this study	16
Table 4. Assembly of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
Table 5. Fumigant antifungal activity of essential oils against <i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	32
Table 6. Fumigant antifungal activity of essential oils against <i>Rhizoctonia solani</i>	33
Table 7. Fumigant antibacterial activity of essential oils against <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
Table 8. Contact antimicrobial activity of essential oils against three tree pathogens	35
Table 9. Chemical analysis of four active essential oils	39

Table 10. Fumigant antifungal activity of compounds from active essential oils against <i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	42
Table 11. Fumigant antifungal activity of compounds from active essential oils against <i>Rhizoctonia solani</i>	44
Table 12. Fumigant antibacterial activity of compounds from active essential oils against <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
Table 13. Contact antimicrobial activity of compounds identified in active essential oils	49
Table 14. Contact antimicrobial activity of cinnamon bark oil & artificial blends against of three pathogen	60
Table 15. Contact antimicrobial activity of lemongrass oil & artificial blends against of three pathogen	61
Table 16. Summary of sequences analysis	63
Table 17. Summary of mapping results	65
Table 18. The number of differnetially expressed genes in this study	66
Table 19. Significantly down-regulated genes of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated <i>trans</i> -cinnamaldehyde	67

Table 20. Significantly up-regulated genes of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated <i>trans</i> -cinnamaldehyde	71
Table 21. Significantly down-regulated genes of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated salicylaldehyde	75
Table 22. Significantly up-regulated genes of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated salicylaldehyde	79
Table 23. Gene ontology down-regulated groups of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated <i>trans</i> -cinnamaldehyde	84
Table 24. Gene ontology up-regulated groups of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated <i>trans</i> -cinnamaldehyde	86
Table 25. Gene ontology down-regulated groups of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated salicylaldehyde	87
Table 26. Gene ontology up-regulated groups of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> treated salicylaldehyde	89

List of Figures

Figure 1. Structure of <i>trans</i> -cinnamaldehyde and its congeners	15
Figure 2. The Pretreatment for RNA-seq	22
Figure 3. Gas chromatograms of four active oils	36~38
Figure 4. Fumigant antimicrobial activity of cinnamon bark oil & artificial blends	54~55
against of three pathogen	
Figure 5. Fumigant antimicrobial activity of lemongrass oil & artificial blends against of three pathogen	56~57
Figure 6. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in <i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	90~92
Figure 7. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in <i>Rhizoctonia solani</i>	93~95
Figure 8. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	96~98
Figure 9. Measurement of ROS fluorescent intensity using microplate reader in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99

Figure 10. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in <i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	100~102
Figure 11. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in <i>Rhizoctonia solani</i>	103~105
Figure 12. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	106~108
Figure 13. Measurement of Cell membrane damage using microplate reader in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	109
Figure 14. Hypothesis for mechanism of differentially expressed gene clusters 1	127
Figure 15. Hypothesis for mechanism of differentially expressed gene clusters 2	127

제 1 장 서 론

국내의 참나무시들음병의 주 피해 수목은 신갈나무이며 이 외에도 갈참나무, 졸참나무에 많은 피해를 주고 상수리나무, 굴참나무, 떡갈나무 등에서 그 피해가 알려져 있다. 참나무시들음병이 처음 발견된 것은 2004년 8월 하순 경기도 성남에서 참나무류가 집단 고사현상을 보이면서 부터이며 정밀조사 결과 매개충인 광릉긴나무좀(*Platypus koryoensis*)에 의해 병원균인 *Raffaelea quercus-mongolicae* (신종)가 감염되는 것으로 밝혀졌다. 참나무시들음병의 국내피해발생의 특징은 저해발 지역에서 확산 속도가 빠르며 침입목의 고사율은 17~21%, 재침입율은 69~86%에 달한다. 참나무는 임지보전, 경관적 가치뿐만 아니라 숲, 버섯재배 등에 활용되는 유용자원으로써 보존시킬 필요성이 높은 수목으로 발병이후 다양한 방제 방법들이 사용되고 있다(김경희 등, 2010). 방제 방법에는 소구역모두베기, 끈끈이트랩, 벌채소각, 벌채훈증, 살충제 나무주사 등이 있으며 단독으로 사용하기 보다는 복합적으로 시행되고 있다. 여러 방제 방법 중 가장 많이 사용되고 있는 방법은 살충, 살균 효과를 지닌 메탐소디움을 이용한 벌채훈증이다. 벌채훈증방법은 피해목을 1m 길이로 잘라 밀봉한 뒤 메탐소디움으로 일정기간 훈증 처리하는 방식이다(Suh *et al.*, 2012). 이러한 방제 방법과 노력으로 2008년 가장 큰 피해를 본 이후 점차 피해목수가 감소하여 2016년 9월 기준 전체 피해목의 본수는 208,036본으로 2015년 대비 11.2% 감소(-26,208)하였다. 그러나 서울지역의 경우 지속적으로 높은 고사율을 보이고 있어 방제와 더불어 참나무시들음병균의 병원성과 관련하여 지속적인 연구가 필요하다(남영우 등, 2017).

모잘록병의 피해는 18세기 유럽의 침엽수 묘목에서 처음 알려진 이후 19세기에 *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* 등의 균들에 의해 발병되는 것으로 알려져 있다. 모잘록병원균은 토양 상층에 부생영양(saprotroph)을 하다 적절한 환경이 조성되면 병원성을 띄게 되며 주 피해 수목은 소나무류, 일본잎갈나무와 같은 침엽수와 참나무류, 자작나무류, 가시나무류와 같은 활엽수 등이 있다. 모잘록병원균 중 하나인 *Rhizoctonia solani* Kuhn [telemorph: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]은 토양전염성균으로써 식물체의 뿌리조직에 감염되면 해리(maceration)를 일으키며 지속적인 성장감소가 일어난다. 또한 *R. solani*는 전 세계적으로 발생하며 잠재적으로 모든 식물 종을 감염시킬 수 있다. 특히 경제적으로 유용한 야채류, 들잔디류, 과일 및 산림 수목 등이 감염될 경우 200여개의 작물에서 연평균생산량이 20% 절감하는 것으로 알려져 있다(이상현 등, 2009; Stępniewska-Jarosz *et al*, 2006). 모잘록병의 방제방법에는 묘포의 위생, 환경정리, 토양소독, 종자소독, 시비, 약제 살포 등의 복합적인 방제법을 사용하며 크게 환경개선에 의한 방제와 화학적 방제로 나뉜다. 화학적 방제의 경우 병의 예방적 차원에서 파종 1주 전 하이멕사졸 액제 30% 100배약을 묘상 1㎡당 3~5 L를 관주하거나 티오파네이트메틸 수화제 50%, 티람 수화제 30% 200 배액에 하루 침지 후 파종한다. 그러나 병이 발생하면 하이멕사졸 액제 30% 600~1,000 배액을 물조리개로 묘당 1㎡당 3~4 L씩 관주한다(이상현 등, 2009).

근두암중(crown gall)은 고등식물에 발생하는 병으로 100년 이상 전 세계 농업 분야에 피해를 주었으며 특히 과수원, 포도원에서 발병하여 문제가 되어왔다. 근두암중의 병원체는 *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend로 토양에서 월동하며 식물을 기주로 하지 않을 시 부생영양을 통해 살아갈 수 있는 토양 병원성 그람음성세균이다. *A.*

*tumefaciens*의 기주범위는 90여과 600여종에 속하며 대부분의 쌍자엽 식물에 영향을 미치고 특히 과실수, 관상용 식물, 포도나무 및 포플러류, 뱀나무류, 자작나무류 등의 산림 수목에 피해를 가하고 있다. *A. tumefaciens*가 식물에 감염되면 식물의 정상세포를 형질 변환시켜 세포가 이상증식 및 비대를 일으키게 된다(Otten *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2009; 이상현 등, 2011). 근두암종의 방제방법에는 비료나 관수 등을 조절하는 재배적 방제, *Agrobacterium radiobacter* K84를 이용한 생물학적 방제 및 화학적 방제가 있다. 화학적 방제의 경우 발병부위에 콜히친(colchicine)을 처리하여 침투시키거나 페니실린, 스트렙토마이신 등의 항생제를 접종하는 방법이 있다(New&Kerr, 1972; Booth, 1958).

현재 참나무시들음병, 모잘록병 및 근두암종의 화학적 방제방법은 화학농약에 의존되고 있다. 이러한 화학농약의 사용은 직접적인 관점에서 작물 생산에 드는 비용과 편익을 생각했을 때는 이득이지만 간접적으로는 인축에 대한 독성, 저항성 균주의 출현, 유용 천적 및 미생물의 감소, 벌의 중독으로 인한 수분작용감소, 지하수 및 표면수 오염 등으로 더 큰 환경적 비용을 야기한다(Pimentel *et al.*, 1992). 따라서 화학농약의 문제점을 해결하고 효과적으로 위해미생물을 방제하기 위한 대체 방법 중 하나로 식물체 추출물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식물체 추출물 중 식물체 정유는 식물이 미생물이나 곤충에 공격을 받을 때 합성되는 이차 대사산물을 포함하며 대체로 액상형으로 강한 냄새와 휘발성을 띤다. 식물체 정유의 주요 성분은 monoterpene, allyl 및 isoallyl phenol류 그리고 diterpene류이며 이러한 성분들은 항균, 항바이러스, 살선충 및 살충 효과가 보고되어 식품, 농업, 화장품 및 의·약학 분야에서 다양한 형태로 사용되어지고 있다(Murbach *et al.*, 2014; Franz&Novak, 2009). 또한 식물체 정유는 개발 및 제조비용이 화학농약

에 비하여 낮고 비 표적 생물이나 환경에 대한 유해성이 적으며 현재 사용되는 항생제에 내성을 가진 균들에도 효과를 나타내고 있다(이동운, 2013; Warnke *et al.*, 2009). 따라서 식물체 정유로부터 항균활성물질을 탐색하고 이를 이용한 생물농약 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 국내에서도 식물체 정유를 이용한 식물병원균의 생장 억제 효과에 대한 연구가 진행되고 있으며 최근 지속가능한 농업을 위하여 식물체 정유와 살균제를 혼합하여 화학농약을 감량하는 방향으로도 연구가 진행되고 있다(김우식과 박지성, 2013). 그러나 수목병원균과 관련한 연구 및 식물체 정유의 항균활성 작용기작에 대한 연구는 미흡한 편이다(Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; 김정은, 2017).

따라서 본 연구에서는 참나무시들음병, 모잘록병 및 근두암종에 대하여 cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 혼증 및 접촉 항균 활성을 검정하고 정유 내 화합물 간의 상호작용에 따른 항균 활성도 검정하였다. 또한 *A. tumefaciens*에 대한 정유 유래 화합물의 작용기작을 알아보기 위하여 유전자 발현 양상을 분석하고 이를 바탕으로 세포 내 활성산소종 발현 및 세포막 파괴 정도를 검정하여 생물적 방제제로서의 가능성을 탐색하였다.

제 2 장 연구사

1. 식물체 정유 향균 활성 연구

식물체 정유는 식물의 일부나 또는 전체를 물리적인 수단[압축(pressing), 증류(distillation)]에 의해 분리한 것만을 의미하며 휘발성을 띤 화합물의 복합체이다. 식물체 정유의 성분은 주로 terpene류 이지만 단일 물질로는 수 없이 많은 물질들이 존재하며 대부분의 단일물질은 각각 생태적 기능이 다르게 작용한다. 또한 같은 식물체에서 유래한 정유라도 식물의 부분이 다르면 구성요소가 다를 수 있다(Franz&Novak, 2009). 식물체 정유는 19세기 후반 Buchholtz의 caraway oil과 thyme oil을 이용한 세균성장억제 연구를 시작으로 오늘날까지 많은 연구자들에 의해 향균 활성이 입증되어 왔으며 현재 이를 기반으로 다양한 분야에서 식물체 정유가 이용되고 있다(Pauli&Schilcher, 2009)

시나몬(Cinnamon, *Cinnamomum verum* J.)은 스리랑카에서 “Kurundu”라 불리우는 고유식물로써 녹나무과(Lauraceae)에 속하며 현재 인도, 아프리카, 남아메리카 등의 지역에서 상업용으로 재배되고 있다. 시나몬을 이용한 식물체 정유는 껍질, 잎, 뿌리, 과일 등을 이용하며 각각에 들어있는 성분 및 농도는 서로 다르지만 cinnamaldehyde 및 eugenol을 공통적으로 함유하고 있다. 그 중 시나몬 껍질 정유는 항염증, 항산화, 항암, 항당뇨의 활성을 지닌 cinnamaldehyde를 가장 많이 함유하고 있다. 뿐만 아니라 cinnamaldehyde는 의·약학 및 농업 분야에서 다양한 향균활성이 알려져 있다(Paranagama *et al.*, 2010; Charles, 2012).

시나몬 껍질 정유는 저장 곡류에서 발생하는 누룩곰팡이 2종(*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ruber*)과 식물병원성 곰팡이 2종(*Alternaria porri*, *Fusarium oxysporum f. sp. cicer*)에 대한 항균 활성이 알려져 있다(Jham et al., 2005; Pawar&Thaker, 2007).

또한 시나몬 껍질 정유는 인축 및 식물에 병원성을 띄는 *Pseudomonas aeruginosa* 및 인체 병원성 세균인 *Escherichia coli* O157:H7에 대하여 생물막(Biofilm) 형성을 억제시키며 *P. aeruginosa*에 특이적으로 작용하여 독소 생산[pyocyanin, Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)], 세균 운동성(swarming motility) 및 용혈 활성(hemolytic activity) 등을 억제한다(Kim et al., 2015).

시나몬 껍질 정유에 다량 함유되어 있는 cinnamaldehyde는 항균활성을 나타내며 진균 및 세균의 80%를 억제한다고 알려져 있다(Chudasama&Thaker, 2012). Cinnamaldehyde는 식물병원성 곰팡이인 *Phytophthora capsici*의 세포 내 Ca^{2+} 유출을 유도하여 성장을 억제하며 세포막 물질 중 하나인 ergosterol의 합성을 저해한다고 알려져 있다(Hu et al., 2013). 또한 과일 수확 후 발생하는 *Colletotrichum gloeosporioides*를 포함한 식물 병원성 곰팡이 6종에 대하여 항균활성이 보고되었다(Rai, 2011).

Cinnamaldehyde의 유도체 또한 의약분야와 관련하여 항균활성 연구가 진행되고 있으며 기존에 있는 항생제와 비교하여 우수하거나 동등한 활성을 나타낸다. Cinnamaldehyde의 유도체 중 cinnamoyl moiety 작용기를 가지고 있는 유도체는 친전자체로 작용하여 특정 효소나 수용체와 반응하며 α, β -불포화 카보닐기 약물작용단(pharmacophore, 타겟에 효과를 나타내는 부분)에 의하여 다양한 약리적 기능을 나타낸다. Cinnamaldehyde의 유도체들 중 2-chloro-cinnamaldehyde와

2-bromo-cinnamaldehyde는 인체병원성균을 포함한 다양한 곰팡이류에 항균활성이 있으며 특히 폐질환, 수막염 및 뇌염 등을 유발하는 *Cryptococcus neoformans*에 강한 항균활성을 나타낸다(Shreaz *et al.*, 2016).

큐민(Cumin, *Cuminum cyminum* L.)은 미나리과(Apiaceae)에 속하며 자생지인 북아프리카에서 서아시아, 중앙아시아를 거쳐 현재는 전세계에서 재배되고 있다. 정유는 큐민 씨앗을 이용하여 만들며 cuminaldehyde, β -pinene, terpinene, ρ -cymene 등을 함유하고 있다. 큐민 정유는 각성제, 진경제 및 구풍제 등으로 사용되어지며 살충(larvicidal), 살비(acaricidal) 및 항균 활성이 우수하다(Charles, 2012). 항균 활성과 관련해서는 *Staphylococcus aureus*를 포함한 인체병원성 세균 7종과 *Penicillium chrysogenum* 및 식물병원성 곰팡이 3종, *Saccharomyces cerevisiae*를 포함한 효모 2종에 대하여 활성을 보이며 큐민 정유는 대체로 세균보다 진균에 더 항균활성이 크다고 보고되었다(Shetty *et al.*, 1994). 또한 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*를 포함한 버섯 및 식물 병원성 세균 32종에 대하여 항균 활성(Iacobellis *et al.*, 2005) 및 *Fusarium culmorum*을 포함한 식물 병원성 곰팡이 5종에 대한 항균 활성이 보고되었다(Arici *et al.*, 2011).

레몬글라스(Lemongrass, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)는 백합과(Poaceae)에 속하며 열대, 아열대 기후성 아시아 지역의 자생 식물로 현재 인도, 캐리비안, 중앙아메리카 등의 지역에서 재배되고 있다. 정유는 레몬글라스 잎을 이용하여 만들며 재배지역에 상관없이 geraniol이 가장 많이 함유되어있고 이 외에 neral, limonene, linalool등을 함유하고 있다. 레몬글라스 정유는 소화장애, 불안 장애, 감기, 및 탈진 등에 효과가 있으며 함염증, 항산화, 항균, 살충 등에 활성을

뿔다(Charles, 2012). 항균활성과 관련해서는 식물병원성 곰팡이 3종(*Alternaria porri*, *Fusarium oxysporum* f. sp. cicer, *Botrytis cinerea*)에 대하여 활성이 알려져 있으며 *F. oxysporum*에 대한 항균 활성이 더 크게 나타났다(Pawar&Thaker, 2007). 또한 식물병원성 곰팡이 중 *Fusarium* 7종에 대하여 항균활성을 띄며 특히 *F. moniliforme*과 *F. oxysporum* f. sp. *udum*에 더 강한 항균활성을 보인다(Gawai, 2015). 또 다른 식물병원성 곰팡이인 *Pseudocercospora griseola*에 대해서는 분생자세포의 초미세구조에 심각한 손상을 야기하며 발아를 억제한다고 보고되었다(Hoyos, 2012). 식물병원성 세균에 대해서는 *Ralstonia solanacearum*의 개체수 감소에 효과적이며 *R. solanacearum*가 감염된 토양에서 자란 토마토의 풋마름병 발생률 감소에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Pradhanang, 2003).

윈터그린(Wintergreen, *Gaultheria fragrantissima* Wall.)은 진달래과(*Ericaceae*)에 속하며 인도-네팔 및 인도-부탄 지역의 해발고도 1800m~2500m 지대와 인도 북동부의 구릉지에 자생한다. 정유는 잎을 이용하여 만들며 아스피린 원료인 살리실산(salicylic acid)의 유도체(methyl salicylate)가 다량 함유(96~99%)되어있다. 윈터그린 정유는 자극제, 향료 등으로 사용되며 향균, 살충, 항산화 등에 활성을 뿔다(Mukhopadhyay *et al.*, 2016). 항균활성과 관련해서는 식물병원성 곰팡이(*Alternaria chlamydospora*)에 대하여 화학농약인 만코제브 수화제(Mancozeb 0.1% wp)와 동일한 활성을 나타냈다(Vanitha, 2004). 또한 인체병원성 세균 2종(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*)에 대하여 항균 활성(Prabuseenivasan *et al.*, 2006) 및 윈터그린에 다량 함유되어있는 methyl salicylate의 식물병원성 곰팡이 3종(*Monilia fructicola*, *Monilia laxa*, *Botrytis cinerea*)에 대한 항균활성이 보고되어

있다(Chérif *et al.*, 2007).

2. 항균활성의 작용기작

식물체 정유의 항균활성은 다양한 원인에 의하여 나타나며 정확한 작용기작에 대해서는 아직 밝혀지지 않았지만 세포막 파괴가 세포사멸의 주된 원인일 것이라 가정한다. 세포막 파괴가 일어나는 가설에는 양성자 동력(proton motive force)과 관련한 세포 내 pH 구배(pH gradient, Δ pH) 및 전위(electrical potential, $\Delta \psi$) 상실, 세포 내 물질의 누출, 세포의 호흡억제, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과도한 축적 등이 있다. 양성자 동력 상실은 세포내 물질의 누출과 큰 상관성이 있다. 실제로 식물체 정유, 페놀류, 박테리오신(bacteriocin)등을 포함한 방부제는 세균의 원형질막 투과장벽(permeability barrier)에 영향을 미쳐 이온, ATP, 핵산(nucleic acid), 아미노산 및 글루탐산염(glutamate) 등의 누출을 야기하고 이는 곧 양성자 동력에 영향을 미친다(Lambert *et al.*, 2001; Marčetić *et al.*, 2013). 양성자 동력 상실, 세포 내 물질 누출, 세포의 호흡억제는 식물체 정유 및 정유 내의 monoterpene 성분인 세포의 구조와 기능에 미치는 악영향에 기인한다. 고리형 모노테르펜은 친유성 성질을 가지고 있기 때문에 세포 내에서 세포막 구조로 전환된다. 이러한 전환은 세포막 팽창을 유발하며 세포막 유동성을 증가시키고 세포막 효소들의 기능을 저해한다. 예를 들어 α -pinene, β -pinene은 위의 작용을 거쳐 호흡 및 이온의 수송 과정을 억제하고 세포막 투과성을 증가시켜 세포막을 파괴한다(Cox *et al.*, 2000).

최근 연구에 따르면 *Coriandrum sativum* 정유는 *Candida rugosa*를 포함한 인체병원성 곰팡이 5종에 대하여 균의 세포막 인지질(ergosterol)에 결합하여 이온의 막 투과성을 증가시키고 세포막

파괴를 유도한다고 보고되었다(de Almeida Freires *et al.*, 2014). 또한 *Cudrania tricuspidata* 정유는 *Bacillus cereus*를 포함한 인체병원성 세균 5종에 대하여 세포 내 ATP 및 칼륨이온 누출 등을 통해 세포막 파괴를 유도한다고 보고되었다(Bajpai *et al.*, 2013).

활성산소종은 산소를 포함한 작은 분자이며 세포 내에서 화학적으로 반응성을 띤다. 활성산소종은 서로 다른 세포구획에서 다양한 형태(O_2^- , H_2O_2 , OH^- 등)로 존재하며 확산하는 성질로 인해 적은 양으로도 세포 분화 및 발달의 신호를 전달할 수 있다. 활성산소종의 생성은 호흡연쇄(respiratory chain)의 단순 부산물이나 세포 항상성 및 신호연쇄(signaling cascades)와 관련한 효소반응에 의해서 생성된다. 효소반응과 관련한 활성산소종의 주요 생성원은 NADPH-산화효소 복합체(NADPH-oxidase complexes, Nox)이며 Nox는 막으로부터 전자를 이동시켜 O_2^- 를 생성한다. 그러나 활성산소종이 세포 내에 축적되면 DNA, 단백질, 지질 등의 거대분자와 비 특이적으로 상호작용하는 해로운 분자로 전환된다. 하지만 치명적인 외부자극이 없을 경우에는 활성산소종 생성과 소멸은 적절한 평형을 이루게 된다. 모든 생물은 증가된 활성산소종에 대처하기 위해서 활성산소종 생성 효소에 대응하는 진화된 소멸체계가 있다. 소멸 체계에는 글루타치온(glutathione) 체계와 같은 비 효소적 방어반응과 활성산소종 해독을 촉진하는 다양한 효소반응이 있다. 효소반응 중 O_2^- 를 저하시키는 핵심적인 효소는 O_2^- 를 H_2O_2 로 변환시키는 O_2^- 불균등화 효소(superoxide dismutase)이다. 또한 H_2O_2 는 peroxidase와 catalase에 의하여 처리된다(Marschall&Tudzynski, 2014). 그러나 균이나 세균에 항생제, 식물체 정유 및 정유 유래 화합물과 같은 외부자극이 가해지면 활성산소종 증가가 일어나게 된다. 외부자극에 의해 증가되는 활성산소종 중 펜톤반응(fenton reaction,

처리되지 못한 H_2O_2 와 Fe^{+2} 의 화학반응)을 통해 생성되는 hydroxyl radical(OH \cdot)은 반응성이 크며 활성산소종 중 독성이 매우 강하다. hydroxyl radical은 DNA를 산화하여 DNA 부가물을 생성하거나 지질을 산화하여 과산화 지방질(lipid peroxidation) 등을 생성함으로써 세포 내의 독성을 유발한다. 그 중 과산화 지방질은 막의 소수성 인지질을 방해하고 막 유동성을 증가시킴으로써 막의 구조적, 기능적 기형을 야기하며 결국 세포막 손상을 일으킨다(Khan *et al.*, 2011; Kohanski *et al.*, 2007).

관련 연구에 따르면 ciprofloxacin을 포함한 수많은 항생제들은 세균 세포에 작용하여 활성산소종의 생성을 자극하며 이는 세포 사멸을 유발한다고 보고되었다(Goswami *et al.*, 2006). 또한 *Anethum graveolens* 정유는 인체병원성 곰팡이 *Candida albicans*에 대하여 미토콘드리아 막 기능을 상실하게 하고 이는 곧 *C. albicans* 세포 내 활성산소종 축적을 야기한다고 보고되었다(Chen *et al.*, 2013). 이외에도 *Monarda punctata* 정유 및 정유 유래 성분 thymol은 인체병원성 세균 *Streptococcus pyogenes*의 세포 내 활성산소종의 근본적인 증가를 야기하고 세포막 손상을 야기한다고 보고되었다(Li *et al.*, 2014).

3. 항균활성에 따른 차등발현유전자

원핵세포 및 진핵세포는 DNA 안에 세포의 유전정보가 담겨 있으며 유전자 발현을 통해 세포 및 개체의 형질발현을 조절한다. 유전자 발현은 외부적인 자극(항생제 등)에 의하여 감소되거나 증가될 수 있으며 이러한 발현의 차이로 인해 세포의 운명이 결정된다(Bouchard *et al.*, 1997; Islam *et al.*, 1997).

세포의 사멸에 관여하는 활성산소종의 방어체계로는 O_2^- 불균등화 효소, peroxidase 및 catalase와 같은 효소적 방어체계와 Zn^{2+} , 글루타치온과 같은 비효소적 방어체계가 있으며 이들은 각각의 관련 유전자 발현에 따라 생산이 결정된다. 현재까지 연구된 바에 의하면 주로 효소적 방어체계와 관련한 유전자 발현의 억제에 의하여 활성산소종의 증가를 야기하며 이는 곧 세포 손상 및 그로 인한 세포사멸을 유발한다.

관련 연구에 따르면 만성 궤양염의 진행과 관련한 형질 전환 성장 인자- $\beta 1$ (Transfoming growth factor- $\beta 1$)는 햄스터 궤양 β 세포의 catalase 및 glutathione peroxidase (글루타치온을 이용하여 H_2O_2 를 물로 환원시키는 효소)의 mRNA 발현을 억제하고 효소들의 활성을 감소시켰으며 이는 곧 활성산소종으로 인한 세포사멸을 유도하였다(Islam *et al.*, 1997). 또한 약용식물 *Plumbago zeylanica* L.의 구성성분인 plumbagin을 처리한 전립선 암 세포는 O_2^- 불균등화 효소 및 catalase의 mRNA 발현이 억제되었고 glutathione peroxidase의 mRNA 발현이 상승하였으며 이로 인한 글루타치온의 고갈로 인해 활성산소종이 축적되어 세포 사멸이 진행되었다(Powolny&Shivendra, 2008).

제 3 장 재 료 및 방 법

1. 공 시 균 주

본 실험에서 사용한 균주는 수목병에 관여하는 미생물로 곰팡이에 경우 참나무시들음병(*Raffaelea quercus-mongolicae*), 모잘록병(*Rhizoctonia solani*) 2종이며 그람음성세균인 근두암종병(*Agrobacterium tumefaciens*) 1종을 사용하였다. 곰팡이 2종의 경우 국립산림과학원에서 분양 받았으며 그람음성세균은 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms, Seoul, Republic of Korea)에서 분양받았다.

배지는 PDA (potato dextrose agar, Difco., IL, USA), NB (nutrient broth, Difco., IL, USA), NA (nutrient agar, Difco., IL, USA)를 사용하였다. 자세한 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Tree pathogenic fungi and bacteria used in this study

	Strain	Description	media
Fungi	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Isolated at Yangyang, Gangwon Province	PDA, NB
	<i>Rhizoctonia solani</i>	KACC 40115	
Bacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	KCCM 35047	NA, NB

2. 식물체 정유 및 화합물

본 실험에서는 3종의 수목병에 대한 항균 활성을 검정하기 위하여 식물체 정유 4종을 사용하였다. cumin (*Cuminum cyminum* L.)을 포함한 2종은 진아로마(Gyeonggi Province, Republic of Korea), cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J.)를 포함한 2종은 Oshadi (Weinstrasse, Bühl/Baden, Germany)에서 구입하였다(Table 2).

실험에 사용한 화합물은 정유 유래 성분 23종, *trans*-cinnamaldehyde 유도체 9종 (Figure 1), 혼증 및 접촉 실험에 사용된 positive control 및 시약 7종, 활성산소종 및 세포막 파괴 검증에 사용된 시약 4종 등 총 43종으로 순도 및 구입처는 Table 3에 나타내었다. (-)- β -Pinene을 포함한 25종은 Sigma-Aldrich (MO, USA), (+)- α -pinene을 포함한 4종은 Tokyo Chemical Industry (TCI, Tokyo, Japan), γ -terpinene을 포함한 4종은 Fluka (Buchs, Switzerland), linalool 1종은 Wako (Osaka, Japan), Alamar blue cell viability reagent을 포함한 3종은 Thermofisher (MA, USA), Tween 80 1종은 DAEJUNG (Gyeonggi Province, Republic of Korea)에서 구입하였다. Benomyl (96%), propiconazole (95%), tebuconazole (97%)은 Farmhannong (Chungnam Province, Republic of Korea)에서 제공받았고 neral, geranial은 실험실에서 합성하였다.

Table 2. List of plant essential oils used in this study

Family	Oil	Binomial name	Part	Source
Lauraceae	Cinnamon bark	<i>Cinnamomum verum</i> J.	Bark	Oshadi
Apiaceae	Cumin	<i>Cuminum cyminum</i> L.	seeds	Jinarome (Korea)
Poaceae	Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	Leaves	Jinarome (Korea)
Ericaceae	wintergreen	<i>Gaultheria fragrantissima</i> Wall.	Leaves	Oshadi

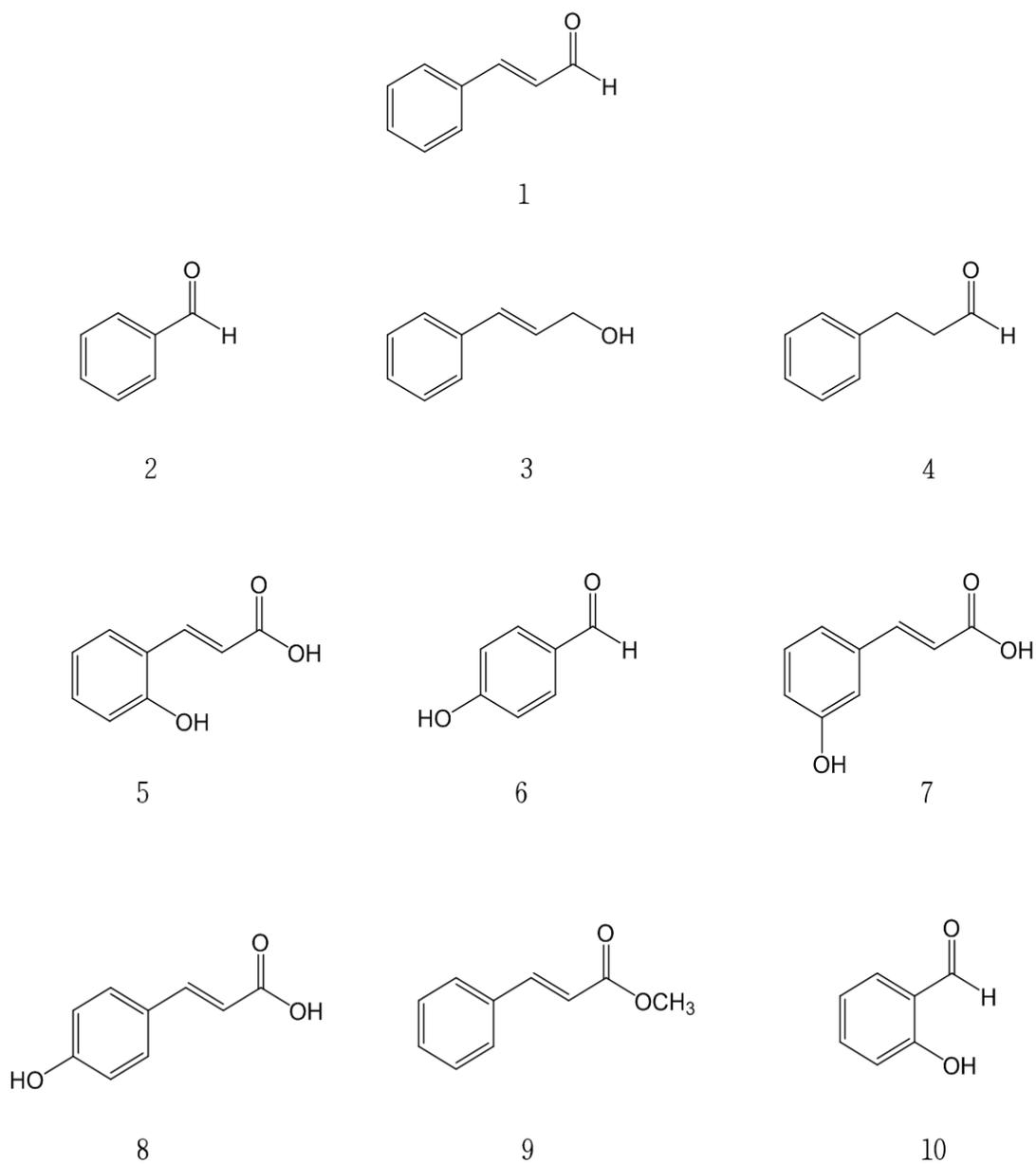


Figure 1. Structure of *trans*-cinnamaldehyde and its congeners: 1, *trans*-Cinnamaldehyde; 2, Benzaldehyde; 3, Cinnamyl alcohol; 4, Hydrocinnamaldehyde; 5, 2-Hydroxycinnamic acid, predominantly *trans*; 6, 4-Hydroxybenzaldehyde; 7, *trans*-3-Hydroxycinnamic acid; 8, *trans*-4-Hydroxycinnamic acid; 9, Methyl cinnamate; 10, Salicylaldehyde

Table 3. List of compounds used in this study

No	Compounds name	purity (%)	Source
1	(+)- α -Pinene	>95	TCI
2	(-)- β -Pinene	99	Sigma-aldrich
3	Myrcene	75	Sigma-aldrich
4	α -Phellandrene	>65	TCI
5	ρ -Cymene	99	Sigma-aldrich
6	(+)-Limonene	97	Sigma-aldrich
7	1,8-Cineole	99	Sigma-aldrich
8	γ -Terpinene	≥ 97	Fluka
9	Linalool	98	Wako
10	Menthol	≥ 99	Fluka
11	Methyl salicylate	>99	TCI
12	Estragole	98	Sigma-aldrich
13	Neral ^a	98	-
14	Cuminaldehyde	98	Sigma-aldrich
15	Geraniol	98	Sigma-aldrich
16	Geranial ^a	99	-
17	<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	≥ 99	Sigma-aldrich
18	<i>trans</i> -Anethole	99	Sigma-aldrich
19	Eugenol	≥ 99	Fluka
20	Geranyl acetate	98	Sigma-aldrich
21	β -Caryophyllene	>90	TCI
22	Cinnamyl acetate	99	Sigma-aldrich
23	α -Humulene	≥ 98	Fluka
24	Benzaldehyde	≥ 99	Sigma-aldrich
25	Cinnamyl alcohol	98	Sigma-aldrich
26	Hydrocinnamaldehyde	90	Sigma-aldrich
27	2-Hydroxycinnamic acid, predominantly <i>trans</i>	97	Sigma-aldrich
28	4-Hydroxybenzaldehyde	98	Sigma-aldrich
29	<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	99	Sigma-aldrich
30	<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	≥ 98	Sigma-aldrich
31	Methyl cinnamate	≥ 99	Sigma-aldrich
32	Salicylaldehyde	≥ 99	Sigma-aldrich
33	Dimethyl disulfide	≥ 99	Sigma-aldrich
34	Streptomycin sulfate salt	-	Sigma-aldrich
35	Alamar blue cell viability reagent	-	Thermofisher
36	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate	≥ 97	Sigma-aldrich
37	STYO 9 dye	-	Thermofisher
38	Propidium iodide	-	Thermofisher
39	Phosphate buffered saline	-	Sigma-aldrich
40	Tween 80	-	DAEJUNG

^aSynthesized in laboratory

3. 정유 성분 분석

정유 성분 분석을 위해 gas chromatography (7890B, Agilent, CA, USA)-flame ionization detector (GC-FID)를 사용하였다. 컬럼은 DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.1 μm film) (Agilent, CA, USA)를 사용하였고, 오븐 온도는 40°C 에서 5분간 머무른 후 250°C 까지 분당 6°C 의 속도로 승온하였다. 주입구 및 검출기의 온도는 각각 200°C, 250°C 로 하였고 운반기체는 질소가스를 1.0 ml/min로 하여 split mode (split ratio=30:1)로 주입하였다.

정유 성분 동정을 위해 gas chromatography 7890B (Santa Clara, CA, USA)-mass spectrometer (5977B MSD, Agilent, CA, USA) (GC-MS) 를 사용하였다. 컬럼은 HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film) (Agilent, CA, USA)를 사용하였고, 오븐온도 조건은 GC와 동일하다. 운반기체는 헬륨가스를 1.0 ml/min로 하여 split mode (split ratio=30:1)로 주입하였다. MSD조건으로 ionization voltage는 70eV, ion source temperature는 230°C 로 하였다.

각 성분은 GC-MS의 NIST MS library와 GC를 통해 얻은 표준물질의 retention indices(RI)의 비교를 통해 동정하였고 RI값은 n-alkanes (C8~C22) homologues series를 기준으로 하여 구하였다(van Den Dool and Kratz, 1963).

4. 훈증법을 이용한 항균 활성 검정

정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 훈증 항균 활성을 검정하기 위해 다음의 검정 방법을 in vitro에서 실험하였다.

4-1. 훈증법을 이용한 항진균 활성 검정

곰팡이에 대한 훈증 항균 활성 측정을 위해 Alvarez-Castellanos *et al.* (2001)의 검정법을 사용하였고 4반복으로 진행하였다. PDA 배지가 담겨진 petri dish 뚜껑(Ø 90 mm) 중앙에 paper disc (8 mm, Advantec, Tokyo, Japan)를 올리고 계대 배양된 균사의 선단부를 cork borer (Ø 90 mm)를 이용하여 disc를 취했다. 그 후 disc를 PDA 배지 중앙에 접촉하고 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체를 농도별로 paper disc에 흡수시켰다. 음성대조군의 경우에는 증류수를 paper disc에 흡수시켰다. 마지막으로 파라필름을 이용하여 PDA 배지 밖으로 휘발성물질이 날아가지 않도록 잘 밀봉하고 25°C, 암상태로 설정된 배양기(VS-1203P0, Vision Scientific, Republic of Korea)에서 배양하였다. 음성대조군의 균사가 배지의 선단부에 닿으면(참나무시들음병 약 5일, 모잘록병 약 2일) vernier calipers (Mitutoyo, Kanagawa, Japan)를 이용하여 실험군 균사의 지름을 측정하였다. 균사 생육 억제율은 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = (C-T)/C \times 100$$

[C:음성대조군의 평균 균사 생장 지름(mm), T: 실험군의 평균 균사 생장 지름(mm)]

4-2. 훈증법을 이용한 항세균 활성 검정

Nutrient agar (Difo)가 담겨진 petri dish 뚜껑 중앙에 paper disc를 올리고 배지의 1/4 구역에 멸균한 접종용 막대를 이용하여 세균 콜로니를 접종했다. 접종 방법은 세균의 밀도 조절을 위하여 1/4 구역의 가장자리 부분을 좌우로 10회 도말한 뒤, 배지의 중심까지 좌우로 도말하며 내려갔다. 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체를 농도별로 paper disc에 흡수시켰다. 음성대조군의 경우에는 증류수를 paper disc에 흡수시켰다. 마지막으로 파라필름을 이용하여 NA 배지 밖으로 휘발성물질이 날아가지 않도록 잘 밀봉하고 30°C, 암상태로 설정된 배양기(DS-10L, DASOL SCIENCE, Gyeonggi Province, Republic of Korea)에서 배양하였다. 음성대조군의 세균이 배지 중심까지 자라면(약 24시간) vernier calipers를 이용하여 실험군의 inhibition zone을 측정하고 평균값을 계산하였다. 세균에 대한 항균 활성 실험은 4반복으로 진행하였다.

5. 직접 접촉법을 이용한 항균 활성 검정

정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 직접 접촉 항균 활성을 검정하기 위해 다음의 검정 방법을 in vitro에서 실험하였다.

5-1. 직접 접촉법을 이용한 항진균 활성 검정

PDA 배지에 계대 배양된 각 균사의 선단부를 cork borer를 이용하여 disc를 취한 뒤, 50 ml의 nutrient broth (Difo)에 disc 10개를 넣어 진탕배양기(VS-8480F, Vision Scientific, Seoul, Republic of Korea)에서 25°C, 200 rpm으로 7일간 1차 배양하였다. 1차 계대 배양된 균액을 1 ml 취하

여 50 ml의 nutrient broth에서 같은 조건으로 2차 배양하였다. 참나무시들음병의 경우 2차 계대 배양된 균액이 균질하게 퍼져있어 바로 희석할 수 있지만 모잘록병에 경우 군사가 뭉쳐 자라는 특성이 있어 homogenizer를 이용하여 군사를 갈아 주었다. 이후 균질하게 퍼진 균액을 NB배지에 희석한 후 spectrophotometer (Ultrospec 10, GE healthcare, UK)를 이용하여 McFarland 0.5 표준 탁도액(McFarland standard, 1.5×10^8 CFU/ml)인 $0.1 OD_{600}$ 농도로 맞추었다. 농도를 맞춘 균액을 96 well plate (Jetbiofil, China)에 각 well 당 180 μ l 분주하고 25% DMSO (dimethyl sulfoxide, DAEJUNG, Gyeonggi Province, Republic of Korea)와 1% tween 80 (DAEJUNG, Gyeonggi Province, Republic of Korea) 용액에 농도별로 희석한 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체 20 μ l를 처리하였다. 양성대조구로는 propiconazole, tebuconazole 및 benomyl 원제를 사용하였고 음성대조구에는 25% DMSO와 1% tween 80 용액만을 처리하였다. 처리를 마친 96 well plate는 배양기에서 25 $^{\circ}$ C로 48시간 배양하였다. 그 후 각 well 당 alamar blue (ThermoFisher, MA, USA)를 20 μ l 처리하고 음성대조군의 발색이 분홍색이 될 때까지 배양기에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 음성대조군이 분홍색이 되면 실험군의 MIC를 측정하였다. 곰팡이에 대한 항균 활성 측정을 위해 실험은 4반복으로 진행하였다.

5-2. 직접 접촉법을 이용한 항세균 활성 검정

멸균한 접종용 막대를 이용하여 1개의 세균 콜로니를 1 ml NB배지에 접종하고 진탕배양기에서 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm으로 24시간 1차 배양하였다. 1차 계대 배양된 균액을 1 ml 취하여 50 ml의 NB배지에서 같은

조건으로 2차 배양하였다. 이후 균질하게 퍼진 균액을 NB배지에 희석한 후 spectrophotometer를 이용하여 McFarland 0.5 표준 탁도액 $0.1 OD_{600}$ 농도로 맞추었다. 농도를 맞춘 균액을 96 well plate에 각 well 당 180 μ l 분주하고 25% DMSO와 1% tween 80 용액에 농도별로 희석한 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체 20 μ l 처리하였다. 양성대조구로는 streptomycin sulfate salt를 사용하였고 음성대조구에는 25% DMSO와 1% tween 80 용액만을 처리하였다. 처리를 마친 96 well plate는 배양기에서 30°C로 24시간 배양하였다. 그 후 각 well 당 alamar blue를 20 μ l 처리하고 음성대조군의 발색이 분홍색이 될 때까지 배양기에서 37°C로 배양하였다. 음성대조군이 분홍색이 되면 실험군의 MIC를 측정하였다. 세균에 대한 항균 활성 실험은 4반복으로 진행하였다.

6. 인공 혼합물(artificial blends)에 따른 상대적 항균 활성 검정

훈증 및 접촉활성이 우수한 cinnamon bark와 lemongrass 정유의 성분들 중 어떤 성분이 항균 활성에 관여하는지 그리고 정유 성분들 간 시너지 및 길항작용이 있는지 알아보기 위하여 동정된 성분을 이용해 인공 혼합물을 만들었다. 이어 각 정유의 동정된 성분들을 모두 섞은 혼합물(full mixture)과 해당 정유의 항균 활성을 비교하였고 성분들을 하나씩 제거하며 어떤 화합물이 항균활성에 기여도가 높은지 확인하였다. 인공 혼합물에 대한 상대적 항균 활성 검정은 마찬가지로 3종의 수목병원균을 대상으로 진행하였으며 훈증법과 직접 접촉법 방식은 앞에서 기술한 방법과 동일하다.

7. RNA염기서열분석

RNA염기서열분석은 훈증법을 이용한 항균 활성이 병원균의 유전자에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 진행되었다. 3종의 병원균 중 선행 연구에 의한 유전자 데이터 정보가 많은 *A. tumefaciens*을 대상으로 실험을 하였다. 실험구는 훈증 항균 활성 검정에서 가장 효과가 좋았던 *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 각각 처리하였고 대조구는 증류수를 처리하였다. 실험구의 처리 농도는 inhibition zone이 1cm 이하가 되도록 하였으며 inhibition zone 위로 2cm 정도 자라난 세균들을 긁어내어 TRIzol 시약에 넣고 전처리를 마쳤다. 이후 RNA염기서열분석과 관련한 실험 및 분석은 테라젠이텍스(수원시, 경기도, 한국)에 의뢰하여 수행하였다.

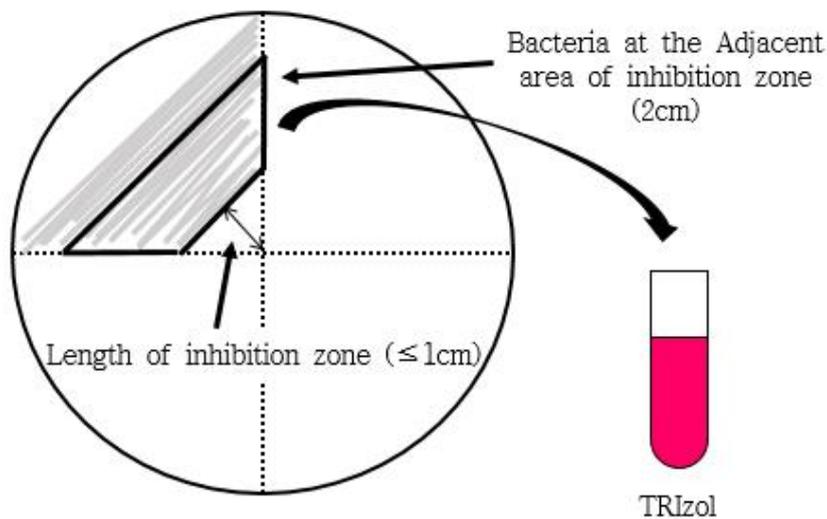


Figure 2. The Pretreatment for RNA-seq.

원핵생물인 *A. tumefaciens*는 진핵생물이 가지는 mRNA 서열 3' 말단의 poly (A) tail을 가지고 있지 않기 때문에 전체 RNA염기서열을

분석해야한다. 이때 염기 중 대부분을 차지하는 rRNA는 발현 분석에 불필요하므로 최대한 제거하는 것이 중요하다. 따라서 Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) (Illumina, CA, USA)를 사용하여 5S, 16S, 23S rRNA를 제거하였다. 이어 TruSeq total RNA Sample Prep Kit (Illumina, CA, USA)를 사용하여 library를 만들고 HiSeq 2500 (Illumina, CA, USA)에 장비를 이용하여 paired-end 2×101bp로 분석을 진행하였다.

7-1. 분석 데이터 전처리

분석 데이터의 수준은 염기서열분석장치의 정확성을 평가하는데 가장 많이 사용되는 기준인 phred quality score (Q-Score)로 측정하였다. Fast QCprogram (version 0.11.5; Babraham Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>))을 통해 base quality 분포 및 duplicates 비율 등을 확인하였고 분석데이터에 불필요한 adapter 서열 및 low quality base (Q20 미만)를 제거하였다. Q20이란 염기 100개를 불러올 때 1개의 염기를 잘못 불러올 확률을 의미하며 대부분의 DNA 및 RNA 분석에 허용되는 수치이다.

7-2. 레퍼런스 어셈블리(Reference assembly)

RSEM프로그램은 RNA-seq read들을 정렬하여 발현량을 측정하는데 많이 쓰인다. 따라서 본 분석에서는 RSEM (version 1.2.31; <https://github.com/deweylab/RSEM/releases>)을 이용하여 분석데이터의 전처리가 끝난 RNA-seq clean data를 레퍼런스에 맵핑하였다. Mapping engine은 Bowtie2 v 2.2.8 또는 Bowtie2-align를 이용하였다. 본 분석에서 사용한 유전체 서

열은 NCBI 데이터베이스에 등록된 *A. tumefaciens*이다(Table 4).

Table 4. Assembly of *Agrobacterium tumefaciens*

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudo gene
Chr	circular	NZ_CP011246.1	CP011246.1	2.83	58.8	2,693	6	40	3	2,784	42
Chr	linear	NZ_CP011247.1	CP011247.1	2.1	58.6	1,836	9	16	1	1,905	43
Plsm	pAt	NZ_CP011248.1	CP011248.1	0.54	57.6	492	-	-	-	533	41
Plsm	pTi	NZ_CP011249.1	CP011249.1	0.19	54.7	163	-	-	-	182	19

7-3. 차등발현유전자 검색

차등발현유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)란 실험군(cinnamaldehyde)의 유전자 발현 정도가 대조군에 비하여 유의미한 차이를 보이는 유전자를 의미한다. 유의한 유전자를 선별하기 위해 2-Fold change (FC or logFC)를 사용하였으며 이를 기준으로 발현양상에 따라 up-regulated 또는 down-regulated 되는지 분석하였다. 차등발현유전자 검색을 위한 통계처리 시 *p*-value만을 이용할 경우 오차가 발생하게 되는데 이는 유전자의 개수가 매우 많기 때문에 발생한다. 따라서 유전자 수에 따라 증가하는 false-positive 오차를 줄이기 위해 False Discovery Rate (FDR) 값을 사용하며 이를 기준으로 귀무가설의 채택과 기각 여부를 판단했다. 분석을 위하여 Bioconductor사(Seattle, USA)에서 제공하는 edgeR package를 이용하여 1 logFC, FDR 0.05를 기준으로 차등 발현되는 유전자를 선별하였다.

7-4. 차등발현유전자집단 검색

개체의 특정 형질은 단일 유전자에 의해 결정되기 보다는 동일한 또는 연속된 생물학적 대사를 수행하는 유전자집단이 움직이면서 일어나는 경우가 많다. 따라서 각각의 유전자별 발현 차이를 비교해보았던 차등 발현유전자 분석 외에 유전자집단의 발현 양상을 비교하는 GSEA (gene set enrichment analysis)를 수행하였다. GSEA (www.broadinstitute.org/GSEA)는 차등발현유전자로 결정된 유전자들을 비교했던 Fisher's exact test와 달리 전체 유전자 발현값 (FPKM)을 대상으로 처리군과 대조군 각각에 대해 발현량 차이를 보이는 유전자집단을 선별하였다($p < 0.05$).

8. 세포 내 활성산소종(ROS) 발현검정

훈증법을 통해 선발된 활성 우수 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 항균작용기작을 알아보기 위하여 confocal laser scanning microscope (SP8 X, Leica, Germany) 및 microplate reader (victor3, Perkin Elmer, USA)를 이용해 활성산소종 발현여부를 조사하였다.

8-1. 진균 활성산소종 발현량 검정

계대 배양된 각 균사의 선단부위 disc를 취한 뒤 NA 배지 중앙에 접종하고 모잘록병은 1일, 참나무시들음병은 4일간 25°C에서 배양하였다. 이 후 배양된 배지의 petri dish 뚜껑중앙에 paper disc를 올리고 실험구에는 각 균에 대한 선별 물질의 100% 억제 농도보다 4~5배 높은 농도를 처리하고 음성대조구에는 증류수를 처리한 뒤 같은 조건에서 다시 1일 더 배양하였다. 이어 배양을 마친 실험구와 음성대조구의 배지에서 paper disc와 인접한 부위의 disc를 취하고 3 μ M의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-aldrich, MO, USA)에 넣어 37°C, 암상태의 배양기에서 1시간 염색하였다. 염색을 마친 뒤 염색된 disc를 증류수로 10배 희석한 phosphate-buffered saline (PBS) 1x로 1회 세척하였다. 세척을 마친 disc는 균사 부분이 슬라이드 글라스와 맞닿게 올린 뒤 커버글라스를 덮고 테이프로 고정시켜주었다. 전처리를 마친 뒤 confocal (excitation: 488 nm, emission: 490-560 nm)을 이용하여 400배율로 관찰하였다.

8-2. 세균 활성산소종 발현검정

NA배지의 1/4 구역에 멸균한 접종용 막대를 이용하여 세균 콜로니를 접종했다. 접종 방법은 혼증법과 동일하며 선별 물질의 처리농도는 정유 및 화합물의 경우 각각 10 μ l, 5 μ l를 처리하였고 *trans*-cinnamaldehyde 유도체 중 salicylaldehyde의 경우 0.62 μ l를 처리하였다. 음성대조구의 경우에는 증류수를 paper disc에 흡수시켰다. 처리한 배지는 배양기(30°C, 암상태)에서 1일 배양하였다. 배양이 끝나면 세균의 밀도조절을 위해 도달한 부위를 제외하고 자라난 세균을 접종용 막대를 이용하여 긁어모은 뒤 30 μ M의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate가 들어 있는 2 ml 튜브에 넣어 배양기(37°C, 암상태)에서 30분간 염색하였다. 염색된 세균은 micro centrifuge (LaboGene1524, LABOGENE, Daejeon, Korea)를 이용하여 15,000 rpm에서 1분간 다운시키고 세균을 제외한 염색시약을 모두 빼내었다. 이어 1x PBS 2 ml를 다운된 세균이 들어 있는 튜브에 넣고 vortex-mixer (VM-10, (주)대한과학, Gangwon Province, Republic of Korea)를 이용하여 세척하였다. 세척된 세균은 다시 micro centrifuge에 넣어 세균을 다운시키고 오염된 PBS를 빼내었다. 세척과정은 총 3회 진행한 뒤 실험구와 음성대조구의 OD_{600} 값이 동일하도록 1x PBS로 희석해주었다. 전처리를 마친 균액 2.5 μ l를 슬라이드 글라스에 올리고 커버글라스를 덮어 고정시킨 뒤 confocal (Excitation: 488 nm, Emission: 490-560 nm)을 이용하여 1000배율로 관찰하였다. Microplate reader의 경우 균액을 96 well plate에 각각 200 μ l씩 분주하고 485 nm excitation, 530 nm emission 조건에서 활성산소종 발현량을 측정하였다.

9. 세포막 파괴검정

세포막 파괴는 다양한 원인이 작용하여 발생하는 현상이므로 기존 논문에 따르면 과도한 활성산소종 생성 또한 세포막 파괴를 유발한다고 밝혀져 있다(Marčetić *et al.*, 2013). 본 실험에서는 훈증 항균 활성에 의한 세포막 파괴가 일어나는지 검정하기 위해 confocal laser scanning microscope (SP8 X, Leica, 독일) 및 microplate reader (victor3, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 아래의 방법을 수행하였다.

9-1. 진균 세포막 파괴 검정

계대 배양된 각 균사의 선단부위 disc를 취한 뒤 PDA 배지 중앙에 접종하고 배양기(25°C, 암상태)에서 모잘록병은 1일, 참나무시들음병은 4일 배양하였다. 이 후 배양된 배지의 petri dish 뚜껑중앙에 paper disc를 올리고 실험구에는 각 균에 대한 선별 물질의 100% 억제 농도보다 4~5배 높은 농도를 처리하고 음성대조구에는 증류수를 처리한 뒤 같은 조건에서 다시 1일 더 배양하였다. 이어 배양을 마친 실험구와 음성대조구의 배지에서 paper disc와 인접한 부위의 disc를 취하고 1x PBS 1 ml와 propidium iodide (Thermofisher, MA, USA) (참나무시들음병 0.00625 μ l, 모잘록병 0.05 μ l)가 담긴 튜브에 넣어 25°C, 암상태의 배양기에서 15분간 염색하였다. 염색을 마친 disc는 균사 부분이 슬라이드 글라스와 맞닿게 올린 뒤 커버글라스를 덮고 테이프로 고정시켜주었다. 전처리를 마친 뒤 confocal (excitation: 561 nm, emission: 570-650 nm)을 이용하여 400배율로 관찰하였다.

9-2. 세균 세포막 파괴 검정

NA배지의 1/4 구역에 멸균한 접종용 막대를 이용하여 세균 콜로니를 접종했다. 접종 방법은 혼증법과 동일하며 선별 물질의 처리농도는 정유 및 화합물의 경우 각각 10 μ l, 5 μ l를 처리하였고 *trans*-cinnamaldehyde 유도체 중 salicylaldehyde의 경우 0.62 μ l를 처리하였다. 음성대조구의 경우에는 증류수를 paper disc에 흡수시켰다. 처리한 배지는 배양기(30°C, 암상태)에서 1일 배양하였다. 배양이 끝나면 세균의 밀도조절을 위해 도달한 부위를 제외하고 자라난 세균을 접종용 막대를 이용하여 긁어 모은 뒤 PBS 1 ml와 SYTO9 (Thermofisher, MA, USA) 및 propidium iodide를 각각 1:10 비율로 섞은 혼합물 3 μ l가 담긴 튜브에 넣어 25°C, 암상태의 배양기에서 15분간 염색하였다. 이후 실험구와 음성대조구의 OD_{600} 값이 동일하도록 1x PBS로 희석해주었다. 희석된 균액은 2.5 μ l 슬라이드 글라스에 올린 뒤 커버글라스를 덮어 고정시켰다. 전처리를 마친 뒤 confocal (SYTO9: excitation: 488 nm, emission: 490-560 nm; propidium iodide: excitation: 561 nm, emission: 570-650 nm)을 이용하여 1000배율로 관찰하였다. Microplate reader의 경우 균액을 96 well plate에 각각 200 μ l씩 분주하고 535 nm excitation, 617 nm emission 조건에서 세포막 파괴 정도를 측정하였다.

10. 통계

실험군이 2개일 경우 집단 간 모평균에 유의미한 차이가 있는지 확인하기 위하여 SPSS (IBM SPSS Statistics 23.0, 2015)를 이용하여 T-test를 하였다. 실험군이 3개 이상인 경우 동일한 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA)을 하였다. ANOVA를 통해 유의수준이 $p < 0.05$ 이면 Tukey HSD test를 통하여 어떤 집단들의 모평균이 차이가 나는지 분석하였다.

제 4 장 결 과

1. 식물체 정유(plant essential oil)

1-1. 혼증 항균 활성

*R. quercus-mongolicae*에 대한 4종의 식물체 정유의 혼증법을 이용한 항균 활성 검정 결과는 Table 5와 같다. Wintergreen 정유가 10 μ l/paper disc 에서 100%, cinnamon bark와 lemongrass가 5 μ l/paper disc 에서 100% 항균 효과를 보였다.

*R. solani*에 대한 4종의 식물체 정유의 혼증법을 이용한 항균 활성 검정 결과는 Table 6과 같다. Cumin, wintergreen, lemongrass 및 cinnamon bark 정유가 각각 10 μ l/paper disc, 5 μ l/paper disc, 2.5 μ l/paper disc, 1.25 μ l/paper disc 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다.

*A. tumefaciens*에 대한 4종의 식물체 정유의 혼증법을 이용한 항균 활성 검정 결과는 Table 7과 같다. Wintergreen, lemongrass, cinnamon bark 및 cumin 정유가 각각 10 μ l/paper disc 에서 각각 2.20cm, 1.76cm, 1.50cm, 1.04cm의 생육저지환(inhibition zone)이 나타났다.

Table 5. Fumigant antifungal activity of essential oils against *Raffaelea quercus-mongolicae*

Essential oils	Inhibition rate (%), Mean±SE, N=4)						
	10 ^a	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
Cinnamon bark	100a ^b	100a	67.80±0.63a	45.59±1.22a	31.89±0.92a	16.42±1.02a	0
Cumin	94.0±0.25b	51.24±1.98c	47.80±2.35c	14.96±1.55c	14.71±0.96b	0c	- ^c
Lemongrass	100a	100a	65.41±1.29a	39.90±2.42a	15.15±0.39b	8.54±0.54b	0
wintergreen	100a	87.31±0.60b	59.11±0.59b	29.62±2.89b	16.83±0.84b	0c	-
Calculated value =	$F_{3,12}^{\bar{=}}$	$F_{3,12}^{\bar{=}}$	$F_{3,12}^{\bar{=}}$ 40.231	$F_{3,12}^{\bar{=}}$ 40.091	$F_{3,12}^{\bar{=}}$	$F_{3,12}^{\bar{=}}$	
<i>F</i>	574.314	497.708			102.840	187.309	
<i>p</i> -value	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	

^a μl/paper disc.

^bMeans within a column followed by the same letters are not significantly different in inhibition rate (Tukey HSD test, *p*<0.05).

^cNot tested.

Table 6. Fumigant antifungal activity of essential oils against *Rhizoctonia solani*

Essential oils	Inhibition rate (%), Mean±SE, N=4)									
	10 ^a	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.03906 ^d	0.01953
Cinnamon bark	100	100a ^b	100a	100a	87.3±0.50a	65.3±0.18a	49.9±1.13a	17.7±0.96a	0	-
Cumin	100	94.2±2.00a	75.8±0.63c	61.4±5.74c	44.6±5.41c	18.6±2.09c	24.1±0.65c	0b	-	-
Lemongrass	100	100a	100a	82.2±4.06b	64.6±2.02b	42.7±0.74b	34.6±0.34b	18.5±1.17a	14.2±0.32	0
wintergreen	100	100a	88.4±1.41b	72.9±2.27bc	33.8±1.55c	14.8±0.93c	0d	- ^c	-	-
Calculated value = <i>F</i>		<i>F</i> _{4,15} = 21.6	<i>F</i> _{4,15} = 247.662	<i>F</i> _{4,15} = 87.476	<i>F</i> _{4,15} = 149.931	<i>F</i> _{3,12} = 380.289	<i>F</i> _{3,12} = 974.324	<i>F</i> _{2,9} = 142.923	<i>F</i> _{1,6} = 1965.089	
<i>p</i> -value		<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	

^a µl/paper disc concentration.

^bMeans within a column followed by the same letters are not significantly different in inhibition rate (Tukey HSD test, *p*<0.05).

^cNot tested.

Table 7. Fumigant antibacterial activity of essential oils against *Agrobacterium tumefaciens*

Essential oils	Length of Inhibition zone (cm, Mean±SE, N=4)						
	10 ^a	5	2.5	1.25	0.625 ^d	0.3125	0.15625
Cinnamon bark	1.50±0.17c ^b	1.46±0.02a	1.37±0.10a	1.34±0.04a	0.82±0.05	0.57	0
Cumin	1.04±0.07d	0.49±0.03b	0c	- ^c	-	-	-
Lemongrass	1.76±0.03b	1.43±0.05a	1.20±0.12a	0.58±0.04b	0	-	-
wintergreen	2.20±0.08a	1.61±0.11a	0.66±0.03b	0c	-	-	-
Calculated value = F	$F_{3,12}= 78.707$	$F_{3,12}= 64.761$	$F_{3,12}= 61.772$	$F_{2,9} 430.133$	$F_{1,6}= 220.914$		
p-value	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$		

^a µl/paper disc concentration.

^bMeans within a column followed by the same letters are not significantly different in inhibition rate (Tukey HSD test, $p<0.05$).

^cNot tested.

1-2. 접촉 항균 활성

3종의 수목 병원균에 대한 식물체 정유 4종의 접촉 항균 활성 결과는 Table 8과 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대한 cinnamon bark, lemongrass 그리고 cumin 정유의 MIC 값은 각각 250 µg/ml, 450 µg/ml 및 800 µg/ml으로 나타났고, *R. solani*에 대한 cinnamon bark, lemongrass 그리고 cumin 정유의 MIC 값은 각각 200 µg/ml, 400 µg/ml 및 850 µg/ml, *A. tumefaciens*에 대한 cinnamon bark, lemongrass 그리고 cumin 정유의 MIC 값은 각각 250 µg/ml, 450 µg/ml 및 900 µg/ml으로 나타났다.

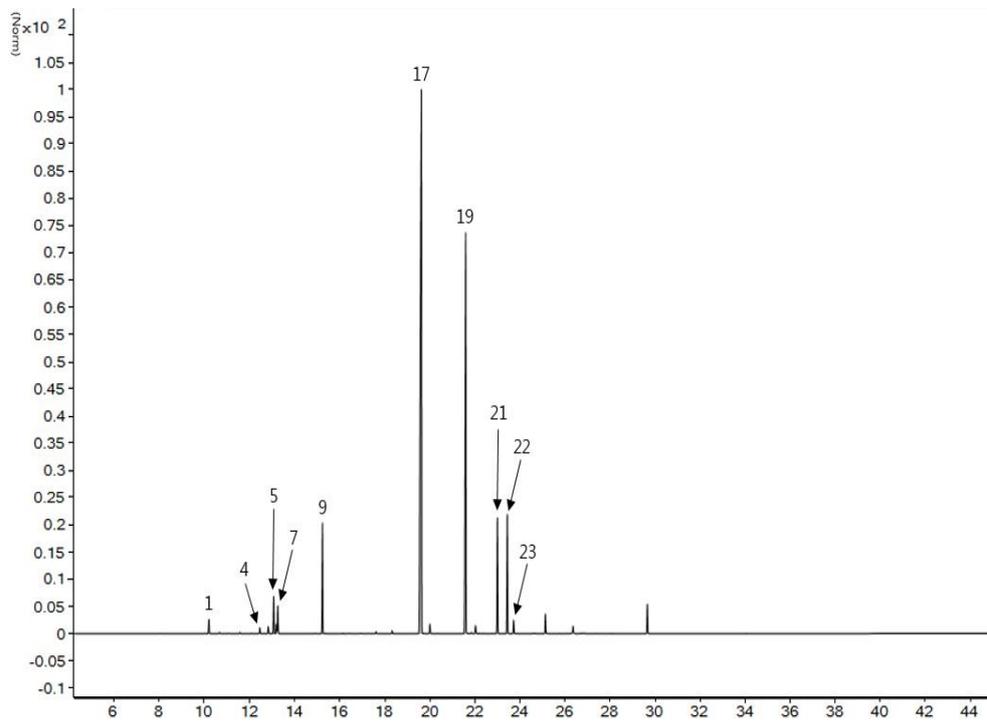
Table 8. Contact antimicrobial activity of essential oils against three tree pathogens

Essential oil	MIC (Minimum inhibitory concentration, µg/ml)		
	Fungi		Bacteria
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Cinnamon bark	250	200	250
Cumin	800	850	900
Lemongrass	450	400	450
wintergreen	- ^a	-	-

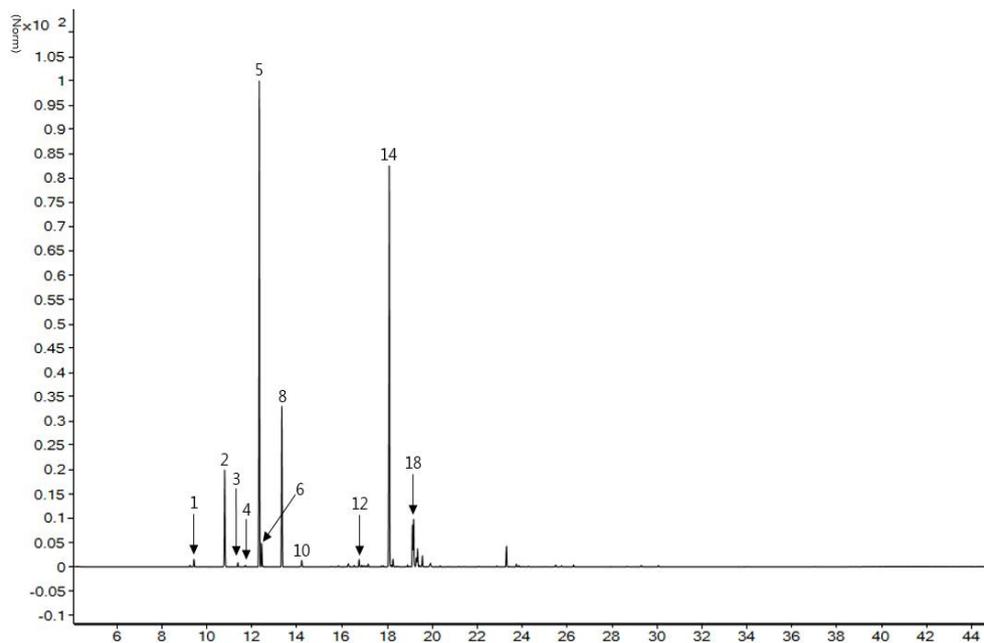
^aNot active (>1200).

1-3. 4종의 식물체 정유 성분 동정

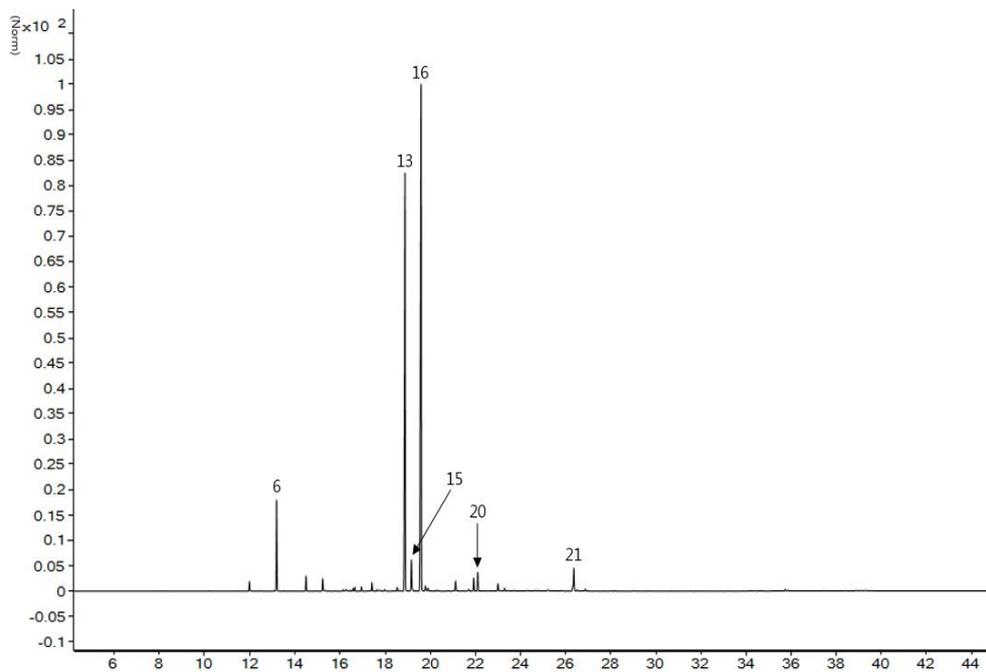
GC와 GC-MS를 이용하여 훈증 및 접촉 항균 활성을 나타낸 식물체 정유 4종(cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen)의 성분을 동정하였다(Figure 3, Table 9).



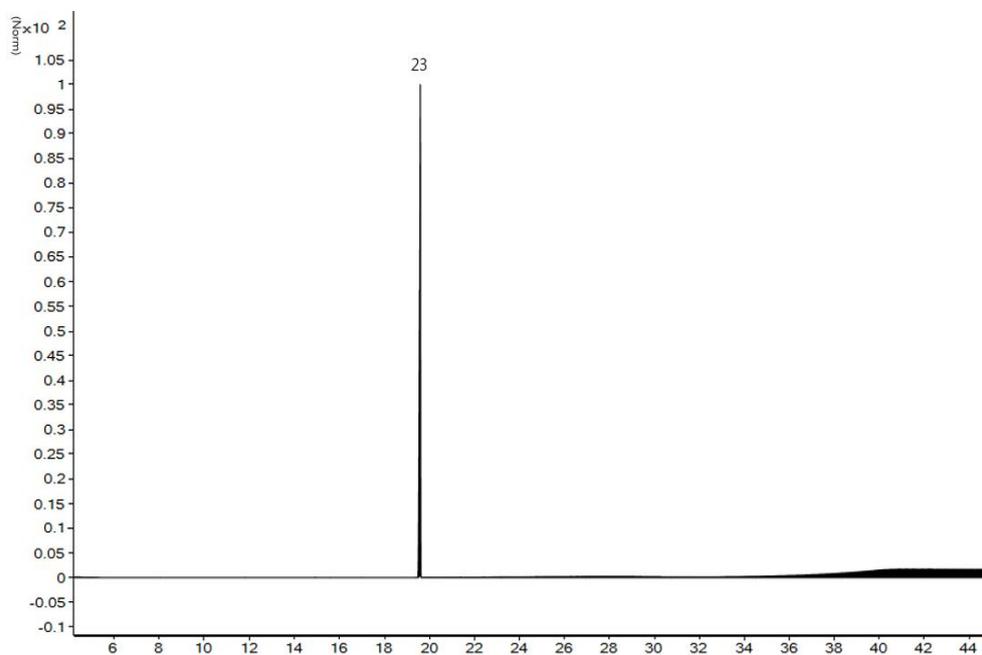
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 3. Gas chromatograms of four active oils. Cinnamon bark (A); Cumin (B); Lemongrass (C); Wintergreen (D). The number of each peak is the same in Table 9.

Table 9. Chemical analysis of four active essential oils

No	Compound	Retention index		Composition ratio (%)		
		DB-5 (std com. ^a) /Lit	Cinnamon bark	Cumin	Lemongrass	Wintergreen
1	α -Pinene	930/930 ^b	0.87	0.92	-	-
2	β -Pinene	973/973 ^b	- ^g	11.69	-	-
3	Myrcene	989/989 ^b	-	0.72	-	-
4	α -Phellandrene	1003/1005 ^c	0.39	-	-	-
5	<i>p</i> -Cymene	1023/1022 ^b	2.08	34.47	-	-
6	Limonene	1027/1027 ^b	-	2.68	7.56	-
7	1,8-Cineole	1029/1029 ^b	1.91	-	-	-
8	γ -Terpinene	1057/1057 ^b	-	13.83	-	-
9	Linalool	1100/1100 ^b	4.99	-	-	-
10	Menthol	1178/1173 ^c	-	0.24	-	-
11	Methyl salicylate	1192/1183 ^d	-	-	-	99.85
12	Estragole	1200/1195 ^e	-	0.44	-	-
13	Neral	1239/1238 ^b	-	-	32.27	-
14	Cuminaldehyde	1243/1239 ^f	-	22.07	-	-
15	Geraniol	1254/1251 ^b	-	-	2.76	-
16	Geranial	1270/1268 ^b	-	-	45.04	-
17	<i>trans</i> -Cinnam aldehyde	1276/1266 ^e	52.26	-	-	-
18	<i>trans</i> -Anethole	1286/1283 ^c	-	5.35	-	-
19	Eugenol	1353/1349 ^b	21.87	-	-	-
20	Geranyl acetate	1380/1383 ^f	-	-	1.08	-
21	β -Caryophyllene	1414/1415 ^b	4.93	-	0.56	-
22	Cinnamyl acetate	1447/1443 ^e	5.05	-	-	-

23	a-Humulene	1451/1451 ^b	0.69	-	-	-
SUM			95.05	92.40	89.27	99.85

^aStandard compounds; ^bKim, 2017; ^cKhalid, K. A, 2014; ^dRai, S. K *et al.*, 2006; ^eZhang, H *et al.*, 2005; ^fJavidnia, K *et al.*, 2002; ^gNot detected.

2. 식물체 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 항균활성

2-1. 훈증 항균 활성

*R. quercus-mongolicae*에 대한 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 훈증 항균 활성 검정 결과는 Table 10과 같다. Salicylaldehyde는 0.625 $\mu\text{l/paper disc}$, eugenol과 hydrocinnamaldehyde는 2.5 $\mu\text{l/paper disc}$ 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다.

*R. solani*에 대한 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 훈증 항균 활성 검정 결과는 Table 11과 같다. *trans*-Cinnamaldehyde는 0.3125 $\mu\text{l/paper disc}$, neral과 hydrocinnamaldehyde는 1.25 $\mu\text{l/paper disc}$, cuminaldehyde, geranial 그리고 salicylaldehyde는 2.5 $\mu\text{l/paper disc}$ 농도에서 100% 항균 효과를 나타냈다.

*A. tumefaciens*에 대한 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 훈증법을 이용한 항균 활성 검정 결과는 Table 12와 같다. Salicylaldehyde, hydrocinnamaldehyde 그리고 cuminaldehyde는 각각 2.80 cm, 2.26 cm 및 2.08 cm로 생육저지환(inhibition zone)이 나타났다. 또한 *trans*-cinnamaldehyde, methyl salicylate, *trans*-anethole, neral, (+)- α -pinene, geranial 그리고 (-)- β -pinene는 각각 1.92 cm, 1.80 cm, 1.72 cm, 1.67 cm, 1.50 cm, 1.34 cm 및 0.98 cm의 생육저지환이 나타났다.

Table 10. Fumigant antifungal activity of compounds from active essential oils against *Raffaelea quercus-mongolicae*

Compounds	Inhibition rate (%), Mean±SE, N=4)					
	2.5 ^a	1.25	0.62	0.3125	0.15625	0.078125
(+)- α -Pinene	31.16±0.39f ^b	0h	- ^c	-	-	-
(-)- β -Pinene	0h	-	-	-	-	-
Myrcene	0h	-	-	-	-	-
α -Phellandrene	0h	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	0h	-	-	-	-	-
(+)-Limonene	0h	-	-	-	-	-
1,8-Cineole	12.25±0.27g	0h	-	-	-	-
γ -Terpinene	0	-	-	-	-	-
Linalool	41.82±1.96de	38.09±1.75ef	35.92±1.04e	33.16±2.28c	0f	
(-)-Menthol	0h	-	-	-	-	-
Methyl salicylate	41.45±1.27e	16.67±0.64g	0h	-	-	-
Estragole	0h	-	-	-	-	-
Neral ^a	88.29±0.39bc	57.41±1.72d	20.46±0.37f	0f	-	-
Cuminaldehyde	91.52±0.83b	65.16±3.37d	44.22±0.77d	32.92±5.30c	14.10±0.26de	0
Geraniol	88.48±1.83bc	79.47±1.12b	67.45±2.47b	38.89±1.79c	32.53±0.94b	0
Geranial ^a	87.51±1.46bc	57.21±2.86d	41.16±1.39de	18.84±1.38e	18.46±2.16d	0
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	88.00±0.31bc	57.22±3.27d	55.97±1.82c	29.80±1.66cd	25.41±1.19c	0
<i>trans</i> -Anethole	32.87±1.53f	18.91±2.10g	10.54±0.69g	0f	-	-
Eugenol	100a	74.76±2.60bc	41.71±0.69de	17.93±1.39e	0f	-
Geranyl acetate	45.90±1.32d	40.68±1.98e	39.36±1.32e	16.97±0.76e	15.79±1.32de	0
β -Caryophyllene	0h	-	-	-	-	-
Cinnamyl acetate	39.98±1.56e	0	-	-	-	-
α -Humulene	0h	-	-	-	-	-
Benzaldehyde	0h	-	-	-	-	-

Cinnamyl alcohol	33.08±0.57f	29.35±0.80f	15.30±1.47fg	0f	-	-
Hydrocinnamaldehyde	100a	65.67±1.81cd	55.15±0.95c	21.36±1.10de	0f	-
2-Hydroxycinnamic acid, predominantly trans	0h	-	-	-	-	-
4-Hydroxybenzaldehyde	0h	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	0h	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	0h	-	-	-	-	-
Methyl cinnamate	84.34±0.16c	79.37±0.49b	65.36±0.32b	48.86±0.60b	12.50±1.28e	0
Salicylaldehyde	100a	100a	100a	65.25±0.29a	48.87±1.27a	0
Calculated value	$F_{31,96}$	$F_{16,51}$	$F_{13,42}$	$F_{12,39}$	$F_{9,30}$	
= F	= 2657.278	= 286.539	= 504.156	= 109.328	= 206.011	
p -value	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$	$p<0.0001$	

^aµl/paper disc.

^bMeans within a column followed by the same letters are not significantly different (Tukey HSD test, $p<0.05$).

^cNot tested.

Table 11. Fumigant antifungal activity of compounds from active essential oils against *Rhizoctonia solani*

Compounds	Inhibition rate (%; Mean \pm SE, N=5)								
	2.5 ^a	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.07812	0.03906	0.01953	0.0098
(+)- α -Pinene	62.98 \pm 1.58ef ^b	44.18 \pm 1.34h	30.03 \pm 1.37h	18.24 \pm 0.76f	17.30 \pm 1.29efg	0g	- ^c	-	-
(-)- β -Pinene	19.86 \pm 0.52i	19.19 \pm 1.11j	0k	-	-	-	-	-	-
Myrcene	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Phellandrene	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-Limonene	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
1,8-Cineole (=Eucalyptol)	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -Terpinene	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	35.39 \pm 2.57h	33.72 \pm 1.52i	17.24 \pm 1.38ij	0g	-	-	-	-	-
(-)-Menthol	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl salicylate	92.99 \pm 0.22bc	81.54 \pm 1.00cd	51.26 \pm 4.43ef	34.91 \pm 0.76de	23.01 \pm 1.28def	10.90 \pm 0.75h	0d	-	-
Estragole	38.76 \pm 1.28gh	0k	-	-	-	-	-	-	-
Neral ^a	100a	100a	72.59 \pm 0.45d	49.18 \pm 0.69c	31.04 \pm 4.03cd	19.37 \pm 1.01d	0d	-	-
Cuminaldehyde	100a	95.60 \pm 1.58a	75.84 \pm 4.46cd	65.59 \pm 3.99b	53.49 \pm 4.80b	15.09 \pm 0.80e	12.17 \pm 0.59c	0b	-
Geraniol	93.98 \pm 3.54b	73.02 \pm 1.78f	61.18 \pm 1.95e	40.28 \pm 1.08d	34.27 \pm 0.71c	25.78 \pm 0.22c	0d	-	-
Geranial ^a	100a	96.79 \pm 1.87a	77.03 \pm 1.83cd	50.05 \pm 0.82c	29.57 \pm 0.43cd	20.60 \pm 0.22d	0d	-	-
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	100a	100a	100a	100a	90.74 \pm 3.32a	23.74 \pm 0.83c	15.14 \pm 1.41b	0b	-
<i>trans</i> -Anethole	87.45 \pm 1.43c	85.93 \pm 2.05cd	44.37 \pm 3.73fg	19.17 \pm 2.24f	0h	-	-	-	-
Eugenol	91.37 \pm 0.25bc	87.63 \pm 0.19bc	83.58 \pm 1.93bc	60.94 \pm 1.34b	51.14 \pm 2.13b	0g	-	-	-
Geranyl acetate	66.98 \pm 0.61e	54.35 \pm 1.92g	34.37 \pm 1.60gh	27.79 \pm 2.00e	20.74 \pm 2.32def	15.37 \pm 0.89e	0d	-	-
β -Caryophyllene	19.51 \pm 2.85i	18.79 \pm 2.58j	7.71 \pm 2.60jk	0g	-	-	-	-	-
Cinnamyl acetate	57.78 \pm 0.69f	48.31 \pm 1.85gh	43.07 \pm 0.71fg	28.78 \pm 0.77e	27.36 \pm 1.34cde	0g	-	-	-
α -Humulene	41.64 \pm 0.90g	24.62 \pm 0.90j	0k	-	-	-	-	-	-
Benzaldehyde	74.87 \pm 0.43d	36.44 \pm 1.24i	18.14 \pm 1.14ij	0g	-	-	-	-	-
Cinnamyl alcohol	89.63 \pm 0.23bc	76.39 \pm 0.24ef	27.20 \pm 0.71hi	18.11 \pm 0.28f	15.50 \pm 0.72fg	0g	-	-	-
Hydrocinnamaldehyde	100a	100a	89.15 \pm 0.58b	67.28 \pm 4.00b	49.99 \pm 1.80b	36.76 \pm 0.35a	23.05 \pm 0.47a	15.11 \pm 0.14a	0

2-Hydroxycinnamic acid, predominantly trans	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybenzaldehyde	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	0j	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl cinnamate	92.70±0.52bc	80.46±0.52df	57.71±0.41e	17.08±0.19f	10.66±0.32gh	0g	-	-	-
Salicylaldehyde	100a	93.14±0.65ab	90.57±0.50ab	67.20±0.59b	51.39±0.69b	31.95±1.12b	0d	-	-
Calculated value	$F_{31,96}$	$F_{20,63}$	$F_{19,60}$	$F_{17,54}$	$F_{14,45}$	$F_{13,42}$	$F_{8,27}$	$F_{2,9}$	
= <i>F</i>	= 1612.900	= 596.054	= 247.829	= 295.775	= 108.777	= 445.314	= 275.934	= 11134.332	
<i>p</i> -value	<i>p</i> <0.0001								

^a µl/paper disc.

^b Means within a column followed by the same letters are not significantly different (Tukey HSD test, *p*<0.05).

^c Not tested.

Table 12. Fumigant antibacterial activity of compounds from active essential oils against *A. tumefaciens*

Compound	Length of Inhibition zone (cm, Mean±SE, N=4)						
	5 ^a	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.07812
(+)- α -Pinene	1.50±0.14ef ^b	1.19±0.04c	0.83±0.04d	0.50±0.03c	0b	- ^c	-
(-)- β -Pinene	0.98±0.05g	0.79±0.05d	0f	-	-	-	-
Myrcene	0h	-	-	-	-	-	-
α -Phellandrene	0h	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	0h	-	-	-	-	-	-
(+)-Limonene	0h	-	-	-	-	-	-
1,8-Cineole (=Eucalyptol)	0h	-	-	-	-	-	-
γ -Terpinene	0h	-	-	-	-	-	-
Linalool	0h	-	-	-	-	-	-
(-)-Menthol	0h	-	-	-	-	-	-
Methyl salicylate	1.80±0.68cde	0e	-	-	-	-	-
Estragole	0h	-	-	-	-	-	-
Neral ^a	1.67±0.15de	1.24±0.13c	0.52±0.01e	0d	-	-	-
Cuminaldehyde	2.08±0.09bc	1.49±0.12c	0f	-	-	-	-
Geraniol	0h	-	-	-	-	-	-
Geranial ^a	1.34±0.10f	1.26±0.08c	1.07±0.01c	0.53±0.03c	0b	-	-
<i>trans</i> -Cinnamald ehyde	1.92±0.09cd	1.84±0.04b	1.64±0.06b	1.28±0.16b	1.26±0.11a	1.11±0.28	0
<i>trans</i> -Anethole	1.72±0.18de	0e	-	-	-	-	-
Eugenol	0h	-	-	-	-	-	-
Geranyl acetate	0h	-	-	-	-	-	-
β -Caryophyllen e	0h	-	-	-	-	-	-

Cinnamyl acetate	0h	-	-	-	-	-	-
α -Humulene	0h	-	-	-	-	-	-
Benzaldehyde	0h	-	-	-	-	-	-
Cinnamyl alcohol	0h	-	-	-	-	-	-
Hydrocinnamaldehyde	2.26 ± 0.04b	1.89 ± 0.06b	1.82 ± 0.04b	1.24 ± 0.16b	0b	-	-
2-Hydroxycinnamic acid, predominantly trans	0h	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxybenzaldehyde	0h	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -3-Hydroxycinnamic acid	0h	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	0h	-	-	-	-	-	-
Methyl cinnamate	0h	-	-	-	-	-	-
Salicylaldehyde	2.80 ± 0.00a	2.66 ± 0.01a	2.44 ± 0.08a	1.73 ± 0.02a	0b	-	-
Calculated value = <i>F</i>	$F_{31,96}$ = 231.976	$F_{9,30}$ = 140.979	$F_{7,24}$ = 446.403	$F_{5,18}$ = 45.742	$F_{4,15}$ = 129.220		
<i>p</i> -value	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001	<i>p</i> <0.0001		

^a μ l/paper disc.

^b Means within a column followed by the same letters are not significantly different (Tukey HSD test, *p*<0.05).

^c Not tested.

2-2. 접촉 항균 활성

3종의 수목 병원균에 대한 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 접촉 항균 활성 검정 결과는 Table 13과 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대한 *trans*-cinnamaldehyde, cuminaldehyde, hydrocinnamaldehyde, eugenol, cinnamyl alcohol, neral, geranial, geraniol 그리고 *trans*-anethole의 MIC 값은 각각 150 µg/ml, 250 µg/ml, 300µg/ml, 350 µg/ml, 400 µg/ml, 400 µg/ml, 400 µg/ml, 450 µg/ml 및 850 µg/ml로 나타났다. 양성 대조구인 tebuconazole, benomyl 그리고 propiconazole은 각각 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml 및 12.5 µg/ml로 나타났다. 또한 *R. quercus-mongolicae*에 대해 높은 항균활성을 낸 *trans*-cinnamaldehyde와 tebuconazole의 MIC 값 차이는 24배 정도의 차이가 나타났다.

*R. solani*에 대한 *trans*-cinnamaldehyde, cuminaldehyde, hydrocinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, neral, geranial, eugenol, geraniol 그리고 *trans*-anethole의 MIC 값은 각각 200 µg/ml, 250 µg/ml, 300 µg/ml, 350 µg/ml, 450 µg/ml, 450 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml 및 900 µg/ml로 나타났다. 양성 대조구인 benomyl, propiconazole 그리고 tebuconazole은 12.5 µg/ml, 12.5 µg/ml 및 25 µg/ml로 나타났다. 또한 *R. solani*에 대해 높은 항균활성을 낸 *trans*-cinnamaldehyde와 benomyl 그리고 propiconazole의 MIC 값 차이는 16배 정도의 차이가 나타났다.

*A. tumefaciens*에 대한 *trans*-cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, neral, geranial, geraniol, eugenol 그리고 cuminaldehyde의 MIC 값은 각각 200 µg/ml, 350 µg/ml, 400 µg/ml, 400 µg/ml, 450 µg/ml, 650 µg/ml 및 800 µg/ml로 나타났다. 양성 대조구인 streptomycin sulfate salt는 3.125 µg/ml로 나타났다. 또한 *A. tumefaciens*에 대해 높은 항균활성을 낸 *trans*-cinnamaldehyde와 streptomycin sulfate salt의 MIC 값 차이는 64배

정도의 차이가 나타났다.

Table 13. Contact antimicrobial activity of compounds identified in active essential oils

Compounds	MIC (Minimum inhibitory concentration, µg/ml)		
	Fungi		Bacteria
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
α -Pinene	- ^a	-	-
β -Pinene	-	-	-
Myrcene	-	-	-
α -Phellandrene	-	-	-
ρ -Cymene	-	-	-
Limonene	-	-	-
1,8-Cineole	-	-	-
γ -Terpinene	-	-	-
Linalool	-	-	-
Menthol	-	-	-
Methyl salicylate	-	-	-
Estragole	-	-	-
Neral	400	450	400
Cuminaldehyde	250	250	800
Geraniol	450	800	450
Geranial	400	450	400
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	150	200	200
<i>trans</i> -Anethole	850	900	-
Eugenol	350	600	650
Geranyl acetate	-	-	-
β -Caryophyllene	-	-	-
Cinnamyl acetate	-	-	-
α -Humulene	-	-	-
Benzaldehyde	-	-	-
Cinnamyl alcohol	400	350	350
Hydrocinnamaldehyde	300	300	-
2-Hydroxycinnamic acid, predominantly <i>trans</i>	-	-	-
4-Hydroxybenzaldehyde	-	-	-
<i>trans</i> -3-Hydroxycinna	-	-	-

mic acid			
<i>trans</i> -4-Hydroxycinnamic acid	-	-	-
Methyl cinnamate	-	-	-
Salicylaldehyde	-	-	-
Benomyl	12.5	12.5	NT
Propiconazole	12.5	12.5	NT
Tebuconazole	6.25	25	NT
Streptomycin	NT ^b	NT	3.125

^aNot active (>1000)

^bNot tested.

3. 인공혼합물에 따른 상대적 항균 활성 결과

3-1. 혼증 항균 활성

Cinnamon bark 정유에 대한 인공혼합물의 혼증법을 이용한 항균 활성 검정은 Figure 4와 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대해 cinnamon bark 정유 및 인공혼합물을 10 μ l/paper disc 농도 처리한 결과 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 혼증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우, eugenol 및 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 각각의 인공혼합물에서 항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{11,36}=233.608$, $p<0.0001$). 처리 농도를 10 μ l/paper disc 농도로 할 경우 eugenol이 제거된 인공혼합물이 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 인공혼합물에 비하여 더 큰 항균활성 감소가 일어났지만 농도를 2.5 μ l/paper disc 농도이하로 낮추었을 경우 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 인공혼합물에서 더 큰 혼증항균활성 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 5 μ l/paper disc 농도이상의 처리 농도에서는 eugenol이 *R. quercus-mongolicae*의 항균활성 작용에 기여하는 정도가 크고 2.5 μ l/paper disc 농도 이하의 처리 농도에서는 *trans*-cinnamaldehyde가 *R. quercus-mongolicae*의 항균활성 작용에 기여하는 정도가 큰 것으로 나타났다.

*R. solani*에 대해 cinnamon bark 정유 및 인공혼합물을 1.25 μ l/paper disc 농도 처리한 결과 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 혼증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 인공혼합물과 cinnamyl acetate가 제거된 인공혼합물에서 혼증항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{11,36}=9.830$, $p<0.0001$). 그 외의 화합

물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 *trans*-cinnamaldehyde 및 cinnamyl acetate가 *R. solani* 의 훈증항균활성 작용에 기여하며 *trans*-cinnamaldehyde가 기여도가 더 높은 것으로 나타났다.

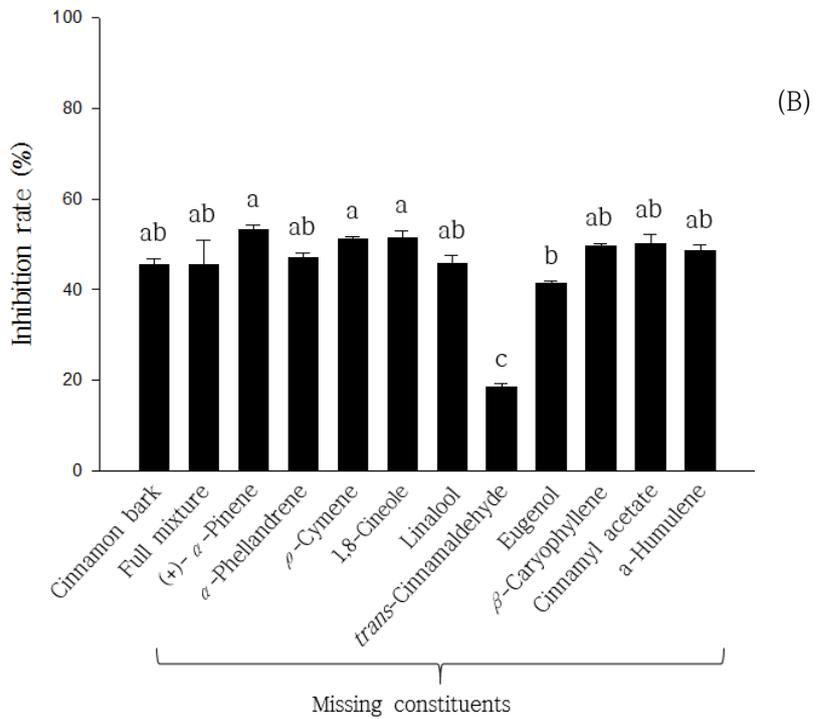
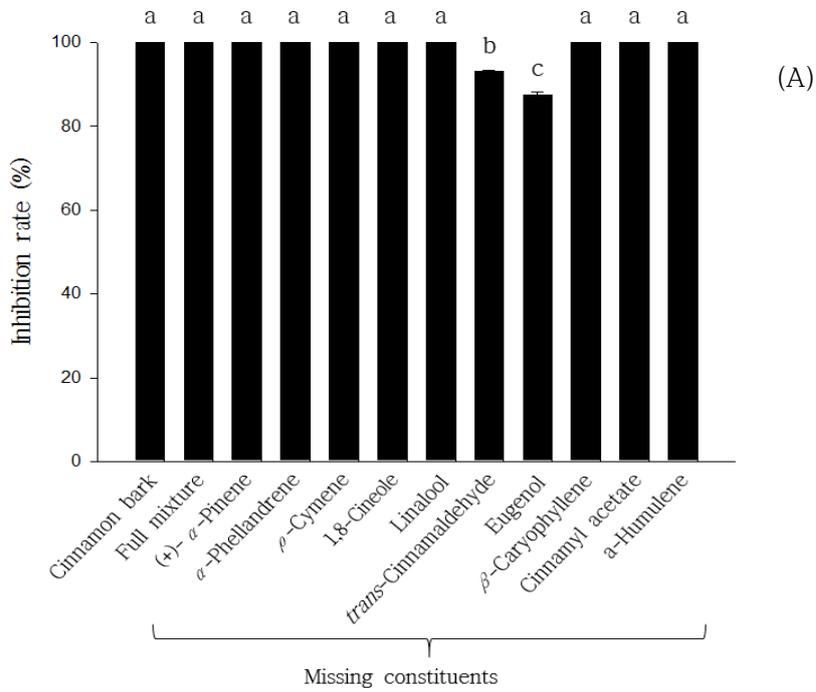
*A. tumefaciens*에 대해 cinnamon bark 정유 및 인공혼합물을 5 µl/paper disc 농도 처리한 결과 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 훈증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 *trans*-cinnamaldehyde가 제거된 인공혼합물에서 훈증항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{11,36}=9.830$, $p<0.0001$). 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 *trans*-cinnamaldehyde가 *A. tumefaciens*의 훈증항균활성 작용에 기여하는 것으로 나타났다.

Lemongrass 정유에 대한 인공혼합물의 훈증법을 이용한 항균 활성 검정은 Figure 5와 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대해 lemongrass 정유 및 인공혼합물을 5 µl/paper disc 농도 처리한 결과 full mixture와 lemongrass 정유 간의 훈증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 geranial, neral, (+)-limonene 그리고 geraniol이 제거된 각각의 인공혼합물에서 항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{7,24}=544.238$, $p<0.0001$). 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 geranial, neral, (+)-limonene 그리고 geraniol은 *R. quercus-mongolicae*의 훈증항균활성 작용에 기여하며 geranial > neral > (+)-limonene = geraniol 순으로 기여도가 높은 것으로 나타났다.

R. solani 에 대해 lemongrass 정유 및 인공혼합물 5 µl/paper disc

농도 처리한 결과 full mixture와 lemongrass 정유 간의 혼증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 neral 및 geranial이 제거된 각각의 인공혼합물에서 혼증항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{7,24}=104.731$, $p<0.0001$). 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 neral 및 geranial이 *R. solani*의 혼증항균활성 작용에 기여하며 neral이 기여도가 더 높은 것으로 나타났다.

*A. tumefaciens*에 대해 lemongrass 정유 및 인공혼합물을 10 μ l/paper disc 농도 처리한 결과 full mixture와 lemongrass 정유 간의 혼증항균활성은 유의미한 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 geranial, neral, geranyl acetate, geraniol 그리고 (+)-limonene이 제거된 각각의 인공혼합물에서 혼증항균활성의 유의미한 감소가 나타났다($F_{7,24}=104.731$, $p<0.0001$). 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 유의미한 차이가 없었다. 따라서 geranial, neral, geranyl acetate, geraniol 그리고 (+)-limonene은 *A. tumefaciens*의 혼증항균활성 작용에 기여하며 geranial > neral > geranyl acetate > geraniol > (+)-limonene 순으로 기여도가 높은 것으로 나타났다.



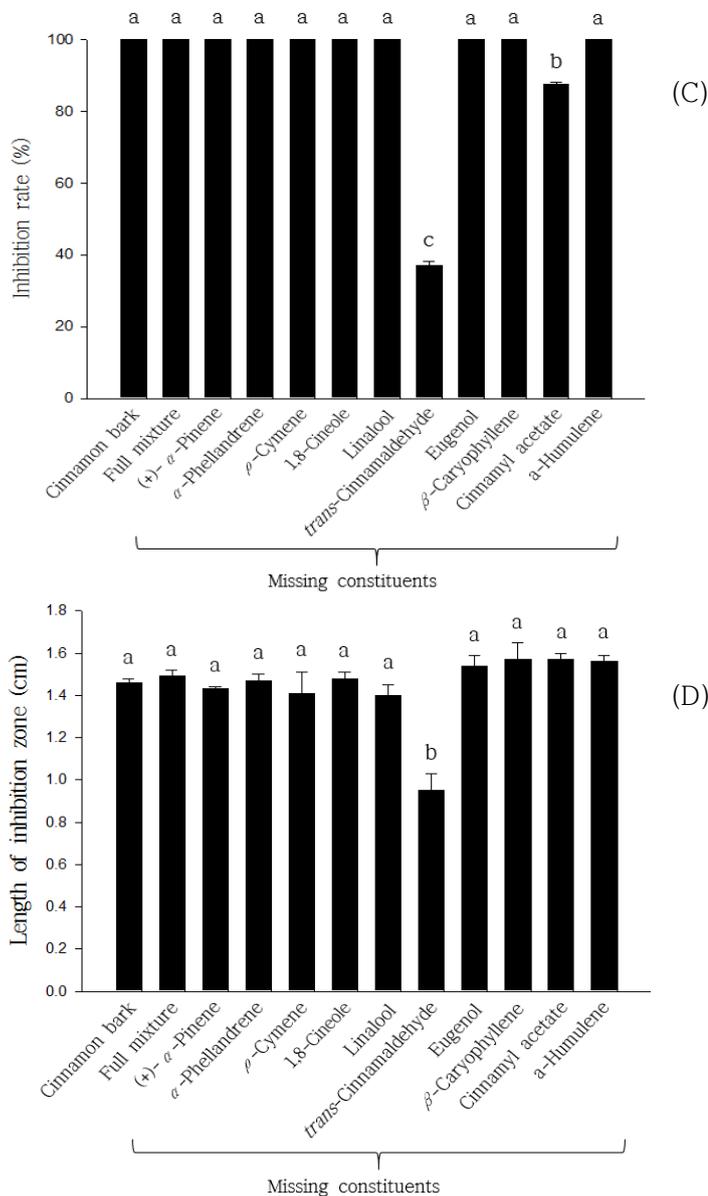
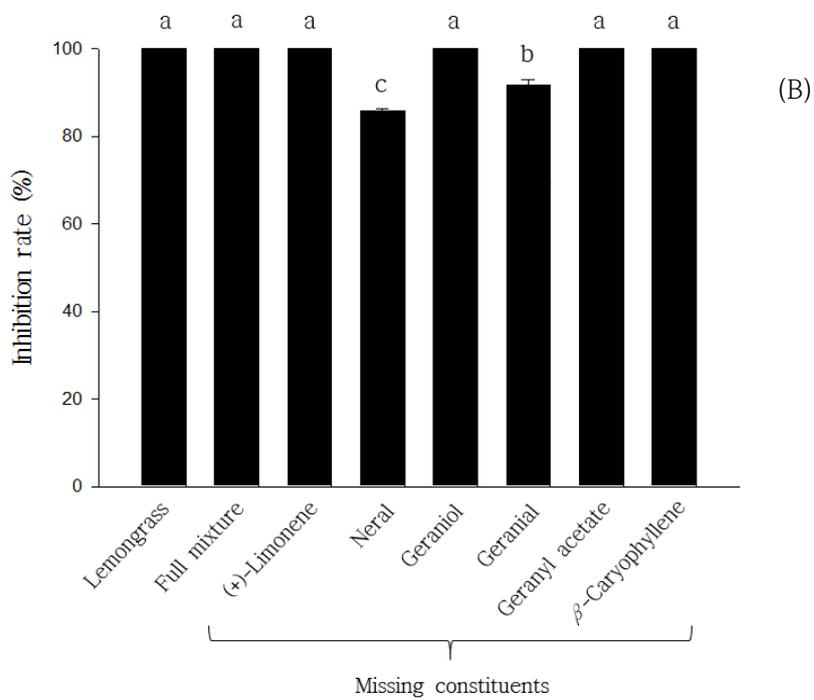
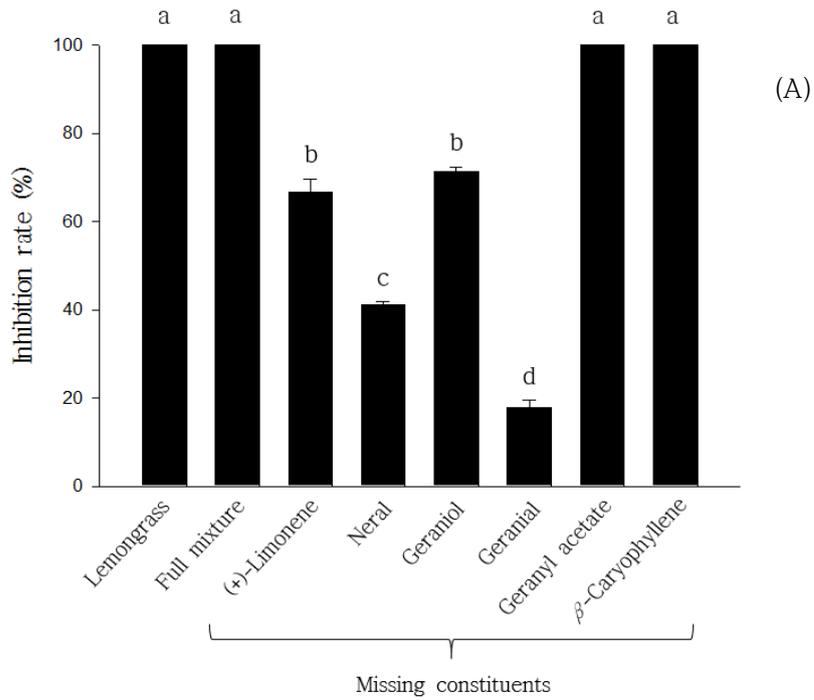


Figure 4. Fumigant antimicrobial activity of cinnamon bark oil & artificial blends against *Raffaelea quercus-mongolicae* (A), (B); *Rhizoctonia solani* (C); *Agrobacterium tumefaciens* (D), The treatment concentration of (A), (B), (C), (D) were 10, 1.25, 1.25 and 5 μ l/paper disc, respectively. Different letter indicates a significant difference between each other in graph [$F_{11,36}=233.608$, $p<0.0001$ (A); $F_{11,36}=22.840$, $p<0.0001$ (B); $F_{11,36}=2636.686$, $p<0.0001$ (C); $F_{11,36}=9.830$, $p<0.0001$ (D)]



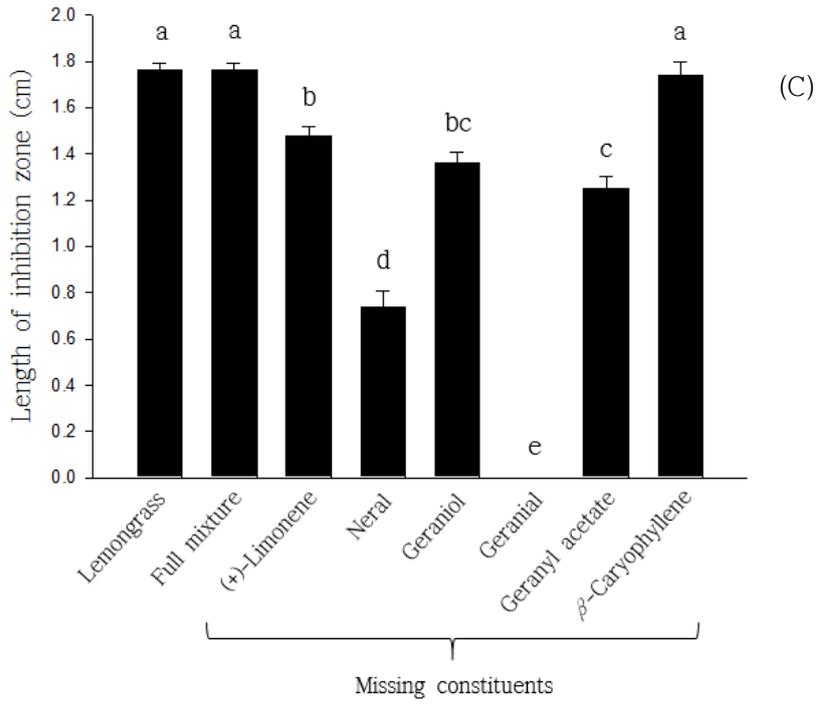


Figure 5. Fumigant antimicrobial activity of lemongrass oil & artificial Blends against *Raffaelea quercus-mongolicae* (A); *Rhizoctonia solani* (B); *Agrobacterium tumefaciens* (C) , The treatment concentration of (A), (B), (C) were 5, 5 and 10 μ l/paper disc, respectively. Different letter indicates a significant difference between each other in graph [$F_{7,24}=544.238$, $p<0.0001$ (A); $F_{7,24}=104.731$, $p<0.0001$ (B); $F_{7,24}=175.207$, $p<0.0001$ (C)]

3-2. 접촉 향균 활성

Cinnamon bark 정유에 대한 artificial blends의 직접 접촉법을 이용한 향균 활성 검정은 Table 14와 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대한 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 접촉향균활성은 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, linalool 그리고 *p*-cymene이 제거된 각각의 인공혼합물에서 향균활성의 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 차이가 없었다. 따라서 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, linalool 그리고 *p*-cymene이 *R. quercus-mongolicae*의 접촉향균활성 작용에 기여하며 *trans*-cinnamaldehyde가 *R. quercus-mongolicae*의 향균활성 작용에 기여하는 정도가 가장 높은 것으로 나타났다.

*R. solani*에 대해 cinnamon bark 정유 및 인공혼합물을 처리한 결과 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 접촉향균활성은 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, α -phellanderene 그리고 *p*-cymene이 제거된 각각의 인공혼합물에서 접촉향균활성의 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 차이가 없었다. 따라서 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, α -phellanderene 그리고 *p*-cymene이 *R. solani*의 접촉향균활성 작용에 기여하며 *trans*-cinnamaldehyde가 기여도가 가장 높은 것으로 나타났다.

*A. tumefaciens*에 대해 cinnamon bark 정유 및 인공혼합물을 처리한 결과 full mixture와 cinnamon bark 정유 간의 접촉향균활성은 차이가 없었다. 그러나 cinnamon bark 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여

동일한 실험을 했을 경우 *trans*-cinnamaldehyde 및 eugenol이 제거된 각각의 인공혼합물에서 접촉항균활성의 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 cinnamon bark 정유와 차이가 없었다. 따라서 *trans*-cinnamaldehyde 및 eugenol이 *R. solani*의 접촉항균활성 작용에 기여하며 *trans*-cinnamaldehyde가 기여도가 가장 높은 것으로 나타났다.

Lemongrass 정유에 대한 인공혼합물의 직접 접촉법을 이용한 항균활성 검정은 Table 15와 같다. *R. quercus-mongolicae*에 대한 full mixture와 lemongrass 정유 간의 접촉항균활성은 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 geranial 및 neral이 제거된 각각의 인공혼합물에서 항균활성의 감소가 나타났고, (+)-limonene, geranyl acetate 그리고 β -carophyllene이 제거된 각각의 인공혼합물에서 항균활성의 증가가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 차이가 없었다. 따라서 geranial 및 neral은 접촉항균활성 작용에 기여하며 geranial이 *R. quercus-mongolicae*의 항균활성 작용에 기여하는 정도가 가장 높은 것으로 나타났다. 반면 (+)-limonene, geranyl acetate 그리고 β -carophyllene의 경우 미약하게 길항작용을 미치는 것으로 나타났다.

*R. solani*에 대해 lemongrass 정유 및 인공혼합물을 처리한 결과 full mixture와 lemongrass 정유 간의 접촉항균활성은 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 geranial 및 neral이 제거된 각각의 인공혼합물에서 접촉항균활성의 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 차이가 없었다. 따라서 geranial 및 neral이 *R.*

*solani*의 접촉항균활성 작용에 기여하며 geranial이 기여도가 가장 높은 것으로 나타났다.

*A. tumefaciens*에 대해 lemongrass 정유 및 인공혼합물을 처리한 결과 full mixture와 lemongrass 정유 간의 접촉항균활성은 차이가 없었다. 그러나 lemongrass 정유 내 화합물을 하나씩 제거하여 동일한 실험을 했을 경우 geranial 및 neral이 제거된 각각의 인공혼합물에서 접촉항균활성의 감소가 나타났다. 그 외의 화합물을 제거한 인공혼합물에 대해서는 lemongrass 정유와 차이가 없었다. 따라서 geranial 및 neral이 *R. solani*의 접촉항균활성 작용에 기여하며 geranial이 기여도가 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 14. Contact antimicrobial activity of Cinnamon bark oil & artificial blends against three tree pathogens

Essential oils	MIC (Minimum inhibitory concentration, µg/ml)		
	Fungi		Bacteria
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Cinnamon bark	250	200	250
All mixture	250	200	250
(+)- α -Pinene ^a	250	200	250
α -Phellandrene ^a	250	250	250
ρ -Cymene ^a	300	250	250
1,8-Cineole ^a (=Eucalyptol)	250	200	250
Linalool ^a	300	200	250
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde ^a	>1200	1000	>1200
Eugenol ^a	300	250	300
β -Caryophyllene ^a	250	200	250
Cinnamyl acetate ^a	250	200	250
α -Humulene ^a	250	200	250

^aMissing constituent.

Table 15. Contact antimicrobial activity of lemongrass oil & artificial blends against three tree pathogens

Essential oils	MIC (Minimum inhibitory concentration, µg/ml)		
	Fungi		Bacteria
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Lemongrass	450	500	450
All mixture	450	500	450
(+)-Limonene ^a	400	500	450
Neral ^a	800	800	800
Geraniol ^a	450	500	450
Geranial ^a	>1200	>1200	>1200
Geranyl acetate ^a	400	500	450
β-Caryophyllene ^a	400	500	450

^aMissing constituent.

4. RNA염기서열분석 결과

4-1. 분석 데이터 전처리

trans-Cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 각각 혼증 처리한 *A. tumefaciens*의 mRNA 서열 분석 데이터 및 전처리 결과는 Table 16과 같다. 각 샘플의 mRNA를 101bp씩(read length) paired-end로 읽은 결과 total reads는 대조군에 경우 평균 27,938,990개, total bases는 평균 2.8Gbp의 데이터가 얻어졌고 *trans*-cinnamaldehyde 처리군의 평균 44,497,965개(4.5Gbp)의 데이터와 salicylaldehyde 처리군의 41,013,519개 (4.1Gb)의 데이터가 얻어졌다. 이 후 raw data에서 불필요한 염기(adapter 서열 및 low quality base)를 제거한 결과 대조군, *trans*-cinnamaldehyde, salicylaldehyde 처리군 각각 평균 27,485,306개 (98.4%), 43,867,569개 (98.58%), 40,047,509개 (97.64%)의 고품질의 clean data가 얻어졌다.

Table 16. Summary of sequences analysis

Sample	Raw		Clean data				
	Total reads	Total bases (bp)	Total reads	Percent	Mean read length (bp)	Total bases (bp)	Percent
Control-1	30,663,934	3,097,057,334	30,210,422	(98.52%)	100.50	4,325,480,899	(98.07%)
Control-2	31,816,426	3,213,459,026	31,242,930	(98.20%)	100.55	3,618,943,841	(97.31%)
Control-3	21,336,610	2,154,997,610	21,002,566	(98.43%)	100.58	4,873,927,226	(98.28%)
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-1	46,233,124	4,669,545,524	45,520,236	(98.46%)	100.66	4,582,183,093	(98.13%)
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-2	44,010,666	4,445,077,266	43,386,444	(98.58%)	100.66	4,367,340,563	(98.25%)
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-3	43,250,106	4,368,260,706	42,696,028	(98.72%)	100.71	4,299,763,903	(98.43%)
Salicylaldehyde-1	37,007,858	3,737,793,658	36,255,608	(97.97%)	100.52	3,644,322,391	(97.50%)
Salicylaldehyde-2	45,929,804	4,638,910,204	44,681,748	(97.28%)	100.35	4,483,974,181	(96.66%)
Salicylaldehyde-3	40,102,896	4,050,392,496	39,205,170	(97.76%)	100.49	3,939,911,462	(97.27%)

4-2. 레퍼런스 어셈블리

전 처리를 거친 clean data를 *A. tumefaciens* 레퍼런스에 맵핑한 결과, 대조군에 경우 평균 13,742,653 paired-end read 쌍 중 약 5.3%에 해당하는 726,314개가 맵핑되었고 *trans*-cinnamaldehyde, salicylaldehyde 처리군은 각각 평균 1,882,474 (8.6%), 1,669,466 (8.3%)의 paired-end read 쌍이 맵핑되어 발현분석에 이용되었다(Table 17). 맵핑률이 낮은 이유는 total RNA 추출 후 ribosomal RNA를 제거하는 단계를 거쳐 실험을 수행하였으나 rRNA, tRNA 등의 다른 RNA가 포함되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

Table 17. Summary of mapping results

Sample	Input (PE)	Mapped (PE)	Percent	Uniquely mapped (PE)	Percent
Control-1	15,105,211	689,917	4.57%	683,440	4.52%
Control-2	15,621,465	939,046	6.01%	929,212	5.95%
Control-3	10,501,283	549,978	5.24%	545,203	5.19%
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-1	22,760,118	1,822,708	8.01%	1,763,908	7.75%
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-2	21,693,222	1,919,063	8.85%	1,857,721	8.56%
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde-3	21,348,014	1,905,652	8.93%	1,853,101	8.68%
Salicylaldehyde-1	18,127,804	1,346,970	7.43%	1,300,796	7.18%
Salicylaldehyde-2	22,340,874	2,317,396	10.37%	2,261,447	10.12%
Salicylaldehyde-3	19,602,585	1,344,032	6.86%	1,306,965	6.67%

4-3. 차등발현유전자

trans-Cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 각각 혼증 처리한 *A. tumefaciens*의 유전자 발현이 유의미한 차이를 보였으며(p -value<0.05) logFC 값이 -1 이하일 경우 대조군에 비하여 유전자 발현이 감소함(Down-regulated gene)을 의미하며, logFC 값이 1 이상일 경우 대조군에 비하여 유전자 발현이 증가함(Up-regulated gene)을 의미한다. *trans*-cinnamaldehyde 처리시 571개의 유전자는 발현량이 감소하였고 반대로 623개의 유전자는 발현량이 증가하였다. Salicylaldehyde 처리시 575개의 유전자는 발현량이 감소하였고 반대로 566개의 유전자는 발현량이 증가하였다(Table 18). 그 중 logFC 절대값의 차이가 큰 순으로 상위 100개의 유전자를 정리하였다(Table 19~22). 또한 *trans*-cinnamaldehyde와 salicylaldehyde 처리시 공통적으로 438개의 유전자가 발현량이 감소하였고 반대로 463개의 유전자는 발현량이 증가하였다.

Table 18. The number of differentially expressed genes in this study

Experiment	Genes			
	Sum	Down	Up	
Control	<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1,194	571	623
	Salicylaldehyde	1,141	575	566

Table 19. Significantly down-regulated genes of *Agrobacterium tumefaciens* treated *trans*-cinnamaldehyde

Regulation	GeneID	ProteinID	Description	logFC	P-value	FDR
DOWN	gene942	WP_013635780.1	hypothetical protein	-10.1189	4.14E-54	9.47E-52
DOWN	gene1717	WP_038491319.1	hypothetical protein	-8.80638	1.37E-107	7.19E-104
DOWN	gene1716	WP_038491316.1	transporter	-8.75656	2.83E-86	2.48E-83
DOWN	gene2263	WP_038491970.1	UDP-hexose transferase	-7.60693	5.71E-13	1.03E-11
DOWN	gene5147	WP_038497368.1	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-7.06828	3.14E-95	5.51E-92
DOWN	gene5146	WP_038497365.1	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-6.44582	2.81E-63	9.87E-61
DOWN	gene2960	WP_038493746.1	FAD-dependent oxidoreductase	-6.4291	5.89E-10	7.95E-09
DOWN	gene3413	WP_003511245.1	hypothetical protein	-6.29899	4.60E-35	4.48E-33
DOWN	gene5145	WP_038497362.1	NAD-binding protein	-6.23845	7.10E-66	3.40E-63
DOWN	gene3414	WP_003511246.1	hypothetical protein	-6.17267	1.69E-15	4.10E-14
DOWN	gene361	WP_025592284.1	hypothetical protein	-6.12719	8.90E-23	3.84E-21
DOWN	gene4218	WP_013762318.1	iron ABC transporter substrate-binding protein	-5.92363	1.21E-84	9.10E-82
DOWN	gene1629	WP_038491201.1	anthranilate phosphoribosyltransferase	-5.80658	4.56E-07	4.35E-06
DOWN	gene777	WP_038490180.1	ATPase	-5.593	1.83E-61	6.02E-59
DOWN	gene4511	WP_013761025.1	curlin	-5.58971	3.65E-59	1.13E-56
DOWN	gene2187	WP_003513614.1	anthranilate synthase	-5.56374	4.55E-102	1.20E-98
DOWN	gene604	WP_004432239.1	2-hydroxy-acid oxidase	-5.49299	0.001154	0.006441
DOWN	gene1186	WP_025593255.1	hypothetical protein	-5.49136	5.10E-06	4.25E-05
DOWN	gene3448	WP_003511290.1	hypothetical protein	-5.42292	1.66E-26	9.18E-25
DOWN	gene2725	WP_038492590.1	threonine-phosphate decarboxylase	-5.3824	0.000234	0.00149
DOWN	gene4487	WP_038495474.1	multidrug ABC transporter ATPase	-5.2826	2.74E-05	0.00021
DOWN	gene4866	WP_034495582.1	hypothetical protein	-5.27135	0.001022	0.005787
DOWN	gene4217	WP_038494982.1	manganese/iron transporter ATP-binding protein	-5.23839	1.40E-89	1.47E-86
DOWN	gene1715	WP_003515731.1	DSBA oxidoreductase	-5.22227	4.31E-14	8.43E-13
DOWN	gene2422	WP_038492159.1	maleylacetate reductase	-5.20611	0.000229	0.001459

DOWN	gene3209	WP_038494091.1	aspartate aminotransferase family protein	-4.99486	6.96E-24	3.21E-22
DOWN	gene4603	WP_046205633.1	Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	-4.97362	7.42E-16	1.86E-14
DOWN	gene1570	WP_025593554.1	phospholipase	-4.97335	0.001585	0.008626
DOWN	gene729	WP_038490099.1	hypothetical protein	-4.9504	1.52E-19	5.19E-18
DOWN	gene798	WP_003511926.1	hypothetical protein	-4.90622	0.00067	0.003933
DOWN	gene2907	WP_003517694.1	ABC transporter substrate-binding protein	-4.86996	1.08E-35	1.14E-33
DOWN	gene1340	WP_019565561.1	hypothetical protein	-4.8588	0.000544	0.003239
DOWN	gene4215	WP_019566953.1	membrane protein	-4.81046	2.72E-63	9.87E-61
DOWN	gene4418	WP_038495375.1	choline-sulfatase	-4.79046	3.31E-55	8.30E-53
DOWN	gene1670	WP_003515641.1	xanthine phosphoribosyltransferase	-4.72205	0.010441	0.046458
DOWN	gene523	WP_003515120.1	hypothetical protein	-4.71614	0.001041	0.005875
DOWN	gene671	WP_038490041.1	enoyl-CoA hydratase	-4.7098	0.002499	0.012894
DOWN	gene3363	WP_003511176.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	-4.70143	2.37E-64	9.62E-62
DOWN	gene4458	WP_004431336.1	dihydrofolate reductase	-4.64706	3.69E-06	3.14E-05
DOWN	gene112	WP_013635241.1	hypothetical protein	-4.59498	0.007921	0.036385
DOWN	gene3362	WP_003511175.1	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	-4.58514	7.99E-55	1.91E-52
DOWN	gene561	WP_013635511.1	hypothetical protein	-4.56479	3.99E-07	3.86E-06
DOWN	gene2615	WP_003516612.1	30S ribosomal protein S16	-4.55946	6.30E-42	9.47E-40
DOWN	gene4444	WP_038495411.1	oxidoreductase	-4.54333	6.50E-09	7.89E-08
DOWN	gene20	WP_038489234.1	folylpolyglutamate synthase	-4.51694	0.001056	0.005937
DOWN	gene4216	WP_003516197.1	membrane protein	-4.50907	5.67E-44	9.33E-42
DOWN	gene119	WP_019564547.1	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	-4.49128	0.003919	0.019406
DOWN	gene3689	WP_038494392.1	chemotaxis protein	-4.49091	9.52E-31	6.78E-29
DOWN	gene5144	WP_038497593.1	D-amino-acid oxidase	-4.46911	0.001897	0.010105
DOWN	gene3258	WP_003510996.1	peptidase M20	-4.46901	0.0019	0.010115
DOWN	gene2198	WP_025594211.1	NnrU family protein	-4.3824	3.55E-22	1.46E-20
DOWN	gene3866	WP_013762049.1	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenase	-4.34416	0.01165	0.050936

DOWN	gene3078	WP_003510665.1	ABC transporter substrate-binding protein	-4.32499	5.32E-57	1.40E-54
DOWN	gene2264	WP_038491972.1	glycosyl transferase family A	-4.32409	0.002192	0.01147
DOWN	gene1779	WP_003495372.1	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	-4.30263	0.002014	0.010624
DOWN	gene4214	WP_003516193.1	hypothetical protein	-4.25412	4.15E-16	1.06E-14
DOWN	gene3918	WP_004431872.1	membrane protein	-4.2361	2.56E-31	1.93E-29
DOWN	gene3958	WP_004431986.1	hypothetical protein	-4.21744	0.008966	0.040828
DOWN	gene2322	WP_003513965.1	acetyltransferase	-4.2172	2.67E-07	2.66E-06
DOWN	gene207	WP_013635295.1	pilus assembly protein	-4.19396	0.004854	0.023249
DOWN	gene2432	WP_038492176.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	-4.17163	3.64E-10	5.16E-09
DOWN	gene1939	WP_038491528.1	ATPase	-4.12601	0.007627	0.035189
DOWN	gene1465	WP_003515258.1	hypothetical protein	-4.12593	0.007623	0.035189
DOWN	gene5098	WP_038497280.1	urea ABC transporter permease subunit UrtB	-4.08723	0.012065	0.052403
DOWN	gene101	WP_038489360.1	hypothetical protein	-4.08715	0.012077	0.05241
DOWN	gene4158	WP_038495885.1	NADPH-dependent ferric siderophore reductase	-4.08702	0.012096	0.052416
DOWN	gene3961	WP_004431991.1	hypothetical protein	-4.07068	0.006788	0.031593
DOWN	gene2083	WP_013636565.1	putative DNA modification/repair radical SAM protein	-4.06549	8.05E-05	0.000566
DOWN	gene1946	WP_003513109.1	GNAT family acetyltransferase	-4.05998	2.24E-71	1.31E-68
DOWN	gene4706	WP_038496401.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	-4.04894	2.59E-21	9.87E-20
DOWN	gene359	WP_038489697.1	heat-shock protein Hsp20	-4.01731	0.005733	0.026971
DOWN	gene2625	WP_019566018.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	-4.00017	9.13E-39	1.17E-36
DOWN	gene1192	WP_003512680.1	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit J	-3.99588	2.42E-18	7.51E-17
DOWN	gene4068	WP_019566850.1	hypothetical protein	-3.99452	0.005584	0.026366
DOWN	gene2434	WP_003514162.1	iron ABC transporter substrate-binding protein	-3.98561	2.21E-26	1.21E-24
DOWN	gene3904	WP_004431822.1	aspartate racemase	-3.97665	3.48E-12	5.80E-11
DOWN	gene3979	WP_035252645.1	histidine kinase	-3.95038	2.59E-10	3.76E-09
DOWN	gene2472	WP_025594477.1	EF-P lysine aminoacylase GenX	-3.94675	0.028054	0.108179
DOWN	gene4577	WP_038495619.1	SAM-dependent methyltransferase	-3.94647	3.11E-26	1.67E-24

DOWN	gene4378	WP_038495291.1	peptide ABC transporter ATP-binding protein	-3.94642	0.028007	0.108086
DOWN	gene1703	WP_038491300.1	formyl transferase	-3.92212	0.008833	0.040325
DOWN	gene5239	WP_010892447.1	conjugal transfer protein TrbC	-3.86716	0.001405	0.007734
DOWN	gene3916	WP_038494645.1	hypothetical protein	-3.85433	2.77E-23	1.23E-21
DOWN	gene1801	WP_038491400.1	lysine transporter LysE	-3.83402	6.13E-52	1.29E-49
DOWN	gene3364	WP_003511177.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	-3.82811	9.39E-54	2.06E-51
DOWN	gene102	WP_003514335.1	cold-shock protein	-3.81873	0.001009	0.005722
DOWN	gene4492	WP_038495484.1	catalase HPII	-3.81074	3.95E-06	3.35E-05
DOWN	gene1945	WP_038491538.1	phosphoserine phosphatase SerB	-3.80711	7.53E-28	4.50E-26
DOWN	gene3114	WP_038493940.1	ABC transporter substrate-binding protein	-3.7805	3.48E-06	2.97E-05
DOWN	gene3366	WP_038494152.1	acetyl-CoA acetyltransferase	-3.77431	2.00E-44	3.50E-42
DOWN	gene2285	WP_038491998.1	ABC transporter permease	-3.76394	1.06E-48	2.06E-46
DOWN	gene911	WP_003512141.1	cytochrome c biogenesis protein CcmE	-3.75155	0.018538	0.075707
DOWN	gene4491	WP_038495481.1	transglutaminase	-3.70467	1.20E-06	1.09E-05
DOWN	gene4213	WP_013762314.1	NAD(P)-dependent oxidoreductase	-3.68083	1.33E-20	4.90E-19
DOWN	gene713	WP_003511799.1	ribonuclease H	-3.65161	0.030583	0.115985
DOWN	gene3951	WP_038494689.1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-3.6516	0.030569	0.115985
DOWN	gene3061	WP_029658870.1	zinc ABC transporter permease	-3.6516	0.030562	0.115985
DOWN	gene4438	WP_004431287.1	membrane protein	-3.64659	1.04E-31	8.07E-30

Table 20. Significantly up-regulated genes of *Agrobacterium tumefaciens* treated *trans*-cinnamaldehyde

Regulation	GeneID	ProteinID	Description	logFC	P-value	FDR
UP	gene430	WP_038489774.1	secretion protein	7.420109	1.29E-12	2.24E-11
UP	gene3320	WP_003511099.1	alkanesulfonate monooxygenase%2C FMNH(2)-dependent	6.174827	0.000539	0.003215
UP	gene2772	WP_038493386.1	hypothetical protein	5.94885	9.53E-06	7.75E-05
UP	gene753	WP_003511865.1	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	5.590219	1.38E-18	4.35E-17
UP	gene3282	WP_038494125.1	iron-siderophore ABC transporter permease	5.481644	7.63E-05	0.000538
UP	gene80	WP_038489324.1	tRNA pseudouridine(55) synthase	5.402574	0.000107	0.000732
UP	gene3835	WP_004431626.1	membrane protein	5.188049	0.000472	0.002861
UP	gene601	WP_004432244.1	LysR family transcriptional regulator	5.021914	0.000882	0.005041
UP	gene4709	WP_038496411.1	LysR family transcriptional regulator	4.945255	0.00449	0.021766
UP	gene752	WP_003511863.1	sulfate adenylyltransferase subunit 2	4.817516	1.18E-07	1.23E-06
UP	gene4691	WP_038496366.1	hypothetical protein	4.80274	0.002034	0.010716
UP	gene3926	WP_004431900.1	TIGR02300 family protein	4.795147	2.29E-69	1.21E-66
UP	gene1019	WP_003512362.1	50S ribosomal protein L9	4.712755	1.28E-89	1.47E-86
UP	gene2798	WP_003508322.1	DNA-binding response regulator	4.68183	0.002569	0.013217
UP	gene108	WP_038489369.1	histidine kinase	4.672031	0.004074	0.020054
UP	gene515	WP_003515109.1	flagellar hook protein FlgK	4.572167	0.005175	0.024563
UP	gene2376	WP_013636765.1	lipase	4.564303	0.00374	0.018572
UP	gene736	WP_038490112.1	ring-cleavage extradiol dioxygenase	4.564296	0.003743	0.018572
UP	gene647	WP_019564223.1	LuxR family transcriptional regulator	4.5516	0.005302	0.025123
UP	gene44	WP_003516283.1	HslU--HslV peptidase proteolytic subunit	4.524739	0.008208	0.037572
UP	gene775	WP_038490177.1	ATP-dependent DNA ligase	4.442706	0.005098	0.024253
UP	gene908	WP_003512137.1	histidine kinase	4.423431	0.006739	0.031421
UP	gene3205	WP_013761580.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	4.37006	1.28E-42	1.99E-40
UP	gene3838	WP_004431634.1	transcriptional regulator	4.342607	1.16E-05	9.37E-05
UP	gene79	WP_003514294.1	30S ribosomal protein S15	4.325633	2.89E-73	1.90E-70

UP	gene237	WP_038489527.1	AraC family transcriptional regulator	4.29484	0.009009	0.040986
UP	gene979	WP_003512280.1	ABC transporter permease	4.289893	0.007906	0.036379
UP	gene1317	WP_038490900.1	tRNA-dihydrouridine synthase	4.289883	0.007913	0.036379
UP	gene3226	WP_003510937.1	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	4.283377	0.01198	0.052077
UP	gene4153	WP_038494929.1	isochorismate synthase	4.251374	0.014662	0.062093
UP	gene1462	WP_003515255.1	hypothetical protein	4.152763	0.012732	0.054621
UP	gene513	WP_003515107.1	transcriptional regulator	4.152747	0.012724	0.054621
UP	gene3902	WP_004431816.1	hypothetical protein	4.139862	0.011857	0.051712
UP	gene4300	WP_025595004.1	LacI family transcriptional regulator	4.137362	0.013483	0.05761
UP	gene3844	WP_003508451.1	hypothetical protein	4.135397	0.012482	0.053813
UP	gene3393	WP_003511221.1	thiosulfate transporter subunit	4.122871	1.45E-12	2.49E-11
UP	gene3204	WP_003510903.1	exopolysaccharide biosynthesis protein	4.11165	8.20E-19	2.68E-17
UP	gene199	WP_003514542.1	hypothetical protein	4.099274	5.00E-06	4.19E-05
UP	gene3075	WP_013761478.1	acetyltransferase	4.085522	3.02E-05	0.000229
UP	gene5163	WP_040132234.1	hypothetical protein	3.991912	2.07E-24	1.00E-22
UP	gene3227	WP_003510940.1	7-cyano-7-deazaguanine synthase	3.951183	8.56E-16	2.13E-14
UP	gene153	WP_013635262.1	ABC transporter ATP-binding protein	3.943915	0.019196	0.077849
UP	gene3202	WP_038494081.1	HlyD family type I secretion periplasmic adaptor subunit	3.939102	0.020318	0.081833
UP	gene2474	WP_003516843.1	hypothetical protein	3.929098	0.024984	0.097921
UP	gene65	WP_013635213.1	NrdH-redoxin	3.927505	0.028348	0.108922
UP	gene4191	WP_038494964.1	hypothetical protein	3.912411	0.028072	0.108179
UP	gene2291	WP_013636710.1	peroxiredoxin	3.839218	6.30E-46	1.18E-43
UP	gene1519	WP_003515356.1	hypothetical protein	3.828987	5.87E-30	3.96E-28
UP	gene3284	WP_003511043.1	ABC transporter substrate-binding protein	3.820568	2.75E-33	2.33E-31
UP	gene2666	WP_003516508.1	ferredoxin	3.797041	1.80E-33	1.55E-31
UP	gene3879	WP_004431750.1	succinoglycan biosynthesis protein exoh	3.764514	4.23E-30	2.89E-28
UP	gene3089	WP_038493908.1	peptide ABC transporter permease	3.762254	0.034565	0.12877

UP	gene3516	WP_019564885.1	amidohydrolase	3.760608	0.029337	0.112311
UP	gene36	WP_003516300.1	peptidoglycan-binding protein LysM	3.749922	0.027466	0.10631
UP	gene686	WP_013635602.1	cobalt ABC transporter ATP-binding protein	3.74992	0.027461	0.10631
UP	gene3317	WP_003511094.1	Rrf2 family transcriptional regulator	3.749917	0.02745	0.10631
UP	gene2220	WP_003513673.1	5-hydroxyisourate hydrolase	3.746639	0.02908	0.111472
UP	gene4107	WP_013762240.1	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	3.74357	0.033312	0.124807
UP	gene2097	WP_038491745.1	diguanylate phosphodiesterase	3.743561	0.03335	0.12486
UP	gene2431	WP_038492173.1	N-methylproline demethylase	3.741156	0.029096	0.111472
UP	gene3569	WP_003506183.1	50S ribosomal protein L31	3.730009	1.67E-36	1.87E-34
UP	gene3750	WP_038494485.1	formimidoylglutamate deiminase	3.723134	0.045989	0.164238
UP	gene3072	WP_019564584.1	membrane protein	3.709218	2.83E-39	3.82E-37
UP	gene1544	WP_003515393.1	acyl carrier protein	3.704232	2.42E-65	1.06E-62
UP	gene2471	WP_003516849.1	elongation factor P	3.664722	4.02E-50	8.13E-48
UP	gene2102	WP_025594124.1	hypothetical protein	3.649457	2.94E-13	5.49E-12
UP	gene2072	WP_003513373.1	aspartyl-tRNA amidotransferase subunit B	3.635553	2.53E-57	7.00E-55
UP	gene3139	WP_003510774.1	transcriptional regulator	3.634709	0.000285	0.001794
UP	gene3814	WP_004431573.1	two-component sensor histidine kinase	3.621523	1.74E-06	1.55E-05
UP	gene3596	WP_038494264.1	5'-nucleotidase	3.616467	0.000278	0.001748
UP	gene177	WP_038489449.1	glucokinase	3.605268	1.25E-36	1.43E-34
UP	gene1796	WP_003516040.1	30S ribosomal protein S4	3.529778	2.75E-58	8.05E-56
UP	gene5284	WP_010892493.1	hypothetical protein	3.522568	0.048706	0.171959
UP	gene461	WP_013635453.1	chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase	3.522547	0.048681	0.171959
UP	gene3522	WP_013761809.1	co-chaperone YbbN	3.522541	0.048673	0.171959
UP	gene4232	WP_038494998.1	nitroreductase	3.51011	0.044049	0.158168
UP	gene966	WP_003512245.1	ribonuclease III	3.504056	0.046745	0.166172
UP	gene3964	WP_004432010.1	glutathione synthetase	3.504052	0.046775	0.166172
UP	gene3016	WP_003517909.1	sugar ABC transporter permease	3.500949	0.043915	0.157794

UP	gene1123	WP_013635903.1	FMN-dependent NADH-azoreductase	3.486068	4.42E-29	2.73E-27
UP	gene2171	WP_013636627.1	7-cyano-7-deazaguanine reductase	3.421652	3.88E-33	3.24E-31
UP	gene94	WP_025592028.1	NADH pyrophosphatase	3.364925	0.001117	0.006261
UP	gene3283	WP_035251551.1	ABC transporter substrate-binding protein	3.353822	2.49E-09	3.14E-08
UP	gene4237	WP_038495010.1	hypothetical protein	3.350055	6.15E-37	7.20E-35
UP	gene4317	WP_013762397.1	ABC transporter substrate-binding protein	3.349546	2.04E-09	2.59E-08
UP	gene3206	WP_003510909.1	exopolysaccharide biosynthesis protein	3.339316	9.58E-43	1.53E-40
UP	gene5304	WP_010892506.1	protein virE1	3.311985	2.51E-06	2.17E-05
UP	gene3424	WP_003511258.1	glycosyl transferase family 1	3.301704	4.20E-09	5.21E-08
UP	gene1699	WP_019566127.1	hypothetical protein	3.290636	2.37E-13	4.46E-12
UP	gene3852	WP_004431673.1	recombination regulator RecX	3.277729	1.47E-17	4.28E-16
UP	gene501	WP_003515090.1	motility protein A	3.229954	7.45E-31	5.37E-29
UP	gene2716	WP_038492577.1	precorrin-2 C(20)-methyltransferase	3.206961	8.53E-13	1.51E-11
UP	gene121	WP_003514394.1	heme ABC transporter ATP-binding protein	3.15904	0.001989	0.010512
UP	gene1209	WP_003496403.1	50S ribosomal protein L33	3.145183	3.70E-18	1.12E-16
UP	gene1198	WP_003512693.1	MBL fold metallo-hydrolase	3.133151	0.000457	0.002771
UP	gene3496	WP_038494198.1	cupin	3.123984	0.004336	0.021173
UP	gene4268	WP_038495894.1	peptidase M14	3.12096	4.96E-26	2.64E-24
UP	gene1904	WP_003513041.1	membrane protein	3.053454	4.94E-08	5.45E-07

Table 21. Significantly down-regulated genes of *Agrobacterium tumefaciens* treated salicylaldehyde

Regulation	GeneID	ProteinID	Description	logFC	P-value	FDR
DOWN	gene1716	WP_038491316.1	transporter	-10.9967	5.52E-55	2.91E-51
DOWN	gene1717	WP_038491319.1	hypothetical protein	-8.49833	1.13E-51	2.97E-48
DOWN	gene3413	WP_003511245.1	hypothetical protein	-7.59015	8.68E-29	6.53E-26
DOWN	gene942	WP_013635780.1	hypothetical protein	-6.59905	3.52E-28	2.06E-25
DOWN	gene4218	WP_013762318.1	iron ABC transporter substrate-binding protein	-6.26774	3.54E-10	1.41E-08
DOWN	gene5146	WP_038497365.1	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-6.25535	2.22E-30	2.33E-27
DOWN	gene561	WP_013635511.1	hypothetical protein	-5.99287	2.99E-07	6.67E-06
DOWN	gene5147	WP_038497368.1	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-5.90892	5.19E-23	1.82E-20
DOWN	gene4217	WP_038494982.1	manganese/iron transporter ATP-binding protein	-5.90661	9.64E-18	1.88E-15
DOWN	gene4511	WP_013761025.1	curlin	-5.76644	8.32E-34	1.09E-30
DOWN	gene1715	WP_003515731.1	DSBA oxidoreductase	-5.69799	8.07E-12	5.59E-10
DOWN	gene2263	WP_038491970.1	UDP-hexose transferase	-5.68379	8.02E-10	3.08E-08
DOWN	gene4215	WP_019566953.1	membrane protein	-5.63914	1.85E-12	1.43E-10
DOWN	gene609	WP_019564245.1	membrane protein	-5.57736	5.05E-25	2.41E-22
DOWN	gene777	WP_038490180.1	ATPase	-5.57027	3.67E-25	1.93E-22
DOWN	gene5145	WP_038497362.1	NAD-binding protein	-5.43937	3.92E-30	3.44E-27
DOWN	gene2210	WP_003513656.1	hypothetical protein	-5.43157	5.91E-10	2.30E-08
DOWN	gene3961	WP_004431991.1	hypothetical protein	-5.42997	0.002033	0.015267
DOWN	gene3414	WP_003511246.1	hypothetical protein	-5.36144	1.05E-11	6.91E-10
DOWN	gene1186	WP_025593255.1	hypothetical protein	-5.31001	4.28E-05	0.000522
DOWN	gene3595	WP_038494261.1	membrane protein	-5.21546	7.79E-05	0.000869
DOWN	gene815	WP_003511960.1	threonine transporter RhtB	-5.12584	0.000152	0.001574
DOWN	gene239	WP_003514613.1	hypothetical protein	-5.06227	0.001066	0.008738
DOWN	gene4533	WP_038495552.1	GntR family transcriptional regulator	-5.05423	3.36E-07	7.38E-06
DOWN	gene4216	WP_003516197.1	membrane protein	-4.95239	6.72E-11	3.22E-09

DOWN	gene3362	WP_003511175.1	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	-4.93846	8.10E-20	2.03E-17
DOWN	gene1669	WP_003515639.1	universal stress protein	-4.93632	0.000193	0.001913
DOWN	gene2247	WP_038491950.1	LysR family transcriptional regulator	-4.86117	0.004869	0.031183
DOWN	gene625	WP_019564237.1	hypothetical protein	-4.75745	0.000739	0.006349
DOWN	gene1012	WP_038490521.1	AraC family transcriptional regulator	-4.74366	0.013076	0.071429
DOWN	gene361	WP_025592284.1	hypothetical protein	-4.71777	4.41E-13	3.69E-11
DOWN	gene2322	WP_003513965.1	acetyltransferase	-4.54634	8.42E-07	1.60E-05
DOWN	gene1781	WP_003516006.1	hypothetical protein	-4.49645	0.004753	0.030576
DOWN	gene1670	WP_003515641.1	xanthine phosphoribosyltransferase	-4.47781	0.018717	0.096878
DOWN	gene3096	WP_025595758.1	sugar ABC transporter ATP-binding protein	-4.45056	1.95E-06	3.36E-05
DOWN	gene4706	WP_038496401.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	-4.43135	5.75E-14	5.71E-12
DOWN	gene3363	WP_003511176.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	-4.38722	3.53E-12	2.54E-10
DOWN	gene4492	WP_038495484.1	catalase HPII	-4.35608	1.23E-05	0.000175
DOWN	gene20	WP_038489234.1	folylpolyglutamate synthase	-4.34452	0.002831	0.020001
DOWN	gene4491	WP_038495481.1	transglutaminase	-4.32907	3.49E-07	7.53E-06
DOWN	gene3083	WP_038493893.1	methyltransferase	-4.30792	0.000187	0.001862
DOWN	gene5144	WP_038497593.1	D-amino-acid oxidase	-4.29439	0.004704	0.030372
DOWN	gene119	WP_019564547.1	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	-4.27415	0.007871	0.046348
DOWN	gene4444	WP_038495411.1	oxidoreductase	-4.26414	8.68E-07	1.64E-05
DOWN	gene468	WP_038489802.1	chemotaxis protein	-4.22398	0.0083	0.048436
DOWN	gene3615	WP_038494284.1	potassium-transporting ATPase subunit A	-4.20412	3.12E-12	2.35E-10
DOWN	gene3474	WP_003511320.1	electron transfer flavoprotein subunit beta	-4.19224	0.016017	0.084652
DOWN	gene2264	WP_038491972.1	glycosyl transferase family A	-4.15356	0.004708	0.030372
DOWN	gene3904	WP_004431822.1	aspartate racemase	-4.144	2.28E-11	1.27E-09
DOWN	gene1550	WP_026330927.1	type I methionyl aminopeptidase	-4.11205	0.005037	0.032023
DOWN	gene3866	WP_013762049.1	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenase	-4.10849	0.021062	0.10559
DOWN	gene2093	WP_035251909.1	LysR family transcriptional regulator	-4.0612	9.91E-20	2.27E-17

DOWN	gene3689	WP_038494392.1	chemotaxis protein	-4.00595	1.18E-16	1.94E-14
DOWN	gene3958	WP_004431986.1	hypothetical protein	-4.00561	0.01598	0.084543
DOWN	gene2198	WP_025594211.1	NnrU family protein	-3.96288	1.71E-12	1.35E-10
DOWN	gene101	WP_038489360.1	hypothetical protein	-3.95782	0.022139	0.109532
DOWN	gene4158	WP_038495885.1	NADPH-dependent ferric siderophore reductase	-3.95782	0.022139	0.109532
DOWN	gene2020	WP_013636520.1	molecular chaperone DjlA	-3.93821	1.16E-11	7.42E-10
DOWN	gene2625	WP_019566018.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	-3.90666	2.38E-18	5.01E-16
DOWN	gene2432	WP_038492176.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	-3.87601	2.93E-08	8.39E-07
DOWN	gene657	WP_003511699.1	F0F1 ATP synthase subunit B	-3.87381	0.015425	0.082265
DOWN	gene729	WP_038490099.1	hypothetical protein	-3.842	8.84E-11	4.01E-09
DOWN	gene3498	WP_003509888.1	50S ribosomal protein L28	-3.84019	0.010517	0.059595
DOWN	gene359	WP_038489697.1	heat-shock protein Hsp20	-3.84017	0.010507	0.059595
DOWN	gene948	WP_038490434.1	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	-3.82731	4.62E-17	8.38E-15
DOWN	gene4068	WP_019566850.1	hypothetical protein	-3.82535	0.0104	0.059119
DOWN	gene4577	WP_038495619.1	SAM-dependent methyltransferase	-3.82526	4.30E-15	5.27E-13
DOWN	gene881	WP_003512084.1	AsnC family transcriptional regulator	-3.82184	2.20E-05	0.000292
DOWN	gene2118	WP_038491766.1	glycosyl transferase	-3.81147	0.030386	0.140997
DOWN	gene4603	WP_046205633.1	Ti-type conjugative transfer relaxase TraA	-3.80084	9.20E-10	3.49E-08
DOWN	gene2960	WP_038493746.1	FAD-dependent oxidoreductase	-3.79748	9.07E-06	0.000134
DOWN	gene1574	WP_038491128.1	hypothetical protein	-3.79512	0.001383	0.010914
DOWN	gene3127	WP_038493959.1	ABC transporter substrate-binding protein	-3.75424	0.016397	0.086228
DOWN	gene2472	WP_025594477.1	EF-P lysine aminoacylase GenX	-3.72568	0.042871	0.184617
DOWN	gene1176	WP_003496481.1	transcriptional regulator	-3.72545	0.04281	0.184617
DOWN	gene3675	WP_038494370.1	Hrp-dependent type III effector protein	-3.67669	0.031747	0.144677
DOWN	gene3952	WP_038494692.1	acetoacetyl-CoA synthetase	-3.6766	0.031783	0.144677
DOWN	gene2511	WP_038492295.1	microcystin degradation protein MlrC	-3.64829	5.09E-07	1.04E-05
DOWN	gene2972	WP_003517825.1	nitrilotriacetate monoxygenase component A	-3.6458	0.003671	0.024774

DOWN	gene4458	WP_004431336.1	dihydrofolate reductase	-3.63549	0.000287	0.002723
DOWN	gene3903	WP_004431819.1	class II glutamine amidotransferase	-3.63505	3.62E-12	2.57E-10
DOWN	gene2905	WP_003517690.1	peptide ABC transporter permease	-3.61252	1.44E-10	6.16E-09
DOWN	gene401	WP_003514899.1	2-nitropropane dioxygenase	-3.6045	2.91E-07	6.54E-06
DOWN	gene1242	WP_025593298.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	-3.59516	2.04E-07	4.69E-06
DOWN	gene604	WP_004432239.1	2-hydroxy-acid oxidase	-3.5802	0.020189	0.102484
DOWN	gene2806	WP_038493466.1	membrane protein	-3.57347	3.69E-16	5.40E-14
DOWN	gene102	WP_003514335.1	cold-shock protein	-3.56814	0.003657	0.024774
DOWN	gene1173	WP_003496491.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-3.56515	6.30E-07	1.25E-05
DOWN	gene3174	WP_038494041.1	alanine racemase	-3.55958	0.029368	0.13717
DOWN	gene2725	WP_038492590.1	threonine-phosphate decarboxylase	-3.52633	0.008379	0.048682
DOWN	gene4509	WP_038495499.1	curlin	-3.45948	0.02473	0.12004
DOWN	gene3169	WP_038494029.1	ABC transporter ATP-binding protein	-3.44206	0.029683	0.1384
DOWN	gene3236	WP_003510957.1	quinatase	-3.44067	1.16E-16	1.94E-14
DOWN	gene1597	WP_003515498.1	glyoxalase	-3.43564	0.046933	0.19885
DOWN	gene3243	WP_003510968.1	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	-3.43563	0.046956	0.19885
DOWN	gene3437	WP_003511276.1	endo-1%2C3-1%2C4-beta-glycanase	-3.43563	0.046965	0.19885
DOWN	gene3951	WP_038494689.1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-3.43562	0.046976	0.19885
DOWN	gene5100	WP_038497283.1	ABC transporter ATP-binding protein	-3.43561	0.047009	0.19885

Table 22. Significantly up-regulated genes of *Agrobacterium tumefaciens* treated salicylaldehyde

Regulation	GeneID	ProteinID	Description	logFC	P-value	FDR
UP	gene3320	WP_003511099.1	alkanesulfonate monooxygenase%2C FMNH(2)-dependent	6.698528	3.69E-05	0.000458
UP	gene430	WP_038489774.1	secretion protein	6.675346	7.54E-08	1.95E-06
UP	gene753	WP_003511865.1	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	5.873054	1.38E-10	6.00E-09
UP	gene2376	WP_013636765.1	lipase	5.862981	0.000225	0.002212
UP	gene601	WP_004432244.1	LysR family transcriptional regulator	5.771727	1.79E-05	0.000243
UP	gene3075	WP_013761478.1	acetyltransferase	5.609339	2.54E-07	5.77E-06
UP	gene2772	WP_038493386.1	hypothetical protein	5.451263	0.000235	0.002293
UP	gene80	WP_038489324.1	tRNA pseudouridine(55) synthase	5.20355	0.000238	0.002316
UP	gene752	WP_003511863.1	sulfate adenyltransferase subunit 2	5.104774	4.95E-07	1.01E-05
UP	gene3393	WP_003511221.1	thiosulfate transporter subunit	5.070073	9.83E-10	3.69E-08
UP	gene4691	WP_038496366.1	hypothetical protein	5.030547	0.000688	0.005949
UP	gene3227	WP_003510940.1	7-cyano-7-deazaguanine synthase	5.025721	7.55E-19	1.66E-16
UP	gene108	WP_038489369.1	histidine kinase	4.918016	0.000866	0.00729
UP	gene1019	WP_003512362.1	50S ribosomal protein L9	4.856366	1.38E-34	2.43E-31
UP	gene3835	WP_004431626.1	membrane protein	4.799997	0.001588	0.012271
UP	gene3838	WP_004431634.1	transcriptional regulator	4.723115	1.10E-07	2.68E-06
UP	gene3139	WP_003510774.1	transcriptional regulator	4.633067	2.48E-06	4.17E-05
UP	gene3317	WP_003511094.1	Rrf2 family transcriptional regulator	4.601482	0.006749	0.040786
UP	gene194	WP_046205507.1	iron ABC transporter substrate-binding protein	4.595226	0.006764	0.040832
UP	gene3202	WP_038494081.1	HlyD family type I secretion periplasmic adaptor subunit	4.567379	0.004556	0.029574
UP	gene2474	WP_003516843.1	hypothetical protein	4.559272	0.003366	0.023038
UP	gene3926	WP_004431900.1	TIGR02300 family protein	4.548647	1.95E-28	1.28E-25
UP	gene3282	WP_038494125.1	iron-siderophore ABC transporter permease	4.545924	0.004462	0.029035
UP	gene3225	WP_003510936.1	7-cyano-7-deazaguanosine (preQ0) biosynthesis protein QueE	4.544363	1.05E-09	3.93E-08
UP	gene4232	WP_038494998.1	nitroreductase	4.532301	0.005095	0.032314

UP	gene1519	WP_003515356.1	hypothetical protein	4.529015	5.14E-20	1.35E-17
UP	gene462	WP_003515008.1	hypothetical protein	4.504766	2.01E-05	0.000268
UP	gene1292	WP_013636020.1	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	4.459725	0.010498	0.059595
UP	gene1381	WP_038490979.1	sugar ABC transporter ATP-binding protein	4.425569	1.55E-20	4.81E-18
UP	gene3205	WP_013761580.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	4.390046	1.80E-20	5.26E-18
UP	gene3204	WP_003510903.1	exopolysaccharide biosynthesis protein	4.358371	2.59E-13	2.27E-11
UP	gene3844	WP_003508451.1	hypothetical protein	4.276798	0.01252	0.069012
UP	gene908	WP_003512137.1	histidine kinase	4.256088	0.015755	0.083688
UP	gene770	WP_038490163.1	glutathione S-transferase	4.249148	0.012979	0.071094
UP	gene3226	WP_003510937.1	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	4.24282	0.007499	0.044402
UP	gene5284	WP_010892493.1	hypothetical protein	4.24282	0.007498	0.044402
UP	gene3022	WP_038493821.1	mandelate racemase	4.227317	0.008976	0.051753
UP	gene79	WP_003514294.1	30S ribosomal protein S15	4.153457	1.44E-23	5.43E-21
UP	gene5163	WP_040132234.1	hypothetical protein	4.135351	4.31E-16	6.14E-14
UP	gene751	WP_003511861.1	sulfate adenylyltransferase	4.12822	1.57E-06	2.75E-05
UP	gene4300	WP_025595004.1	LacI family transcriptional regulator	4.064007	0.026382	0.126364
UP	gene2170	WP_038491837.1	ABC transporter substrate-binding protein	4.064004	0.026332	0.126238
UP	gene2648	WP_034502258.1	hypothetical protein	4.047485	0.043401	0.186348
UP	gene237	WP_038489527.1	AraC family transcriptional regulator	4.029636	0.019069	0.098062
UP	gene2798	WP_003508322.1	DNA-binding response regulator	4.029629	0.019076	0.098062
UP	gene3852	WP_004431673.1	recombination regulator RecX	4.017359	1.77E-09	6.31E-08
UP	gene3496	WP_038494198.1	cupin	4.016583	6.56E-05	0.000753
UP	gene2522	WP_038492313.1	aminotransferase	3.921105	0.033394	0.150628
UP	gene1544	WP_003515393.1	acyl carrier protein	3.914023	2.63E-24	1.07E-21
UP	gene3569	WP_003506183.1	50S ribosomal protein L31	3.877429	1.12E-13	1.03E-11
UP	gene2494	WP_003516807.1	cyclic nucleotide-binding protein	3.869526	0.026606	0.127091
UP	gene640	WP_046205582.1	chemotaxis protein CheY	3.867661	0.020468	0.103302

UP	gene775	WP_038490177.1	ATP-dependent DNA ligase	3.846443	0.020326	0.102826
UP	gene3297	WP_003511066.1	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase	3.843436	0.020375	0.102932
UP	gene3516	WP_019564885.1	amidohydrolase	3.83809	0.020267	0.102779
UP	gene3016	WP_003517909.1	sugar ABC transporter permease	3.827203	0.028893	0.135556
UP	gene2666	WP_003516508.1	ferredoxin	3.826096	3.82E-11	1.93E-09
UP	gene3583	WP_038494243.1	hypothetical protein	3.821632	0.026502	0.126748
UP	gene283	WP_038489600.1	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	3.784164	8.99E-11	4.05E-09
UP	gene3617	WP_038494287.1	L-asparaginase	3.771352	1.04E-08	3.33E-07
UP	gene685	WP_038490066.1	transporter	3.760703	2.02E-08	6.04E-07
UP	gene1796	WP_003516040.1	30S ribosomal protein S4	3.758018	2.15E-24	9.43E-22
UP	gene1861	WP_003495195.1	30S ribosomal protein S17	3.745192	4.77E-15	5.58E-13
UP	gene177	WP_038489449.1	glucokinase	3.72276	8.55E-20	2.05E-17
UP	gene153	WP_013635262.1	ABC transporter ATP-binding protein	3.6661	0.044336	0.189509
UP	gene1313	WP_038490891.1	ATPase AAA	3.656629	0.045718	0.194865
UP	gene1379	WP_003515236.1	sugar ABC transporter permease	3.65343	2.06E-08	6.12E-07
UP	gene2291	WP_013636710.1	peroxiredoxin	3.646736	7.24E-21	2.38E-18
UP	gene647	WP_019564223.1	LuxR family transcriptional regulator	3.627709	0.037533	0.165472
UP	gene3726	WP_038494438.1	hypothetical protein	3.62768	0.037497	0.165454
UP	gene3890	WP_004431787.1	sarcosine oxidase subunit delta	3.624771	0.03874	0.170081
UP	gene1382	WP_003515239.1	sugar ABC transporter substrate-binding protein	3.621463	3.98E-11	1.98E-09
UP	gene3431	WP_003511266.1	glycosyl transferase	3.615545	0.031557	0.144367
UP	gene2253	WP_046205604.1	chemotaxis protein	3.60092	0.031562	0.144367
UP	gene513	WP_003515107.1	transcriptional regulator	3.593458	0.034061	0.152854
UP	gene2097	WP_038491745.1	diguanylate phosphodiesterase	3.590088	0.047635	0.20044
UP	gene1255	WP_025593313.1	phenazine biosynthesis protein PhzF	3.585169	0.039761	0.173694
UP	gene2471	WP_003516849.1	elongation factor P	3.545824	3.41E-20	9.44E-18
UP	gene1699	WP_019566127.1	hypothetical protein	3.535491	1.04E-08	3.33E-07

UP	gene2102	WP_025594124.1	hypothetical protein	3.526964	4.96E-08	1.36E-06
UP	gene3879	WP_004431750.1	succinoglycan biosynthesis protein exoh	3.523596	3.48E-13	2.95E-11
UP	gene2171	WP_013636627.1	7-cyano-7-deazaguanine reductase	3.501453	1.36E-17	2.56E-15
UP	gene3424	WP_003511258.1	glycosyl transferase family 1	3.489655	1.55E-06	2.72E-05
UP	gene4272	WP_038495072.1	glutathione ABC transporter ATP-binding protein	3.486437	1.99E-12	1.52E-10
UP	gene186	WP_038489461.1	gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	3.446659	2.36E-06	3.98E-05
UP	gene1884	WP_003519353.1	transcription termination/antitermination protein NusG	3.439042	5.36E-18	1.08E-15
UP	gene1209	WP_003496403.1	50S ribosomal protein L33	3.431693	9.51E-14	8.94E-12
UP	gene39	WP_003516294.1	imidazole glycerol phosphate synthase cyclase subunit	3.425353	2.38E-09	8.29E-08
UP	gene1631	WP_046205565.1	cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory protein	3.404773	0.002263	0.016687
UP	gene4268	WP_038495894.1	peptidase M14	3.387309	3.48E-16	5.24E-14
UP	gene2159	WP_013636617.1	N-acetyltransferase GCN5	3.361246	9.07E-12	6.12E-10
UP	gene1044	WP_038490565.1	glycosyl transferase family 1	3.3098	1.08E-14	1.14E-12
UP	gene3074	WP_038493885.1	MarR family transcriptional regulator	3.296113	3.01E-08	8.56E-07
UP	gene1820	WP_003507846.1	ArsR family transcriptional regulator	3.237448	1.92E-15	2.46E-13
UP	gene121	WP_003514394.1	heme ABC transporter ATP-binding protein	3.232247	0.004708	0.030372
UP	gene2186	WP_038491856.1	extensin	3.1977	1.40E-09	5.13E-08
UP	gene1549	WP_038491101.1	sugar fermentation stimulation protein SfsA	3.148794	0.006937	0.041591
UP	gene4317	WP_013762397.1	ABC transporter substrate-binding protein	3.147187	5.34E-05	0.000627

4-4. 차등발현유전자집단

차등발현유전자 중 유사한 생물학적 대사를 수행하는 유전자집단을 GO그룹으로 분류하고 대조군과 비교하여 유의미한 차이(p -value <0.05)가 나는 차등발현유전자집단을 정리하였다(Table 23~26). *trans*-Cinnamaldehyde를 처리한 실험군에 경우 biological process에 속하는 유전자 집단은 총 29개이며 그 중 18개는 발현이 저하되었고 11개는 발현이 증가되었다. Cellular component에 속하는 유전자 집단은 총 10개이며 그 중 5개는 발현이 저하되었고 5개는 발현이 증가되었다. Molecular function에 속하는 유전자 집단은 총 22개이며 그 중 11개는 발현이 저하되었고 11개는 발현이 증가되었다. Salicylaldehyde를 처리한 실험군에 경우 biological process에 속하는 유전자 집단은 총 26개이며 그 중 19개는 발현이 저하되었고 7개는 발현이 증가되었다. Cellular component에 속하는 유전자 집단은 총 8개이며 그 중 4개는 발현이 저하되었고 4개는 발현이 증가되었다. Molecular function에 속하는 유전자 집단은 총 22개이며 그 중 14개는 발현이 저하되었고 8개는 발현이 증가되었다.

Table 23. Gene ontology down-regulated groups of *Agrobacterium tumefaciens* treated *trans*-cinnamaldehyde (down regulation)

Ontology	Regulation	GO ID	GO Term	Size	Es	Nes	Nom P-Val	Fdr Q-Val	Fwer P-Val
BP	DOWN	GO:0000746	conjugation	28	-0.62	-1.74	0.00	0.06	0.34
BP	DOWN	GO:0008152	metabolic process	157	-0.45	-1.68	0.00	0.11	0.61
BP	DOWN	GO:0055085	transmembrane transport	157	-0.44	-1.66	0.00	0.11	0.72
BP	DOWN	GO:0006810	transport	390	-0.40	-1.60	0.00	0.17	0.92
BP	DOWN	GO:0010043	response to zinc ion	7	-0.87	-1.75	0.00	0.06	0.30
BP	DOWN	GO:0015749	monosaccharide transport	20	-0.67	-1.76	0.00	0.06	0.27
BP	DOWN	GO:0006865	amino acid transport	73	-0.44	-1.46	0.01	0.32	1.00
BP	DOWN	GO:0019740	nitrogen utilization	9	-0.77	-1.68	0.01	0.09	0.63
BP	DOWN	GO:0030001	metal ion transport	10	-0.75	-1.65	0.01	0.11	0.74
BP	DOWN	GO:0042884	microcin transport	7	-0.77	-1.53	0.02	0.21	0.99
BP	DOWN	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	19	-0.61	-1.58	0.02	0.20	0.96
BP	DOWN	GO:0055072	iron ion homeostasis	30	-0.54	-1.54	0.02	0.20	0.99
BP	DOWN	GO:0043164	gram-negative-bacterium-type cell wall biogenesis	8	-0.75	-1.56	0.02	0.19	0.98
BP	DOWN	GO:0006212	uracil catabolic process	8	-0.77	-1.58	0.02	0.19	0.96
BP	DOWN	GO:0006935	chemotaxis	47	-0.48	-1.49	0.03	0.25	1.00
BP	DOWN	GO:0015833	peptide transport	71	-0.42	-1.40	0.04	0.36	1.00
BP	DOWN	GO:0006869	lipid transport	13	-0.63	-1.51	0.04	0.25	1.00
BP	DOWN	GO:0006950	response to stress	8	-0.70	-1.45	0.05	0.32	1.00
BP	DOWN	GO:0006811	ion transport	32	-0.50	-1.45	0.05	0.32	1.00
CC	DOWN	GO:0042597	periplasmic space	78	-0.53	-1.81	0.00	0.04	0.11
CC	DOWN	GO:0030288	outer membrane-bounded periplasmic space	63	-0.51	-1.68	0.00	0.10	0.62
CC	DOWN	GO:0016020	membrane	399	-0.36	-1.45	0.00	0.32	1.00
CC	DOWN	GO:0043190	atp-binding cassette (abc) transporter complex	103	-0.44	-1.58	0.00	0.19	0.96
MF	DOWN	GO:0005215	transporter activity	189	-0.49	-1.85	0.00	0.06	0.06
MF	DOWN	GO:0008483	transaminase activity	13	-0.77	-1.83	0.00	0.04	0.08
MF	DOWN	GO:0015145	monosaccharide transmembrane transporter activity	21	-0.66	-1.76	0.00	0.08	0.27
MF	DOWN	GO:0022857	transmembrane transporter activity	36	-0.58	-1.73	0.00	0.06	0.34
MF	DOWN	GO:0015591	d-ribose transmembrane transporter activity	7	-0.78	-1.55	0.01	0.20	0.99

MF	DOWN	GO:0016807	cysteine-type carboxypeptidase activity	8	-0.75	-1.57	0.01	0.19	0.97
MF	DOWN	GO:0008137	nadh dehydrogenase (ubiquinone) activity	14	-0.69	-1.64	0.01	0.12	0.80
MF	DOWN	GO:0005315	inorganic phosphate transmembrane transporter activity	5	-0.86	-1.57	0.01	0.19	0.97
MF	DOWN	GO:0071972	peptidoglycan l,d-transpeptidase activity	8	-0.75	-1.54	0.02	0.20	0.99
MF	DOWN	GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	34	-0.53	-1.56	0.02	0.19	0.98
MF	DOWN	GO:0016755	transferase activity, transferring amino-acyl groups	8	-0.75	-1.54	0.02	0.20	0.99
MF	DOWN	GO:0015407	monosaccharide-transporting atpase activity	12	-0.66	-1.50	0.03	0.26	1.00
MF	DOWN	GO:0015595	spermidine-importing atpase activity	5	-0.79	-1.43	0.04	0.32	1.00
MF	DOWN	GO:0000062	fatty-acyl-coa binding	8	-0.72	-1.49	0.04	0.26	1.00
MF	DOWN	GO:0030145	manganese ion binding	23	-0.57	-1.50	0.04	0.31	1.00
MF	DOWN	GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	42	-0.49	-1.43	0.04	0.37	1.00
MF	DOWN	GO:0008658	penicillin binding	8	-0.72	-1.48	0.04	0.33	1.00
MF	DOWN	GO:0016807	cysteine-type carboxypeptidase activity	8	-0.72	-1.49	0.04	0.35	1.00
MF	DOWN	GO:0016755	transferase activity, transferring amino-acyl groups	8	-0.72	-1.45	0.05	0.33	1.00
MF	DOWN	GO:0016491	oxidoreductase activity	174	-0.37	-1.25	0.05	0.54	1.00

BP = Biological process; CC = Cellular component; MF = Molecular function.

Table 24. Gene ontology up-regulated groups of *Agrobacterium tumefaciens* treated *trans*-cinnamaldehyde (up regulation)

Ontology	Regulation	GO ID	GO Term	Size	Es	Nes	Nom P-Val	Fdr Q-Val	Fwer P-Val
BP	UP	GO:0006412	translation	62	0.70	2.60	0.00	0.00	0.00
BP	UP	GO:0009423	chorismate_biosynthetic_process	6	0.89	1.82	0.00	0.03	0.25
BP	UP	GO:0009073	aromatic_amino_acid_family_biosynthetic_process	6	0.89	1.81	0.00	0.03	0.28
BP	UP	GO:0006457	protein_folding	15	0.66	1.81	0.01	0.03	0.29
BP	UP	GO:0008616	queuosine_biosynthetic_process	7	0.85	1.79	0.00	0.03	0.36
BP	UP	GO:0000271	polysaccharide_biosynthetic_process	26	0.58	1.76	0.00	0.05	0.46
BP	UP	GO:0009088	threonine_biosynthetic_process	5	0.90	1.73	0.00	0.06	0.59
CC	UP	GO:0005840	ribosome	48	0.71	2.50	0.00	0.00	0.00
CC	UP	GO:0005622	intracellular	107	0.46	1.87	0.00	0.02	0.12
CC	UP	GO:0015934	large_ribosomal_subunit	7	0.85	1.83	0.00	0.03	0.22
CC	UP	GO:0005737	cytoplasm	462	0.26	1.22	0.01	0.63	1.00
MF	UP	GO:0019843	rrna_binding	36	0.82	2.70	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0003735	structural_constituent_of_ribosome	53	0.72	2.58	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0000049	trna_binding	22	0.74	2.15	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0003723	rna_binding	46	0.51	1.79	0.00	0.04	0.36
MF	UP	GO:0003746	translation_elongation_factor_activity	6	0.82	1.68	0.01	0.10	0.81
MF	UP	GO:0080130	l-phenylalanine:2-oxoglutarate_aminotransferase_activity	5	0.86	1.64	0.00	0.14	0.91
MF	UP	GO:0015297	antiporter_activity	13	0.60	1.55	0.05	0.27	0.99
MF	UP	GO:0016301	kinase_activity	21	0.53	1.55	0.02	0.26	0.99

BP = Biological process; CC = Cellular component; MF = Molecular function.

Table 25. Gene ontology down-regulated groups of *Agrobacterium tumefaciens* treated salicylaldehyde (down regulation)

Ontology	Regulation	GO ID	GO Term	Size	Es	Nes	Nom P-Val	Fdr Q-Val	Fwer P-Val
BP	DOWN	GO:0055072	iron ion homeostasis	30	-0.66	-1.76	0.00	0.15	0.15
BP	DOWN	GO:0010043	response to zinc ion	7	-0.88	-1.73	0.00	0.13	0.24
BP	DOWN	GO:0006810	transport	390	-0.41	-1.42	0.00	0.38	1.00
BP	DOWN	GO:0008152	metabolic process	157	-0.48	-1.59	0.00	0.28	0.90
BP	DOWN	GO:0055085	transmembrane transport	157	-0.46	-1.52	0.00	0.29	1.00
BP	DOWN	GO:0019740	nitrogen utilization	9	-0.76	-1.61	0.01	0.42	0.83
BP	DOWN	GO:0035999	tetrahydrofolate interconversion	7	-0.81	-1.59	0.01	0.27	0.91
BP	DOWN	GO:0006811	ion transport	32	-0.56	-1.54	0.02	0.27	0.98
BP	DOWN	GO:0006865	amino acid transport	73	-0.47	-1.47	0.02	0.32	1.00
BP	DOWN	GO:0006212	uracil catabolic process	8	-0.76	-1.55	0.02	0.27	0.98
BP	DOWN	GO:0019310	inositol catabolic process	7	-0.76	-1.47	0.02	0.32	1.00
BP	DOWN	GO:0043164	gram-negative-bacterium-type cell wall biogenesis	8	-0.72	-1.46	0.02	0.33	1.00
BP	DOWN	GO:0030001	metal ion transport	10	-0.71	-1.54	0.03	0.26	0.99
BP	DOWN	GO:0015833	peptide transport	71	-0.44	-1.36	0.03	0.41	1.00
BP	DOWN	GO:0006869	lipid transport	13	-0.64	-1.48	0.03	0.33	1.00
BP	DOWN	GO:0000746	conjugation	28	-0.54	-1.46	0.04	0.33	1.00
BP	DOWN	GO:0006508	proteolysis	45	-0.47	-1.37	0.05	0.43	1.00
BP	DOWN	GO:0008360	regulation of cell shape	41	-0.50	-1.42	0.05	0.38	1.00
CC	DOWN	GO:0016020	membrane	399	-0.40	-1.39	0.00	0.42	1.00
CC	DOWN	GO:0042597	periplasmic space	78	-0.50	-1.55	0.00	0.30	0.97
CC	DOWN	GO:0043190	atp-binding cassette (abc) transporter complex	103	-0.46	-1.48	0.01	0.31	1.00
CC	DOWN	GO:0030288	outer membrane-bounded periplasmic space	63	-0.48	-1.45	0.01	0.32	1.00
CC	DOWN	GO:0005887	integral component of plasma membrane	58	-0.46	-1.41	0.03	0.39	1.00
MF	DOWN	GO:0005215	transporter activity	189	-0.47	-1.59	0.00	0.31	0.90
MF	DOWN	GO:0004673	protein histidine kinase activity	5	-0.86	-1.55	0.00	0.29	0.97
MF	DOWN	GO:0015591	d-ribose transmembrane transporter activity	7	-0.84	-1.64	0.01	0.38	0.72
MF	DOWN	GO:0022857	transmembrane transporter activity	36	-0.56	-1.58	0.01	0.27	0.93
MF	DOWN	GO:0008483	transaminase activity	13	-0.70	-1.61	0.01	0.34	0.84
MF	DOWN	GO:0048038	quinone binding	18	-0.64	-1.57	0.01	0.26	0.94

MF	DOWN	GO:0005315	inorganic phosphate transmembrane transporter activity	5	-0.85	-1.52	0.01	0.31	1.00
MF	DOWN	GO:0015197	peptide transporter activity	9	-0.73	-1.52	0.02	0.30	1.00
MF	DOWN	GO:0008137	nadh dehydrogenase (ubiquinone) activity	14	-0.68	-1.60	0.02	0.35	0.89
MF	DOWN	GO:0071972	peptidoglycan 1,d-transpeptidase activity	8	-0.72	-1.48	0.03	0.32	1.00
MF	DOWN	GO:0020037	heme binding	25	-0.57	-1.49	0.03	0.34	1.00
MF	DOWN	GO:0016887	atpase activity	181	-0.39	-1.30	0.03	0.52	1.00
MF	DOWN	GO:0051287	nad binding	44	-0.49	-1.40	0.03	0.39	1.00
MF	DOWN	GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	34	-0.52	-1.45	0.04	0.32	1.00
MF	DOWN	GO:0030145	manganese ion binding	23	-0.57	-1.50	0.04	0.31	1.00
MF	DOWN	GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	42	-0.49	-1.43	0.04	0.37	1.00
MF	DOWN	GO:0008658	penicillin binding	8	-0.72	-1.48	0.04	0.33	1.00
MF	DOWN	GO:0016807	cysteine-type carboxypeptidase activity	8	-0.72	-1.49	0.04	0.35	1.00
MF	DOWN	GO:0016755	transferase activity, transferring amino-acyl groups	8	-0.72	-1.45	0.05	0.33	1.00
MF	DOWN	GO:0016491	oxidoreductase activity	174	-0.37	-1.25	0.05	0.54	1.00

BP = Biological process; CC = Cellular component; MF = Molecular function.

Table 26. Gene ontology up-regulated groups of *Agrobacterium tumefaciens* treated salicylaldehyde

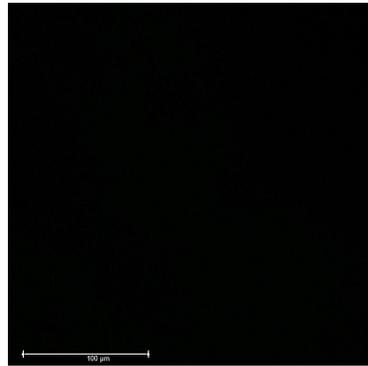
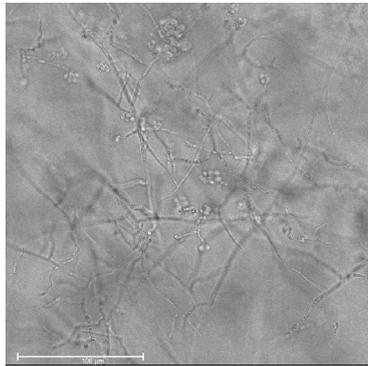
Ontology	Regulation	GO ID	GO Term	Size	Es	Nes	Nom P-Val	Fdr Q-Val	Fwer P-Val
BP	UP	GO:0006412	translation	62	0.75	2.98	0.00	0.00	0.00
BP	UP	GO:0008616	queuosine_biosynthetic_process	7	0.84	1.91	0.00	0.03	0.18
BP	UP	GO:0052143	chemotaxis_on_or_near_host_involved_in_symbiotic_interaction	7	0.81	1.84	0.01	0.05	0.38
BP	UP	GO:0043039	trna_aminoacylation	7	0.83	1.83	0.00	0.04	0.39
BP	UP	GO:0009423	chorismate_biosynthetic_process	6	0.79	1.68	0.02	0.16	0.87
BP	UP	GO:0000271	polysaccharide_biosynthetic_process	26	0.50	1.68	0.02	0.15	0.87
BP	UP	GO:0006396	rna_processing	11	0.64	1.68	0.03	0.14	0.87
BP	UP	GO:0006139	nucleobase-containing_compound_metabolic_process	5	0.84	1.67	0.01	0.14	0.88
BP	UP	GO:0009073	aromatic_amino_acid_family_biosynthetic_process	6	0.79	1.67	0.03	0.13	0.88
BP	UP	GO:0015684	ferrous_iron_transport	8	0.69	1.63	0.03	0.16	0.94
BP	UP	GO:0009088	threonine_biosynthetic_process	5	0.81	1.61	0.03	0.17	0.95
CC	UP	GO:0005840	ribosome	48	0.73	2.83	0.00	0.00	0.00
CC	UP	GO:0015935	small_ribosomal_subunit	7	0.85	1.93	0.00	0.02	0.15
CC	UP	GO:0015934	large_ribosomal_subunit	7	0.84	1.89	0.00	0.03	0.21
CC	UP	GO:0005622	intracellular	107	0.42	1.87	0.00	0.03	0.26
CC	UP	GO:0005737	cytoplasm	462	0.23	1.20	0.00	0.52	1.00
MF	UP	GO:0019843	rrna_binding	36	0.88	3.23	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0003735	structural_constituent_of_ribosome	53	0.76	2.98	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0000049	trna_binding	22	0.80	2.56	0.00	0.00	0.00
MF	UP	GO:0003723	rna_binding	46	0.52	1.98	0.00	0.01	0.08
MF	UP	GO:0016876	ligase_activity_forming_aminoacyl-trna_and_related_compounds	5	0.84	1.71	0.01	0.13	0.79
MF	UP	GO:0003746	translation_elongation_factor_activity	6	0.76	1.65	0.02	0.14	0.91
MF	UP	GO:0015093	ferrous_iron_transmembrane_transporter_activity	8	0.69	1.63	0.04	0.16	0.94
MF	UP	GO:0005488	binding	6	0.73	1.59	0.05	0.19	0.98
MF	UP	GO:0004812	aminoacyl-trna_ligase_activity	15	0.52	1.52	0.04	0.29	1.00
MF	UP	GO:0005525	gtp_binding	41	0.40	1.49	0.01	0.29	1.00
MF	UP	GO:0003924	gtpase_activity	20	0.47	1.47	0.04	0.32	1.00

BP = Biological process; CC = Cellular component; MF = Molecular function.

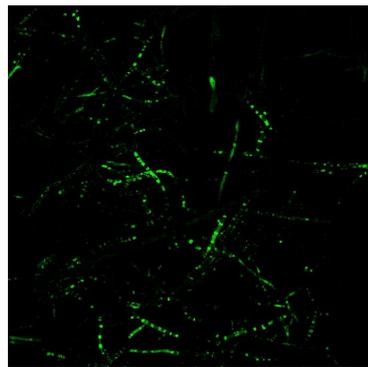
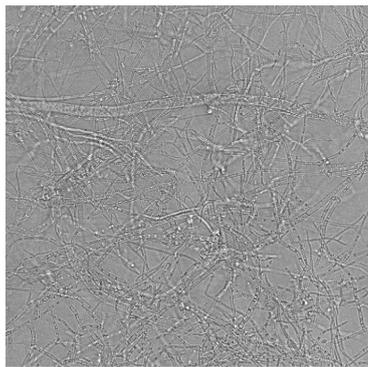
5. 세포 내 활성산소종(ROS) 발현결과

5-1. Confocal을 이용한 활성산소종 발현 관찰

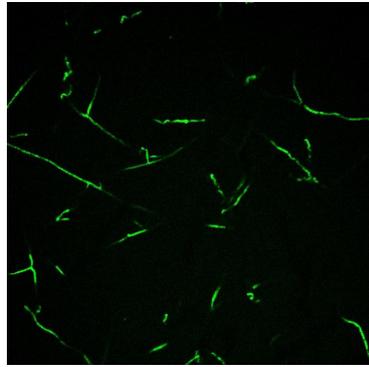
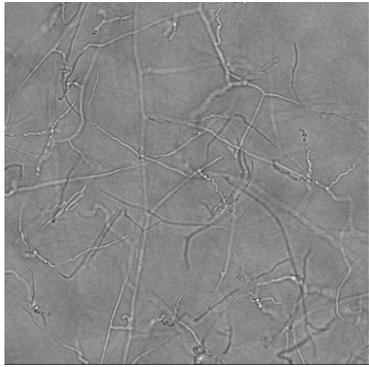
R. quercus-mongolicae, *R. solani* 그리고 *A. tumefaciens*에 대한 대조구 및 cinnamon bark, lemongrass, *trans*-cinnamaldehyde, neral, geranial, salicylaldehyde, hydrocinnamaldehyde의 활성산소종 발현 정도를 confocal을 통해 관찰하였다(Figure 6~8).



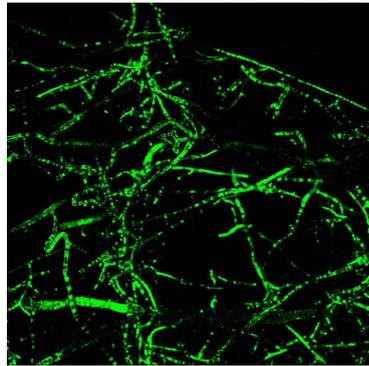
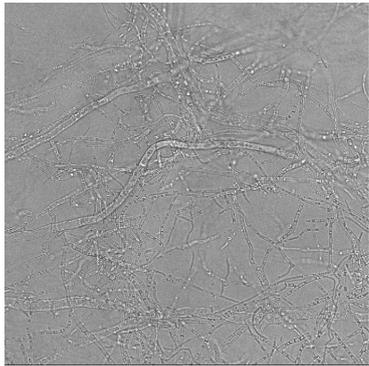
Control



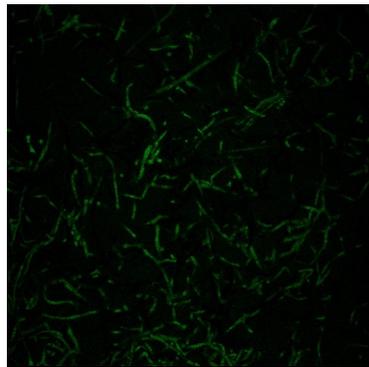
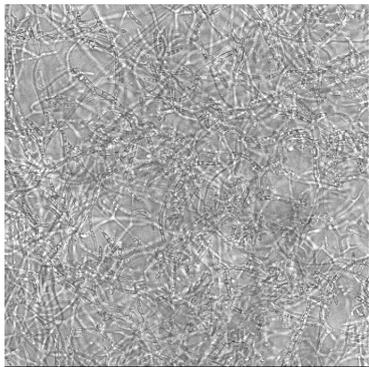
Cinnamon bark (20 μl)



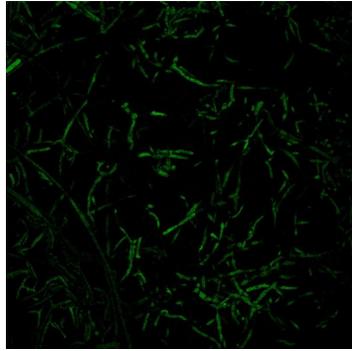
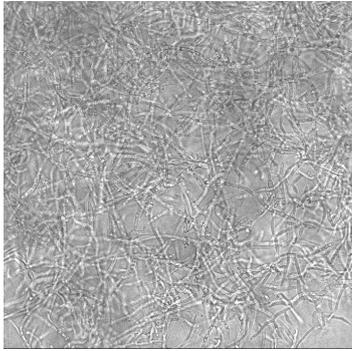
Lemongrass (20 μ l)



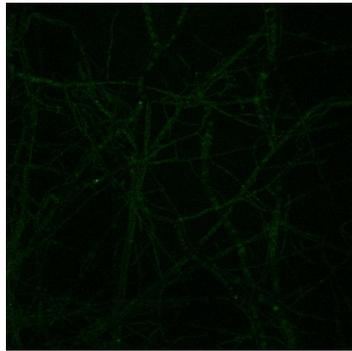
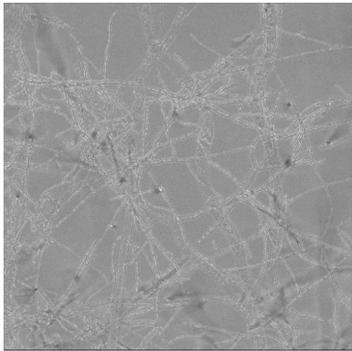
trans-Cinnamaldehyde (10 μ l)



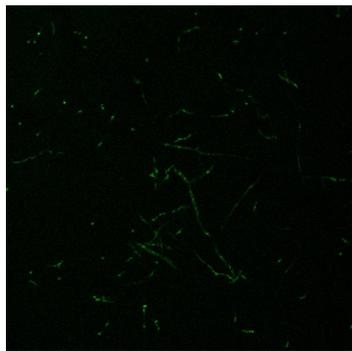
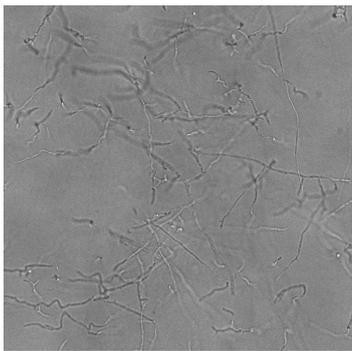
Neral (10 μ l)



Geranial (10 μ l)

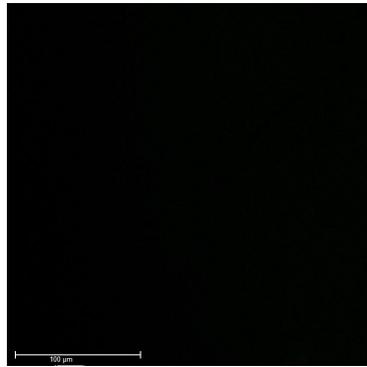
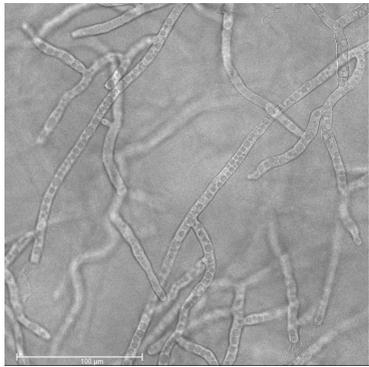


Salicylaldehyde (10 μ l)

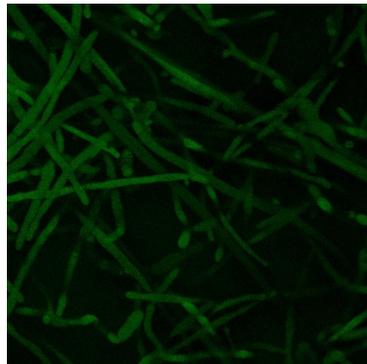
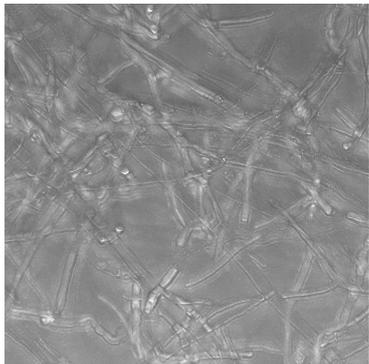


Hydrocinnamaldhyde (10 μ l)

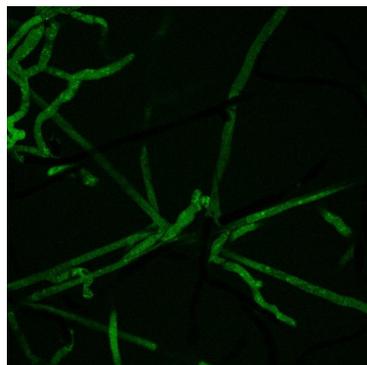
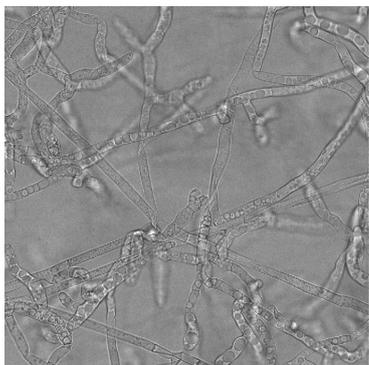
Figure 6. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in *Raffaelea quercus-mongolicae*.



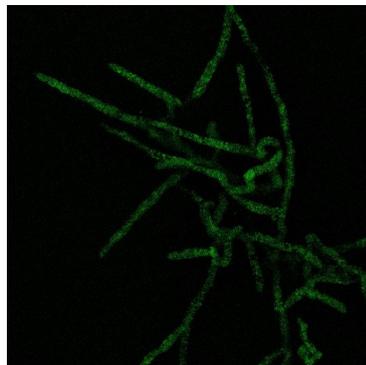
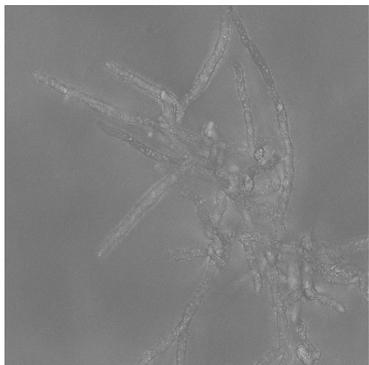
Control



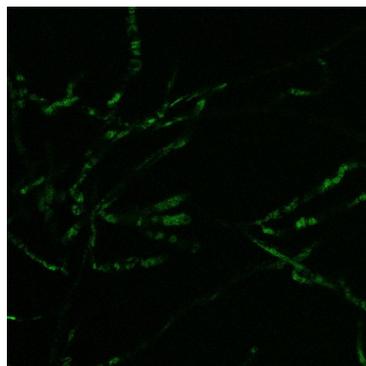
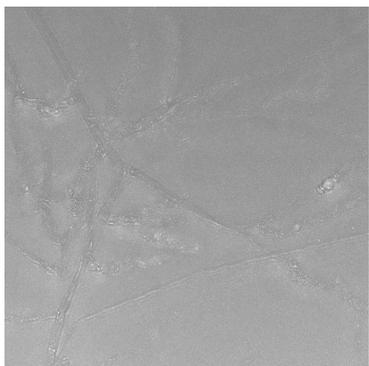
Cinnamon bark (20 μl)



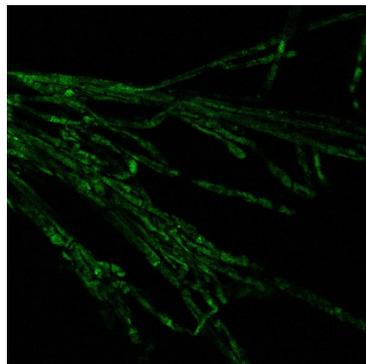
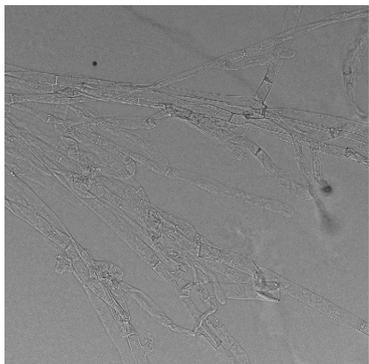
Lemongrass (20 μl)



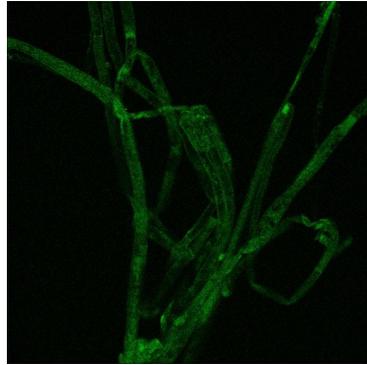
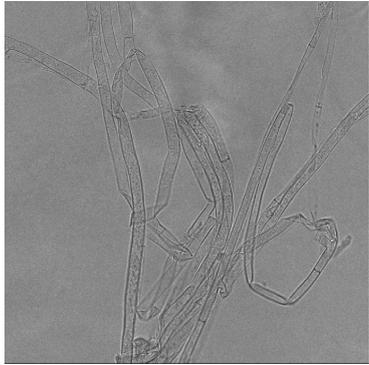
trans-Cinnamaldehyde (10 μ l)



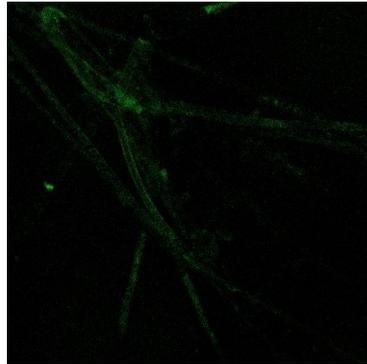
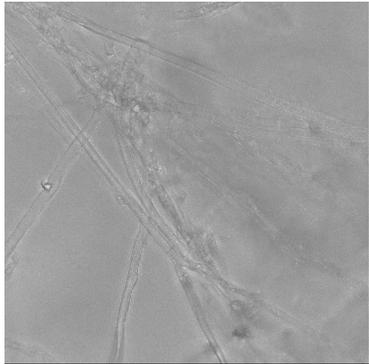
Neral (10 μ l)



Geranial (10 μ l)

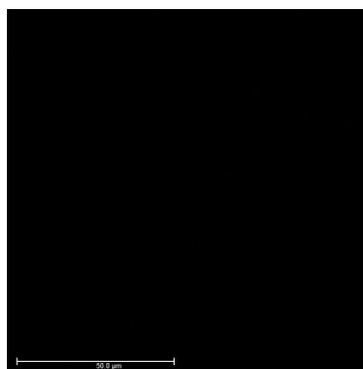
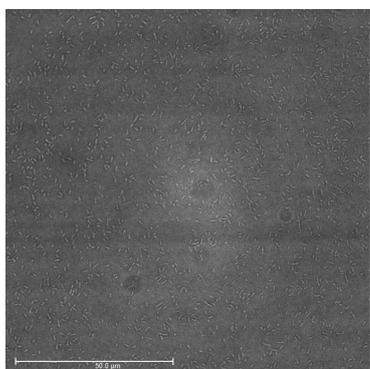


Salicylaldehyde (10 μ l)

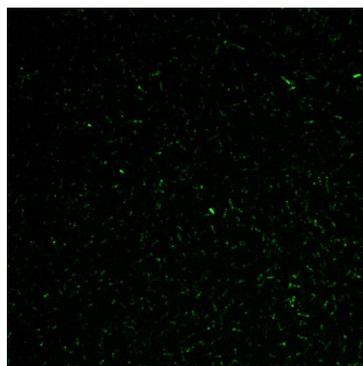
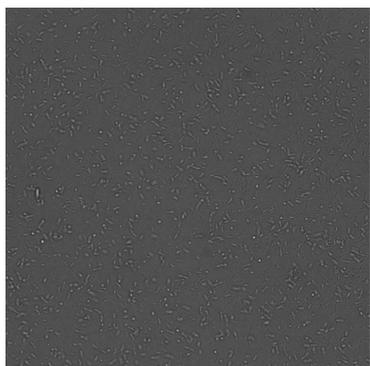


Hydrocinnamaldhyde (10 μ l)

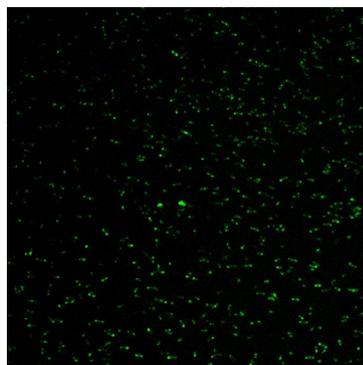
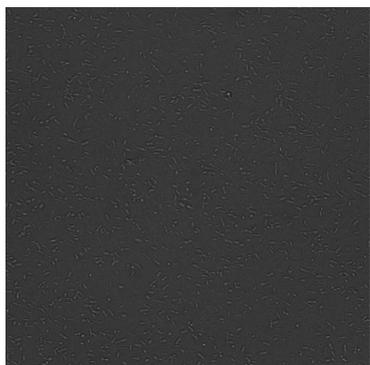
Figure 7. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in *Rhizoctonia solani*.



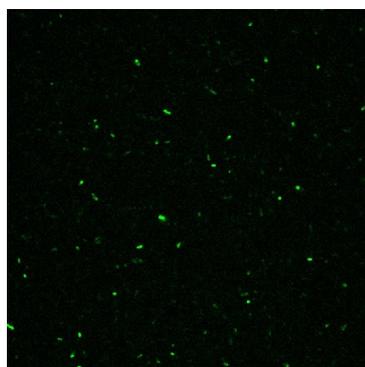
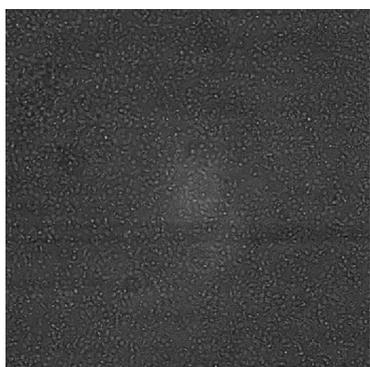
Control



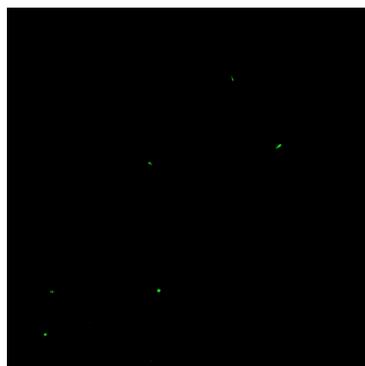
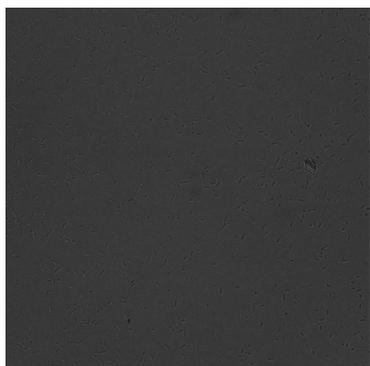
Cinnamon bark (10 μ l)



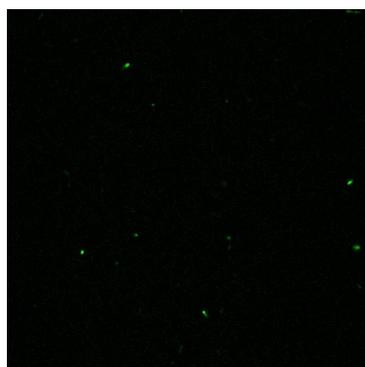
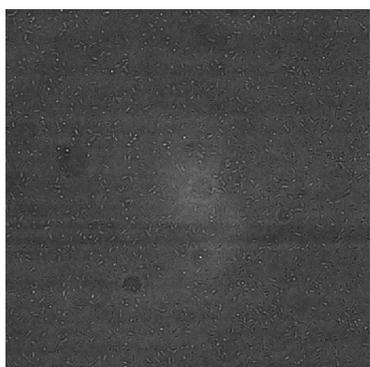
Lemongrass (10 μ l)



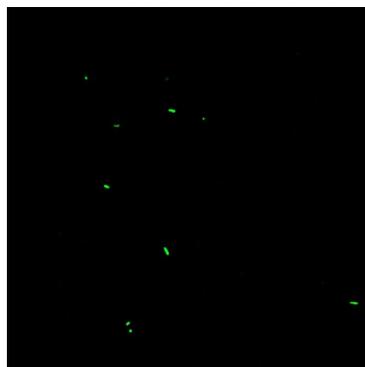
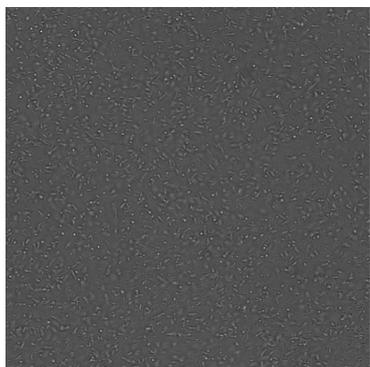
trans-Cinnamaldehyde (2.5 μ l)



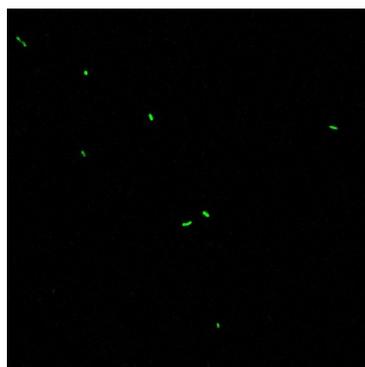
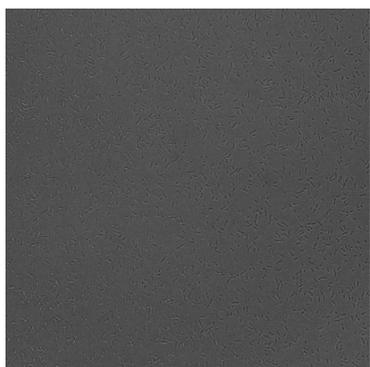
Neral (2.5 μ l)



Geranial (2.5 μ l)



Salicylaldehyde (0.62 μ l)



Hydrocinnamaldhyde (2.5 μ l)

Figure 8. Confocal laser scanning micrographs of ROS generation in *Agrobacterium tumefaciens*.

5-2. Microplate reader을 이용한 활성산소종 발현량 측정

A. *tumefaciens*에 대하여 활성산소종 발현 정도가 우수한 cinnamon bark, lemongrass, *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 대상으로 microplate reader를 이용하여 활성산소종 발현량을 대조구와 비교하였다. 그 결과 대조구와 cinnamon bark, lemongrass, *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde가 활성산소종 발현량에 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다(Figure 9)

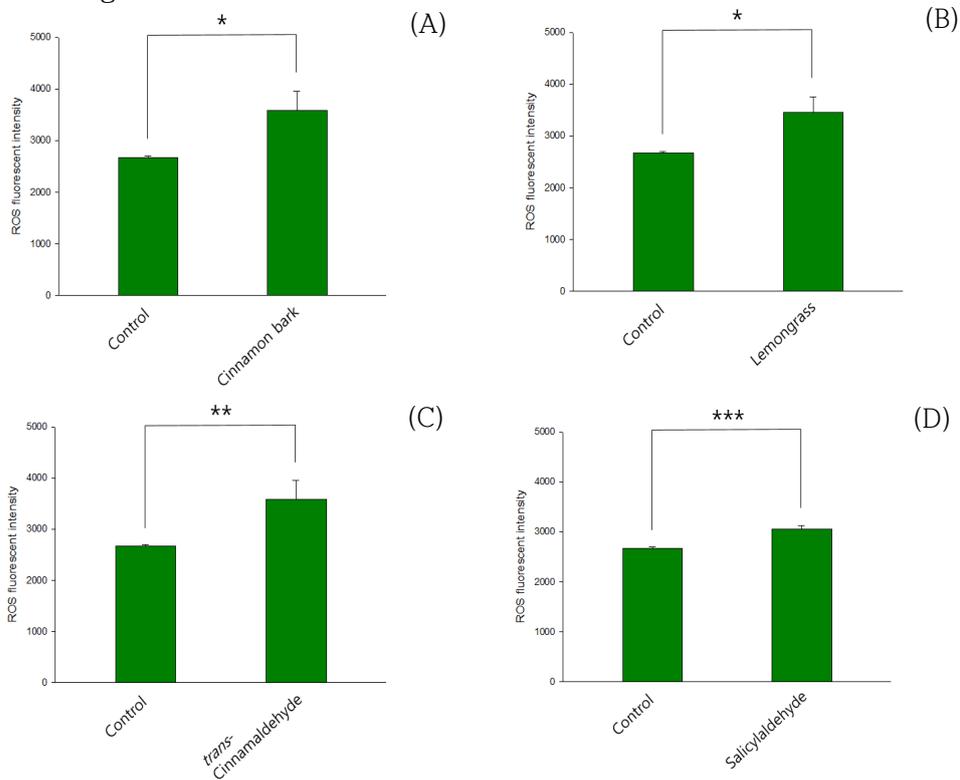
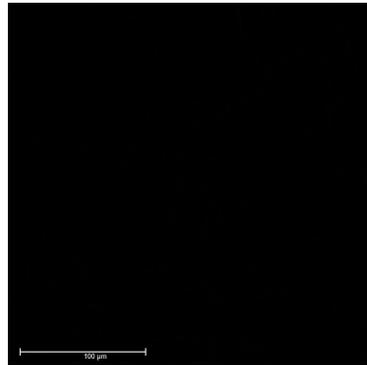
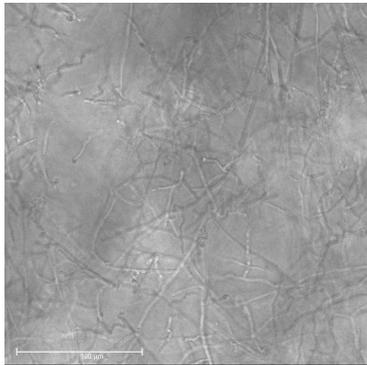


Figure 9. Measurement of ROS fluorescent intensity using microplate reader in *Agrobacterium tumefaciens*. *:Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.05$, Mean \pm SE). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. t -value = -4.93, $p < 0.05$ (A); t -value = -5.20, $p < 0.05$ (B); t -value = -4.29, $p < 0.01$ (C); t -value = -12.11, $p < 0.001$ (D).

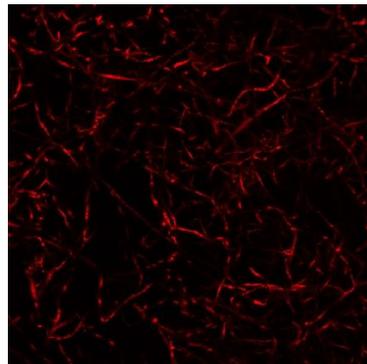
6. 세포막 파괴 검정 결과

6-1. Confocal을 이용한 세포막 파괴 관찰

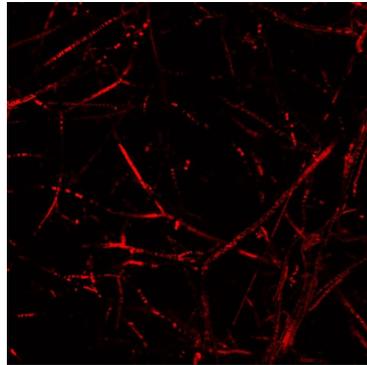
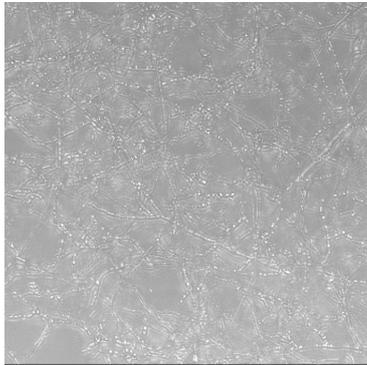
R. quercus-mongolicae, *R. solani* 그리고 *A. tumefaciens*에 대한 대조구 및 cinnamon bark, lemongrass, *trans*-cinnamaldehyde, neral, geranial, salicylaldehyde 및 hydrocinnamaldehyde의 세포막 파괴 정도는 confocal을 통해 관찰하였으며 다음과 같이 나타났다(Figure 10~12).



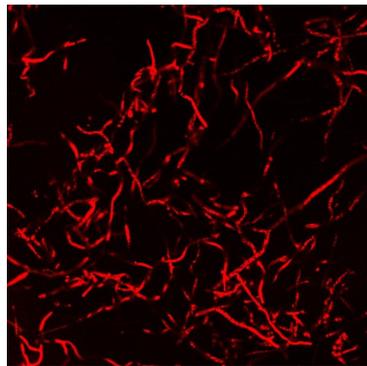
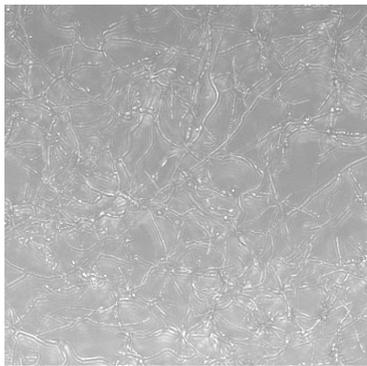
Control



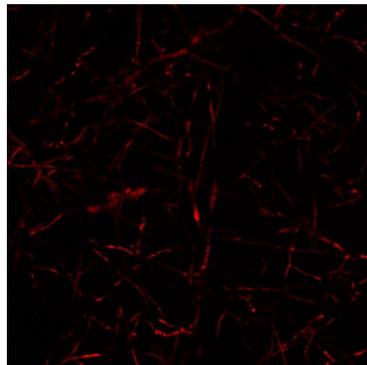
Cinnamon bark (10 μ l)



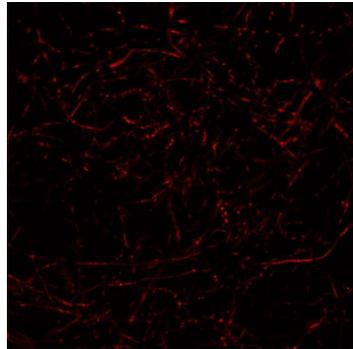
Lemongrass (20 μ l)



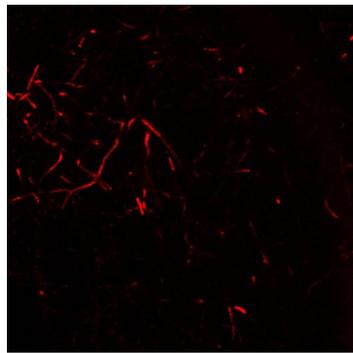
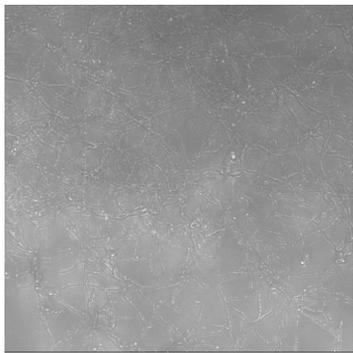
trans-Cinnamaldehyde (10 μ l)



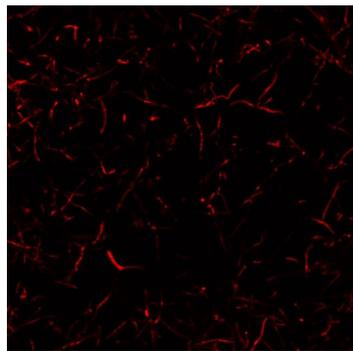
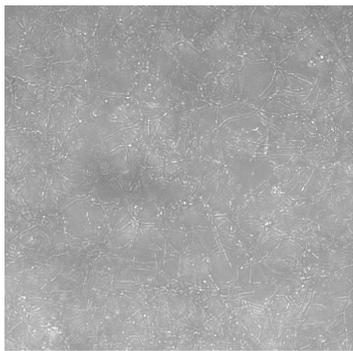
Neral (10 μ l)



Geraniol (10 μ l)

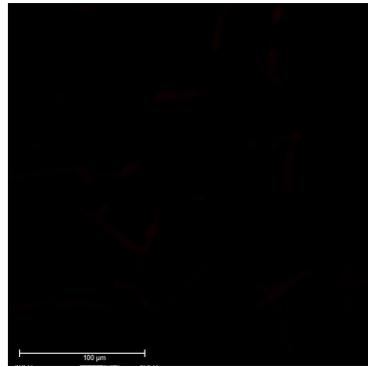
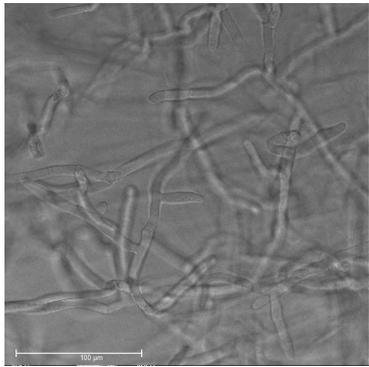


Salicylaldehyde (10 μ l)

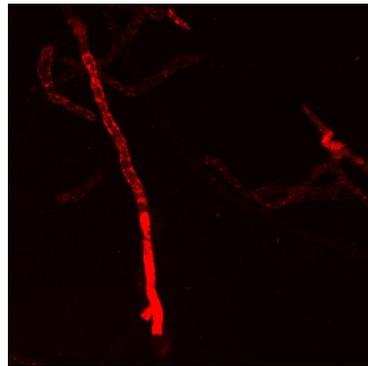
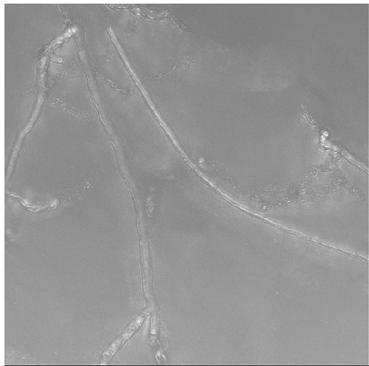


Hydrocinnamaldhyde (10 μ l)

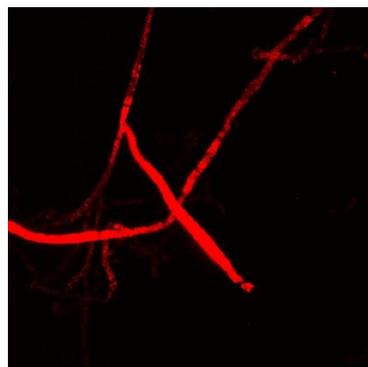
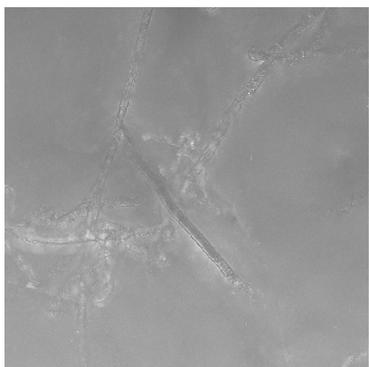
Figure 10. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in *Raffaelea quercus-mongolicae*.



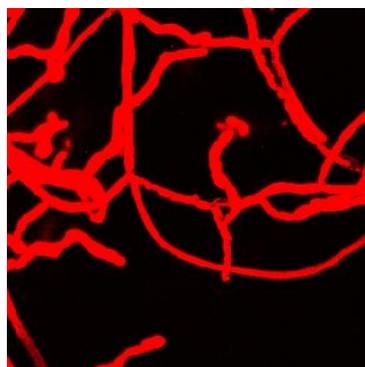
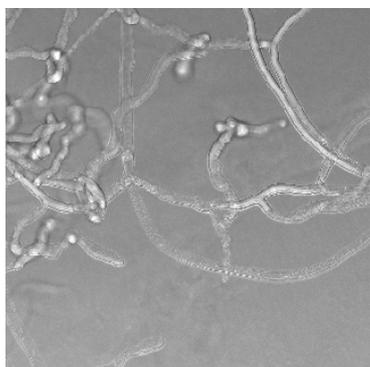
Control



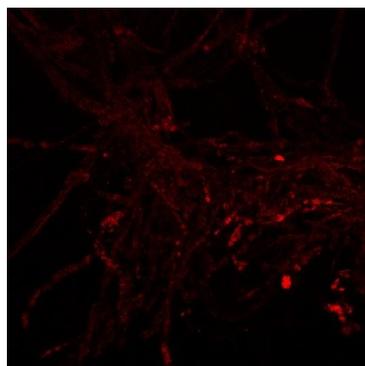
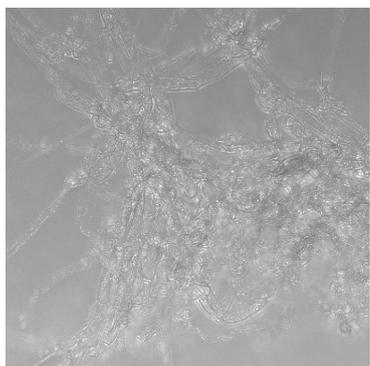
Cinnamon bark (20 μl)



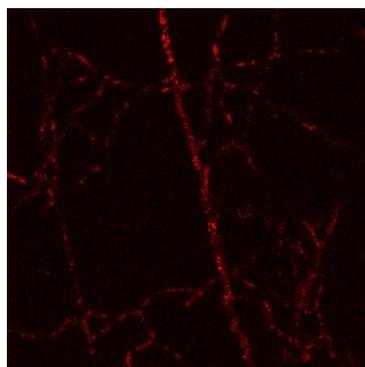
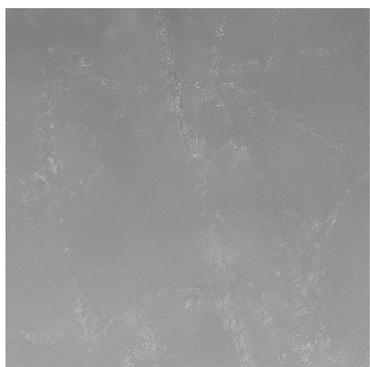
Lemongrass (20 μl)



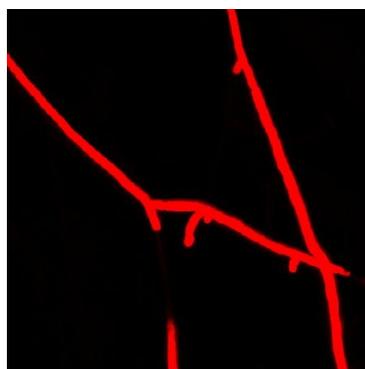
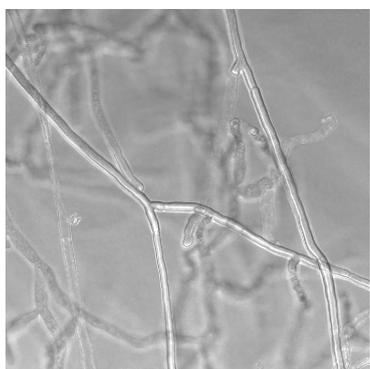
trans-Cinnamaldehyde (10 μ l)



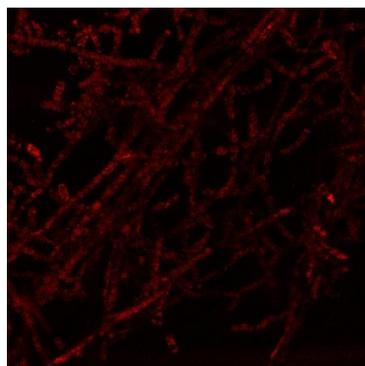
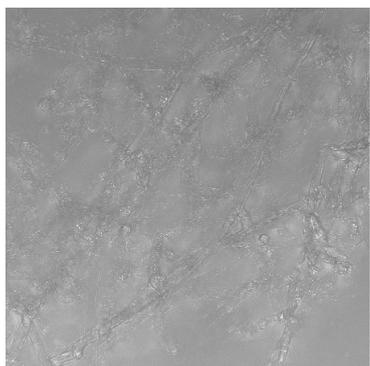
Neral (10 μ l)



Geranial (10 μ l)

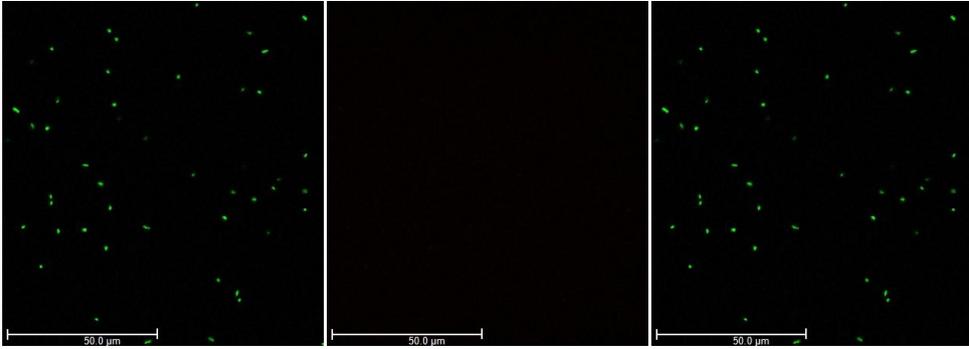


Salicylaldehyde (10 μ l)

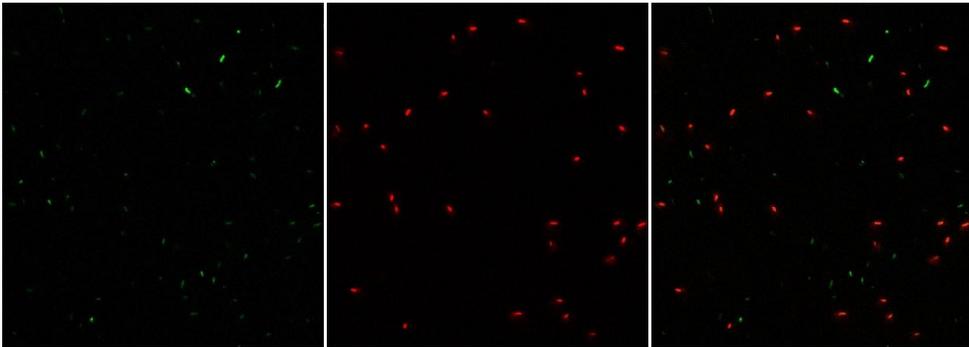


Hydrocinnamaldhyde (10 μ l)

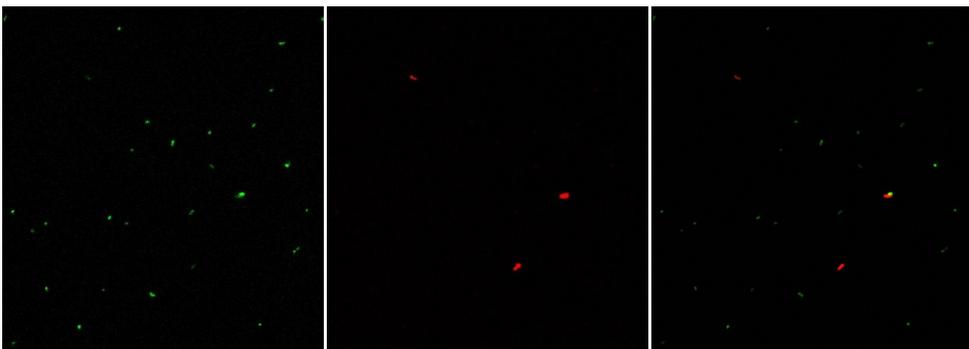
Figure 11. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in *Rhizoctonia solani*.



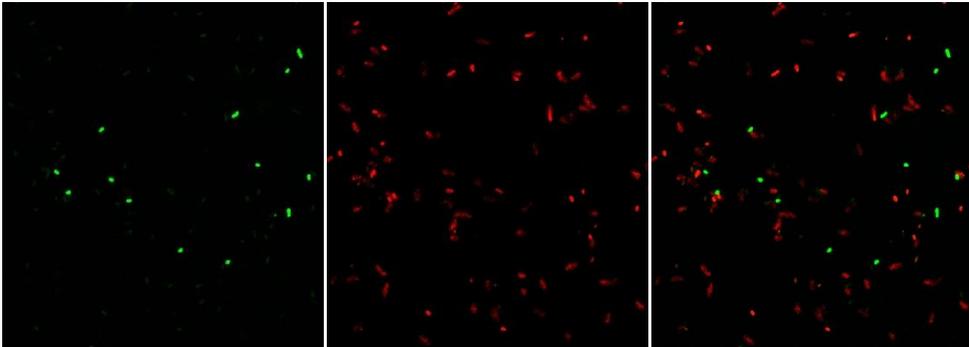
Control



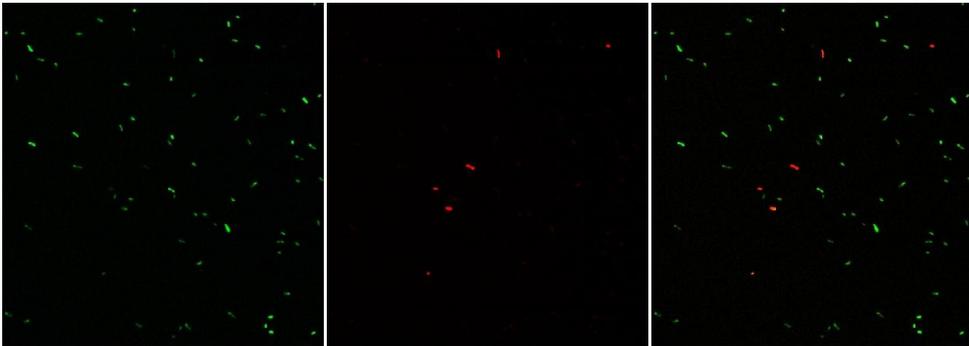
Cinnamon bark (10 μ l)



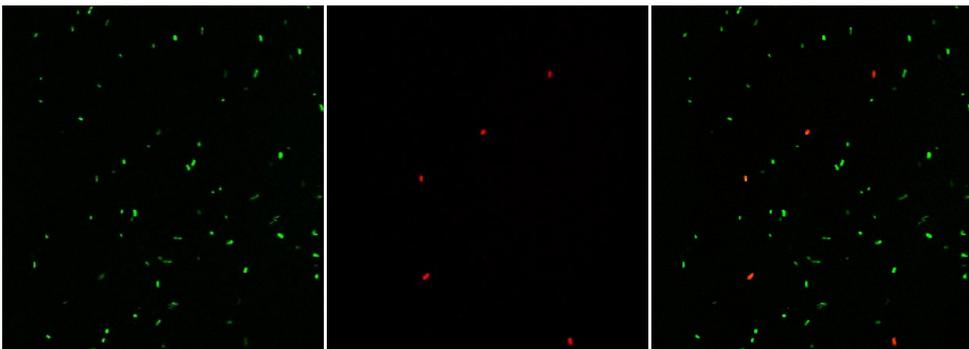
Lemongrass (10 μ l)



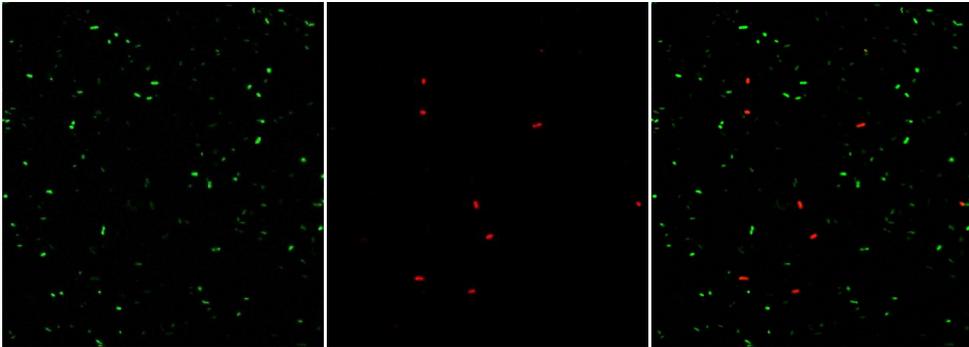
trans-Cinnamaldehyde (2.5 μ l)



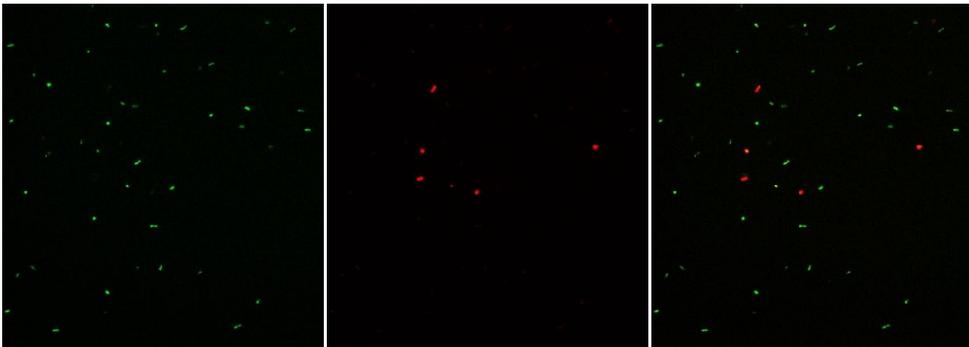
Neral (2.5 μ l)



Geranial (2.5 μ l)



Salicylaldehyde (0.62 μl)



Hydrocinnamaldhyde (2.5 μl)

Figure 12. Confocal laser scanning micrographs of Cell membrane damage in *Agrobacterium tumefaciens*.

6-2. Microplate Reader을 이용한 세포막 파괴량 측정

A. *tumefaciens*에 대하여 세포막 파괴 정도가 우수한 cinnamon bark, lemongrass *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 대상으로 microplate reader를 이용하여 세포막 파괴량을 대조구와 비교하였다. 그 결과 대조구와 cinnamon bark, lemongrass *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde가 세포막 파괴량에 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다(Figure 13).

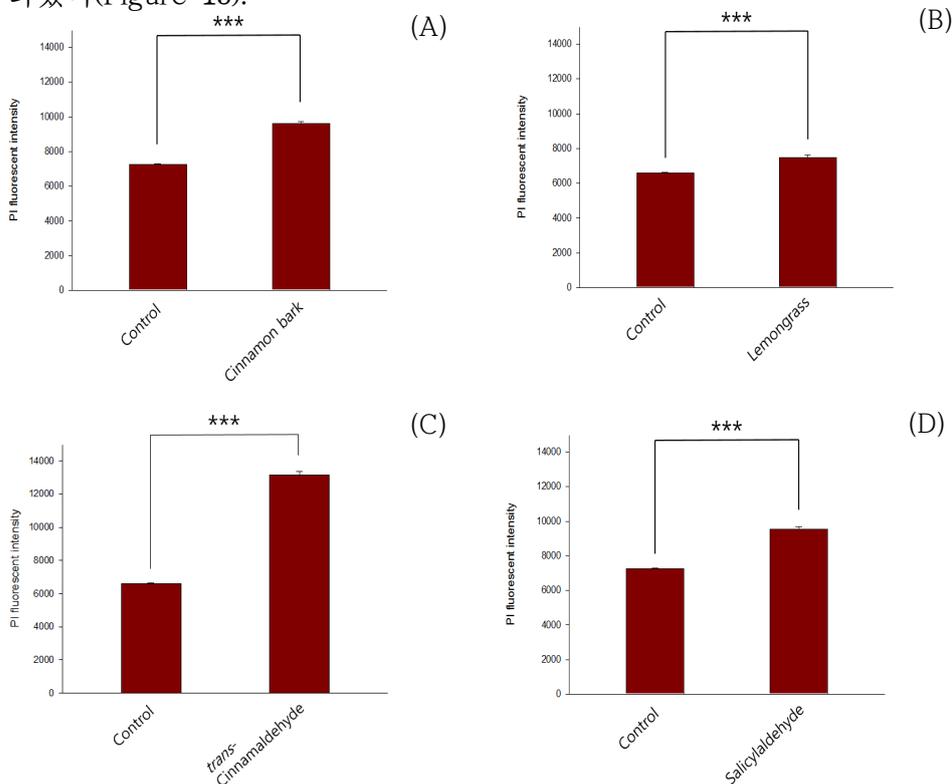


Figure 13. Measurement of Cell membrane damage using microplate reader in *Agrobacterium tumefaciens*. **:Values are significantly different from the control by independent *t*-test ($p < 0.01$, Mean \pm SE). ***: $p < 0.001$. *t*-value=-43.84, $p < 0.001$ (A); *t*-value=-12.64, $p < 0.001$ (B); *t*-value=-63.23, $p < 0.001$ (C); *t*-value=-25.87, $p < 0.001$ (D).

제 5 장 고 찰

1. 식물체 정유의 항균 활성

본 연구에서는 참나무시들음병, 모잘록병 및 근두암종에 대하여 cinnamonbark, cumin, lemongrass, wintergreen 정유의 혼증 및 접촉 항균 활성을 검정하였다.

*R. quercus-mongolicae*에 대하여 우수한 혼증 및 접촉 항균 활성을 나타내는 정유는 cinnamonbark, lemongrass이며 접촉 활성에서 cinnamonbark, lemongrass 비하여 항균 활성이 낮지만 cumin 또한 접촉 활성을 나타냈다.

*R. quercus-mongolicae*에 대한 항균 활성 검정은 자료가 미흡한 편이며(Kim et al., 2009; Lee et al., 2012, 김정은, 2017) cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen 정유를 이용한 항균 활성 연구는 본 연구에서 처음으로 수행하였다.

*R. solani*에 대하여 우수한 혼증 항균 활성을 나타내는 정유는 cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen이고 우수한 접촉 항균 활성을 나타내는 정유는 cinnamon bark, lemongrass이며 앞의 두 정유에 비하여 항균 활성이 낮지만 cumin 또한 접촉 활성을 나타냈다. Cinnamon bark, cumin 그리고 lemongrass 정유의 *R. solani*에 대한 항균활성은 이미 보고되었고(Lee et al., 2007; Xie et al., 2017) wintergreen 정유를 이용한 항균 활성 연구는 본 연구에서 처음으로 수행하였다.

*A. tumefaciens*에 대하여 우수한 혼증 항균 활성을 나타내는 정유는 cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen이고 우수한 접촉 항균

활성을 나타내는 정유는 cinnamon bark, lemongrass이며 앞의 두 정유에 비하여 항균 활성이 낮지만 cumin 또한 접촉 활성을 나타냈다. Cinnamon bark, cumin 그리고 lemongrass 정유의 *A. tumefaciens*에 대한 항균활성은 이미 보고되었고(Iacobellis et al., 2005; El-Zemity et al., 2008; Adonizio et al., 2006) wintergreen 정유를 이용한 항균 활성 연구는 본 연구에서 처음으로 수행하였다.

2. 식물체 정유 유래 성분 동정

향균 활성이 우수한 cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen의 성분을 GC 및 GC-MS를 이용하여 분석하였다.

그 결과 cinnamon bark는 trans-cinnamaldehyde (52.26%), eugenol (21.87%), cinnamyl acetate (5.05%), linalool (4.99%), β -carophyllene (4.93%)를 포함한 10가지 성분이 동정되었고 Paranagama(2010) 등은 cinnamaldehyde, (Z)-cinnamyl acetate, eugenol, β -carophyllene 그리고 1,8-cineole등을 성분으로 보고하였다.

Cumin은 *p*-cymene (34.47%), cuminaldehyde (22.07%), γ -terpinene (13.83%), β -pinene (11.69%), trans-anethole (5.35%)를 포함한 10가지 성분이 동정되었고 Bettaieb (2011)등은 *p*-cymene, cuminaldehyde, γ -terpinene, β -pinene등을 성분으로 보고하였다.

Lemongrass는 geranial은 (45.04%), neral (32.27%), limonene (7.56%)을 포함한 6가지 성분이 동정되었고 Taweechaisupapong (2012)등은 geranial, neral, myrcene, geranoil등을 주성분으로 보고하였다.

Wintergreen은 methyl salicylate (99.85%) 1가지 성분이 동정되었고 Kujur (2017)등은 methyl salicylate 등을 성분으로 보고하였다.

기존 논문에서 보고된 정유 성분과 본 연구에서 동정한 성분이 다른 이유는 동일한 식물체 및 부위를 사용한다 할지라도 식물체가 생육한 환경이나 수확시기가 다르면 성분이 달라질 수 있기 때문이다(Perry et al., 1999).

3. 식물체 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde유도체의 항균활성

수목 병원균 3종에 대하여 식물체 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde유도체의 혼증 및 접촉 항균 활성을 검정하였다.

*R. quercus-mongolicae*에 대하여 우수한 혼증 항균 활성을 나타내는 화합물은 linalool, neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, geranyl acetate, hydrocinnamaldehyde, methyl cinnamate 그리고 salicylaldehyde이고 우수한 접촉 항균 활성을 나타내는 화합물은 neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamyl alcohol 그리고 hydrocinnamaldehyde이며 앞의 7개의 정유 보다는 항균활성이 낮지만 *trans*-anethole 또한 접촉 항균 활성이 나타났다. *R. quercus-mongolicae*에 대한 linalool, neral, geraniol, geranial 그리고 eugenol의 활성은 기존 논문에 이미 보고되었으나(김정은, 2017) cuminaldehyde, *trans*-cinnamaldehyde, geranyl acetate, hydrocinnamaldehyde, methyl cinnamate 그리고 salicylaldehyde에 대한 항균 활성은 본 연구에서 처음으로 보고되었다.

*R. solani*에 대하여 우수한 혼증 항균 활성을 나타내는 화합물은 α -pinene, methyl salicylate, neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, geranyl acetate, cinnamyl alcohol, hydrocinnamaldehyde, methyl cinnamate 그리고 salicylaldehyde이고 우수한 접촉 항균 활성을 나타내는 화합물은 neral, cuminaldehyde, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamyl alcohol 그리고 hydrocinnamaldehyde이며 앞의 6개의 정유 보다는 항균활성이 낮지만 geraniol, *trans*-anethole 또한 접촉 항균 활성이 나타났다. *R. solani*에

대한 α -pinene, neral, geraniol, geranial 그리고 eugenol의 활성은 기존 논문에 이미 보고되었고(김정은, 2017) *trans*-cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, hydrocinnamaldehyde 그리고 methyl cinnamate에 대한 활성도 보고되었다(Cheng *et al.*, 2011). 또한 cuminaldehyde 및 *trans*-anethole 역시 이미 보고되었다(Marei *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2005). 그러나 methyl salicylate, geranyl acetate 및 salicylaldehyde에 대한 항균 활성은 본 연구에서 처음으로 보고되었다.

*A. tumefaciens*에 대하여 우수한 훈증 항균 활성을 나타내는 화합물은 α -pinene, neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, hydrocinnamaldehyde 그리고 salicylaldehyde이고 우수한 접촉 항균 활성을 나타내는 화합물은 neral, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol 그리고 cinnamyl alcohol 이며 앞의 6개의 정유 보다는 항균활성이 낮지만 cuminaldehyde 또한 접촉 항균 활성이 나타났다. *A. tumefaciens*에 대한 α -pinene, neral, geraniol, geranial 그리고 eugenol의 활성은 기존 논문에 이미 보고되었고(김정은, 2017) cuminaldehyde에 대한 활성도 보고되었다(Rasoul *et al.*, 2012). 그러나 *trans*-cinnamaldehyde, hydrocinnamaldehyde, salicylaldehyde 그리고 cinnamyl alcohol에 대한 항균 활성은 본 연구에서 처음으로 보고되었다.

한편, geraniol은 훈증 항균 활성에 경우 *R. quercus-mongolicae*와 *R. solani*에서만 우수한 항균 활성이 나타나고 *A. tumefaciens*에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 그러나 접촉 항균 활성에 경우 *A. tumefaciens*와 *R. quercus-mongolicae*에 대하여 우수한 활성을 나타냈고 앞의 2종에 비하여 약하지만 *R. solani*에 대해서도 접촉 활성이 나타났다. 따라서 *A. tumefaciens*에 대하여 geraniol을 처리할 때는 접촉 처리가 더 우수하였다.

Eugenol은 훈증 항균 활성에 경우 *R. quercus-mongolicae*와 *R. solani*에서만 우수한 항균 활성이 나타나고 *A. tumefaciens*에서는 항균 활성이 나타나지 않았다.

그러나 접촉 항균 활성에 경우에는 수목 병원균 3종 모두에서 우수한 접촉 활성을 나타냈다. 따라서 *A. tumefaciens*에 대하여 eugenol을 처리할 때는 접촉 처리가 더 우수하였다.

Cinnamyl alcohol은 *R. solani*에 대하여 우수한 훈증 항균 활성을 나타냈지만 *R. quercus-mongolicae*에는 약한 항균 활성을, *A. tumefaciens*에는 항균 활성이 나타나지 않았다. 그러나 접촉 항균 활성에 경우에는 수목 병원균 3종 모두에서 우수한 접촉 활성을 나타냈다. 따라서 *R. quercus-mongolicae*과 *A. tumefaciens*에 대하여 cinnamyl alcohol을 처리할 때는 접촉 처리가 더 우수하였다.

Hydrocinnamaldehyde는 수목 병원균 3종 모두에서 우수한 훈증 항균 활성을 나타냈으나 접촉 항균 활성에 경우 *R. quercus-mongolicae*와 *R. solani*에서만 우수한 접촉 활성이 나타나고 *A. tumefaciens*에서는 접촉 활성이 나타나지 않았다. 따라서 *A. tumefaciens*에 대하여 hydrocinnamaldehyde을 처리할 때는 훈증 처리가 더 우수하였다.

Salicylaldehyde는 수목 병원균 3종 모두에서 우수한 훈증 항균 활성을 나타냈으나 접촉 항균 활성에 경우 수목 병원균 3종 모두에서 접촉 효과가 나타나지 않았다. 따라서 수목 병원균 3종에 대하여 salicylaldehyde을 처리할 때는 훈증 처리가 더 우수하였다.

Geraniol, eugenol은 특정 균에 대하여 접촉 활성이 더 우수하였는데 이는 기존 연구에서도 같은 결과가 보고되었다(Inouye *et al.*, 2003; Lehtijärvi, 2006; 김정은, 2017).

결과적으로 실험실 조건 하에 일부 화합물들은 특정 균주 및 처리

방식에 따라 항균 활성이 달라졌다. 그러나 실제 산림 묘포지에 적용 시 각각의 화합물 처리 방식에 따른 활성 차이가 본 연구 결과와 동일하게 나타나는지는 추후 연구가 필요하며 활성 차이에 대한 작용기작 역시 후속 연구가 필요하다.

4. 인공혼합물에 따른 화합물의 상호작용

수목 병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 활성이 우수한 cinnamon bark와 lemongrass 정유의 성분들 중 어떤 성분이 항균 활성에 관여하는지 그리고 정유 성분들 간 상승작용, 길항작용 및 상가 작용이 있는지 검정하였다.

Cinnamon bark 정유 내의 화합물 중 *R. quercus-mongolicae*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde 및 eugenol이며 *R. quercus-mongolicae*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde, *p*-cymene, linalool 그리고 eugenol이다.

Cinnamon bark 정유 내의 화합물 중 *R. solani*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde, eugenol 그리고 cinnamyl acetate이며 *R. solani*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde, α -phellandrene, *p*-cymene 그리고 eugenol이다.

Cinnamon bark 정유 내의 화합물 중 *A. tumefaciens*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde, α -pinene, α -phellandrene 그리고 linalool이며 *A. tumefaciens*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde 및 eugenol이다.

결과적으로 cinnamon bark 정유의 혼증 및 접촉 활성에 공통적으로 기여도가 높은 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde이며 두 번째로 eugenol이 항균 활성에 영향을 미쳤다. 이외의 화합물들이 정유의 활성에 미치는 영향은 균주나 처리 방식에 따라 달라졌다. 실제로 cinnamon bark 정유 내에 함유된 cinnamaldehyde와 eugenol은 세균의 필수 효소 생산을 억제하고 세균 세포벽에 손상을 일으키는 것으로 보고되었다(Di pasqua *et al.*, 2007; Helander *et al.*, 1998). 또한 *trans*-cinnamaldehyde는 cinnamon bark 정유 내의 화합물 중 가장 강한 항균 활성을 나타내며

cinnamon bark 정유의 강한 항균 활성은 다량의 cinnamaldehyde가 존재하기 때문이라고 보고하였다(Unlu *et al.*, 2010).

한편 cinnamon bark 정유의 인공혼합물에 따른 항균 활성을 살펴본 결과, cinnamon bark 정유 내 화합물들 간의 상호작용은 없는 것으로 나타났다.

Lemongrass 정유 내의 화합물 중 *R. quercus-mongolicae*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial, (+)-limonene 그리고 geraniol이며 *R. quercus-mongolicae*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial, (+)-limonene, geranyl acetate 그리고 β -caryophyllene이다.

Lemongrass 정유 내의 화합물 중 *R. solani*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial 외에도 (+)-limonene가 영향을 미치며 *R. solani*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial 외에는 영향을 미치는 화합물이 없었다.

Lemongrass 정유 내의 화합물 중 *A. tumefaciens*에 대한 혼증 항균 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial, (+)-limonene 그리고 geranyl acetate 이며 *A. tumefaciens*에 대한 접촉 활성에 기여하는 화합물은 neral, geranial이다.

결과적으로 Lemongrass 정유에서 혼증 및 접촉 활성에 공통적으로 기여도가 높은 화합물은 neral, geranial이며 두 화합물 외의 화합물들이 정유의 활성에 미치는 영향은 균이나 처리 방식에 따라 달라졌다. 실제로 lemongrass 정유 내에 함유된 neral 및 geranial은 진균 세포 내에 전자 공여체를 가진 전하이동복합체(Charge transfer complex)를 형성하여 균의 사멸을 일으키는 것으로 보고되었다(Kurita *et al.*, 1981).

또한 neral 및 geranial은 lemongrass 정유와 비슷한 항균 활성을 나타내며 lemongrass 정유의 항균 활성은 neral 및 geranial의 존재에 기인한다고 보고하였다(Onawunmi *et al.*, 1984; Onawunmi, 1989; Wannissorn *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2008).

한편 lemongrass 정유의 인공혼합물에 따른 항균 활성을 살펴본 결과, *R. quercus-mongolicae*에 대한 접촉 활성에서 lemongrass정유 내 화합물들 간의 길항작용이 나타났다. 길항작용에는 (+)-limonene, geranyl acetate 그리고 β -caryophyllene이 영향을 미쳤으며 각각의 화합물들이 제거된 인공혼합물에서 1.125배 정도 항균활성이 더 좋게 나타났다.

5. 식물체 정유의 항균 활성 작용기작

5-1. 정유 유래 성분 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 구조와 항균활성

수목 병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 활성이 우수한 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde이다. *trans*-Cinnamaldehyde는 알데하이드기(-CHO)를 작용기로 가진 벤젠고리구조로 C7-C8 위치에 이중결합이 있어 비편재화가 가능하다. *trans*-Cinnamaldehyde와 유사한 화학구조를 가지며 C7-C8 위치에 단일결합을 가진 hydrocinnamaldehyde는 마찬가지로 수목 병원균 3종에 대하여 혼증 활성이 우수하고 *R. quercus-mongolicae*, *R. solani*에 대하여 접촉 활성이 우수하나 *A. tumefaciens*에 대해서는 접촉 활성이 나타나지 않았다. *trans*-Cinnamaldehyde보다 낮은 항균 활성은 기존 논문과 일치하며 벤젠고리 밖 탄화수소사슬의 이중결합 존재가 항균활성에 중요하다고 보고하였다(Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). *trans*-Cinnamaldehyde와 구조가 유사하며 작용기로 수산기(-OH)를 가진 cinnamyl alcohol은 수목 병원균 3종에 대하여 접촉 활성이 우수하고 *R. quercus-mongolicae*, *R. solani*에 대하여 혼증 활성이 우수하나 *A. tumefaciens*에 대해서는 혼증 활성이 나타나지 않았다. *trans*-Cinnamaldehyde보다 낮은 항균 활성은 기존 논문과 일치하며 작용기가 수산기일 때 보다는 알데하이드기일 때 더 좋은 항균 활성을 띤다고 보고하였다(Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). 이 외에도 *trans*-cinnamaldehyde와 구조가 유사하며 작용기로 에스터기(-COOCH₃)를 가진 methyl cinnamate는 *R. quercus-mongolicae*, *R. solani*에 대하여 혼증 활성이 우수하나 *A. tumefaciens*에 대해서는 혼증 활성이 나타나지 않았고 수목 병원균 3종에 대하여 접촉 활성이 나타

나지 않았다. *trans*-Cinnamaldehyde보다 낮은 향균 활성은 기존 논문과 일치하며 알데하이드기일 때 더 좋은 향균 활성을 띤다고 보고하였다 (Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). 또한 cinnamyl alcohol과 methyl cinnamate의 향균 활성을 비교하였을 경우 cinnamyl alcohol이 더 좋은 향균 활성을 나타냈으며 이는 모든 조건이 동일 할 경우 수산기가 에스터기보다 더 향균 활성에 영향을 미친다고 생각된다.

Cuminaldehyde, salicylaldehyde 그리고 4-hydroxybenzaldehyde는 공통적으로 benzaldehyde를 기본 구조로 가지고 있으며 이들의 향균 활성은 cuminaldehyde > salicylaldehyde > benzaldehyde > 4-hydroxybenzaldehyde 순으로 나타났다. Benzaldehyde는 알데하이드를 작용기로 가진 벤젠고리 화합물이며 향균활성은 *R. solani*에 대한 혼증 향균 활성만이 나타났다. 이러한 낮은 향균 활성은 기존 논문과 일치하며 기존 논문에 의하면 benzaldehyde는 *trans*-cinnamaldehyde와 같이 알데하이드기를 작용기로 가지지만 알데하이드기 외에도 긴 탄화수소 사슬과 이중결합의 유무가 향균 활성에 영향을 미치기 때문에 낮은 향균 활성을 나타낸다고 보고하였다(Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011).

Salicylaldehyde와 4-hydroxybenzaldehyde는 benzaldehyde를 기본 구조로 수산기를 각각 ortho-, para- 위치에 가진 화합물이다. Salicylaldehyde는 수목 병원균 3종에 대하여 혼증 향균 활성이 우수하지만 접촉 활성이 나타나지 않으며 4-hydroxybenzaldehyde는 수목 병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 활성이 나타나지 않았다. Salicylaldehyde와 비교하여 4-hydroxybenzaldehyde의 낮은 향균 활성은 기존의 논문과 일치하며 수산기의 위치가 para- 위치보다 ortho- 위치에 있을 때 더 좋은 향균

활성을 나타낸다고 보고하였다(Judge *et al.*, 2012). Benzaldehyde와 salicylaldehyde의 항균 활성을 비교하였을 경우 salicylaldehyde가 더 좋은 항균 활성을 나타냈는데 이는 수산기가 미생물 막에 대한 용해를 증가시켜 항균 활성 증가된다는 기존 논문과 일치하였다(Sikkema *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). 그러나 Benzaldehyde와 4-hydroxybenzaldehyde의 항균 활성을 비교하였을 경우 benzaldehyde가 더 좋은 항균 활성을 나타내었다. 따라서 단순히 수산기 자체만으로 항균활성이 나타나지는 않으며 작용기 간 상호작용에 따라 항균 활성이 달라질 수 있다고 생각된다. Cuminaldehyde는 나머지 세 화합물에 비하여 가장 좋은 항균 활성을 띄며 benzaldehyde를 기본 구조로 para-위치에 프로필기(propyl)를 가진 화합물이다. Cuminaldehyde와 benzaldehyde의 항균 활성을 비교하였을 경우 cuminaldehyde가 더 좋은 항균 활성을 나타냈으며 이는 긴 탄화수소 사슬이 항균 활성에 영향을 미친다는 기존 논문과 일치하였다(Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). Cuminaldehyde와 salicylaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde의 항균 활성을 비교하였을 경우 대체로 cuminaldehyde가 더 좋은 항균 활성을 나타냈는데 이는 앞서 언급한 바와 같이 작용기 간 상호작용에 의해 달라졌다고 생각된다.

trans-2-hydroxycinnamic acid, *trans*-3-hydroxycinnamic acid 그리고 *trans*-4-hydroxycinnamic acid는 카르복실기(-COOH)를 작용기로 가진 벤젠고리구조로 C7-C8 위치에 이중결합이 있어 비편재화가 가능하며 수산기가 각각 ortho-, para-, meta-에 위치한다. 이들 화합물은 수목 병원균 3종에 대하여 혼증 및 접촉 활성이 나타나지 않았으며 기존 논문에서도 낮은 항균 활성을 나타냈다(Chang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2011). 기존 논문에 따르면 벤젠고리 밖 긴

탄화수소사슬, 이중결합 존재 및 수산기의 존재는 향균활성에 중요하다고 보고하였으나 위의 화합물들은 3가지 요건을 갖추었음에도 불구하고 향균활성이 나타나지 않았다. 따라서 단순히 긴 탄화수소사슬, 이중결합 존재 및 수산기의 존재만이 높은 향균 활성을 나타내지는 않으며 작용기 간 상호작용에 따라 향균 활성이 달라질 수 있다고 생각된다.

Citral (neral, geranial)과 geraniol은 모노테르펜류이며 각각 알데하이드기, 수산기를 말단부에 가지고 있다. Citral과 geraniol의 향균 활성을 비교하였을 경우 전반적으로 citral이 더 향균 활성이 우수하였으며 이는 기존 논문과 일치하였다. 기존 논문에 따르면 말단부의 알데하이드기와 C2-C3 위치의 이중결합은 서로 비편재화가 가능하고 이러한 전기음성적 배열이 균의 생물학적 과정의 전자 이동을 방해할 것이라 가정하였다(Liu&Yang, 2012). Geranial과 neral은 이성질체로 수목 병원균 3종에 대하여 접촉 활성은 동일하였으나 훈증활성은 geranial이 더 우수하였다. 이는 기존 논문과 일치하며 geranial이 더 향균 활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다(Jeung&Choi, 2007).

5-2. *trans*-Cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde의 차등발현유전자

수목 병원균 3종에 대하여 혼증 활성이 가장 우수한 화합물은 *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde이다. 대조구와 두 화합물을 혼증 처리한 *A. tumefaciens*의 유전자 발현 양상에 어떠한 차이가 나타나는지 비교하여 작용기작을 규명하였다.

대조구에 비하여 두 실험군 모두 발현량이 저하되는 유전자 집단을 살펴본 결과, 활성산소종 중 가장 해로운 물질인 hydroxyl radical (OH.)의 발생을 유도하는 유전자 집단의 발현을 발견하였다. hydroxyl radical의 경우 세포 내부의 Fe^{2+} 과 H_2O_2 가 만나 펜톤반응을 통해 형성이 되며 세균의 발육을 억제하는 제균제의 경우 hydroxyl radical이 발생하지 않지만 항생제의 경우 hydroxyl radical이 발생한다.

기존 논문에 따르면 3종의 항생제류(quinolones, b-lactams 및 aminoglycosides)를 처리한 *Escherichia coli*의 경우 공통적으로 NADH-coupled electron transport (NADH dehydrogenase I)와 관련한 유전자의 발현이 증가하였으며 이를 통해 펜톤반응이 유도되어 세포 사멸이 일어났다고 보고하였다(Kohanski et al., 2007). 펜톤반응은 외부 철 이온의 유입에 상관없이 내부 철 이온으로만 일어나며 NADH dehydrogenase I이 과 발현되면 NADH의 일시적인 고갈로 인하여 Fe-S cluster가 불안정해지게 된다. 불안정해진 Fe-S cluster는 Fe^{2+} 을 내놓고 증가된 Fe^{2+} 으로 인해 펜톤반응이 유발되어 hydroxyl radical이 형성된다(Kohanski et al., 2007). 본 연구에서는 NADH-coupled electron transport (NADH dehydrogenase I)와 관련한 발현 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 펜톤반응을 유발하는 Fe^{2+} 의 증가와 관련한 유전자집단의 발현이 관찰되었고 이외도 펜톤반응을 통해 유발된 hydroxyl radical의

유해성을 완화하는 Zn^{2+} 과 관련한 유전자집단의 발현이 억제되는 것을 발견하였다.

Fe^{2+} 의 증가는 양성자 수송 관련 유전자집단 및 철이온의 항상성과 관련한 유전자집단의 발현이 저하됨을 통해 설명할 수 있다. 일반적으로 철이온은 낮은 pH에서 용해성이 높다. 이를 가정하여 기존 논문에서는 다양한 범위의 pH를 쥐 뇌의 세포균질액(homogenate)에 처리하여 철이온 매개 과산화 인지질량 변화를 살펴보았다. 그 결과 pH의 감소는 Fe^{2+} 을 증가시키고 이를 통해 과산화 인지질이 증가됨을 보고하였다(Hassan et al., 2009). 본 연구에서는 양성자의 수송과 관련한 유전자집단의 발현이 저하되는 것을 발견하였다. 이와 관련한 유전자 집단은 ATP synthesis coupled proton transport, proton-transporting ATP synthase activity 및 plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport이며 세포 내 양성자를 세포 밖으로 수송할 때 필요한 ATP합성에 영향을 준다. 그러나 이들 유전자 집단 발현이 저하되면 세포 밖으로 양성자의 수송이 저하되고 세포 내의 pH가 감소하게 된다(Figure 14). 이러한 pH저하는 Fe^{2+} 의 증가를 유도하고 철이온의 증가가 펜톤반응을 유발했을 것이라 생각된다. 이외에도 철이온의 증가를 뒷받침하는 항상성 관련 유전자집단의 발현이 저하되는 것을 발견하였다. 이와 관련한 유전자 집단은 iron ion homeostasis이며 철이온의 항상성에 영향을 준다. pH저하에 의해 증가된 Fe^{2+} 은 정상세포의 경우 항상성에 의해 세포 밖으로 운반되게 된다. 그러나 본 연구에서는 철이온의 항상성과 관련한 유전자집단발현의 저하가 나타났고 증가된 철이온을 세포 밖으로 운송하지 못하였을 것이라 생각된다. 결과적으로 여러 유전자집단의 발현 저하를 통해 Fe^{2+} 의 증가가 일어났으며 증가된 Fe^{2+} 의 자극으로 펜톤반응이 유발되어

hydroxyl radical이 형성됐을 것이라 생각된다.

형성된 hydroxyl radical은 반응성이 매우 크지만 세포 내의 항산화제를 통해 위험성을 완화할 수 있다. 항산화제 중 Zn^{2+} 은 활성산소종 중 hydroxyl radical를 완화하며 세포 손상을 유발하는 여러 과정을 중재한다. 기존논문에는 따르면 인체 병원성 세균인 *Yersinia pseudotuberculosis*에 산화적 스트레스가 가해지면 세포 내에 특정 신호를 형성하여 세포가 외부 Zn^{2+} 를 불러들여 펜톤반응에 의해 형성된 hydroxyl radical를 완화한다고 보고하였다(Wang *et al.*, 2015). 본 연구에서는 Zn^{2+} 의 수송과 관련한 유전자집단 발현의 증가는 관찰되지 않았다. 그러나 세포 내 아연이온이 관여하는 반응과 관련한 유전자집단의 발현이 저하되는 것을 발견하였다. 이와 관련한 유전자 집단은 response to zinc ion이며 아연이온이 관여함으로써 세포 변화 과정(운동, 분비, 효소 생산, 유전자 발현 등)에 영향을 준다. 본 연구에서는 세포 내 아연이온이 관여하는 반응과 관련한 유전자집단 발현이 저하되었고 이로 인해 아연이온이 본래 기능을 상실하고 세포 내에 형성된 hydroxyl radical의 반응성을 완화시키지 못했을 것이라 생각된다(Figure 15).

제 6 장 결 론

참나무시들음병, 모잘록병, 근두암증병에 대하여 cinnamon bark, cumin, lemongrass, wintergreen 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체의 항균 활성을 검정하고 작용기작을 규명해보고자 한 본 연구를 근거로 도출한 결론은 다음과 같다.

1. 혼증 및 접촉 항균 활성에서 3종의 병원균 모두에 우수한 활성을 나타낸 식물체 정유 및 정유 유래 화합물은 총 8개이며 정유는 cinnamon bark, cumin 및 lemongrass이고 정유 유래 화합물로는 *trans*-cinnamaldehyde, neral 및 geranial이며 *trans*-cinnamaldehyde 유도체로는 hydrocinnamaldehyde 및 salicylaldehyde이다.

2. 식물체 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체에 대한 혼증 및 접촉 항균 활성을 비교해본 결과, 일부 정유 및 화합물들은 특정 균주 및 처리 방식에 따라 항균 활성이 달라졌다. 그러나 실제 묘포지에 적용 시 동일한 활성이 나타나는지는 추가적인 연구가 요구된다.

3. Cinnamon bark 및 lemongrass의 인공 혼합물에 따른 상대적 항균 활성을 비교해본 결과, cinnamon bark의 경우 *trans*-cinnamaldehyde 및 eugenol이 항균 활성에 기여도가 가장 높았으며 화합물간 상호작용은 나타나지 않았다. Lemongrass의 경우 neral 및 geranial이 항균 활성에 기여도가 가장 높았으며 특정 균주 및 처리 방식에 따라 화합물간 상호작용이 나타났다.

4. 식물체 정유, 정유 유래 화합물 및 *trans*-cinnamaldehyde 유도체에 대한 훈증 처리 시 활성산소종(Reactive oxygen species) 발생 및 세포막 파괴가 일어나는지 confocal 및 microplate reader를 이용하여 살펴본 결과, 실제 활성산소종이 발생하였으며 세포막 파괴가 일어난 것을 확인하였다.

5. *Agrobacterium tumefaciens*에 대하여 *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde를 훈증 처리하여 차등발현유전자(differentially expressed genes) 및 유전자 집단(Gene ontology groups)을 살펴본 결과, 모든 실험군에서 공통적으로 hydroxyl radical(활성산소종)과 관련된 유전자 및 유전자집단이 발견되었다. 이는 *trans*-cinnamaldehyde 및 salicylaldehyde의 항세균 작용기작이 공통적으로 hydroxyl radical을 일으켜 세포막 손상을 유발하고 결국 세포사멸을 야기한다고 추측된다.

인용문헌

- 김경희, 서상태, 이상현, 이승규, 박일권, 최원일, 조현국. (2010). 참나무 시들음병 발병생태 및 방제연구. 국립산림과학원 연구보고, 10-23, 3.
- 김우식 & 박지성. (2013). 인삼에 발생하는 점무늬병의 친환경적 방제를 위한 유기농업자재 선발 및 기 선발된 자재의 효과시험. 한국약용작물학회지, 21(5), 388-393.
- 김정은. (2017). 꿀풀과 · 도금양과 식물체 정유 및 정유 유래 성분의 수목 병원균 3종에 대한 항균 활성 효과. 서울대학교 대학원
- 남영우, 최원일, 이선근, 이차영, 이수진, 고상현, & 이승규. (2017). 2016년 산림병해충 발생예찰조사 연보. 국립산림과학원 연구보고, 17-01, 59.
- 손수연, 서상태, & 박지현. (2014). 식물병연구: 살균제 나무주사를 이용한 참나무 시들음병 방제 효과. 식물병 연구, 20(4), 295-298.
- 이동운. (2013). 식물정유와 파라핀오일이 검거세미나방에 미치는 영향. Weed&Turfgrass Science, 2(1), 62-69.
- 이상현, 김경희, 서상태, 황명수, 이욱, 신현동, & 신상철. (2009). 조경수 · 특용수 병해도감 국립산림과학원 연구보고, 27-29.
- 이상현, 이승규, 서상태, 김경희, 박지현, & 신현동. (2011). 활엽수 병해도감. 국립산림과학원 연구보고(제 50호), 59-60.
- 홍기정, 권영대, 박상욱, & 류동표. (2006). 참나무시들음병을 매개하는 광릉긴나무좀 (딱정벌레목, 긴나무좀과) 에 대하여. 한국응용곤충학회지, 45(2), 113-117.

- Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C., & Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of ethnopharmacology*, 105(3), 427-435.
- Alvarez-Castellanos, P. P., Bishop, C. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57(1), 99-102.
- Arıçlı, Ş., Özgönen, H., Şanlı, A., Polat, M., & Yasan, G. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against agricultural plant pathogenic fungi and bacteria. Paper presented at the 4ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures. Evolution des cadres réglementaires européen et français. Nouveaux moyens et stratégies Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France, 8-10 mars 2011.
- Bajpai, V. K., Sharma, A., & Baek, K.-H. (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582-590.
- Bettaieb, I., Bourgou, S., Sriti, J., Msaada, K., Limam, F., & Marzouk, B. (2011). Essential oils and fatty acids composition of Tunisian and Indian cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 2100-2107.
- Booth, J. A. (1958). Antibiotic soil-drench treatments for the control of crown gall.

- Bouchard, C., Malina, R. M., & Pérusse, L. (1997). Genetics of fitness and physical performance: Human Kinetics.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of ethnopharmacology*, 77(1), 123-127.
- Charles, D. J. (2012). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*: Springer Science & Business Media.
- Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., & Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*, 62(8), 1175-1183.
- Chérif, M., Arfaoui, A., & Rhaïem, A. (2007). Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 2(1), 7-21.
- Chudasama, K. S., & Thaker, V. S. (2012). Screening of potential antimicrobial compounds against *Xanthomonas campestris* from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an ecofriendly approach. *Archives of phytopathology and plant protection*, 45(7), 783-795.
- Cox, S., Mann, C., Markham, J., Bell, H., Gustafson, J., Warmington, J., & Wyllie, S. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170-175.
- de Almeida Freires, I., Murata, R. M., Furletti, V. F., Sartoratto, A., de

- Alencar, S. M., Figueira, G. M., . . . Rosalen, P. L. (2014). Coriandrum sativum L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on Candida spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. PloS one, 9(6), e99086.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. Journal of agricultural and food chemistry, 55(12), 4863-4870.
- El-Zemity, S. R., Radwan, M. A., El-Monam Mohamed, S. A., & Sherby, S. M. (2008). Antibacterial screening of some essential oils, monoterpenoids and novel N-methyl carbamates based on monoterpenoids against Agrobacterium tumefaciens and Erwinia carotovora. Archives of phytopathology and plant protection, 41(6), 451-461.
- Franz, C., & Novak, J. (2009). Sources of essential oils. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC, New York, 39-81.
- Gawai, D. (2015). Antifungal activity of essential oil of cymbopogon citratus stapf against different Fusarium species. Bionano Frontier, 8(2), 186-189.
- Goswami, M., Mangoli, S., & Jawali, N. (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against Escherichia coli. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(3), 949-954.
- Hassan, W., Ibrahim, M., Nogueira, C. W., Braga, A. L., Mohammadzai,

- I. U., Taube, P. S., & Rocha, J. B. T. (2009). Enhancement of iron-catalyzed lipid peroxidation by acidosis in brain homogenate: comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen. *Brain research*, 1258, 71-77.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., . . . von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- Hoyos, J. M. Á., Alves, E., Rozwalka, L. C., Souza, E. A. d., & Zeviani, W. M. (2012). Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(3), 270-284.
- Hu, L., Wang, D., Liu, L., Chen, J., Xue, Y., & Shi, Z. (2013). Ca²⁺ efflux is involved in cinnamaldehyde-induced growth inhibition of *Phytophthora capsici*. *PloS one*, 8(10), e76264.
- Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F., & Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 57-61.
- Inouye, S., Abe, S., Yamaguchi, H., & Asakura, M. (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(1), 33-41.
- Islam, K. N., Kayanoki, Y., Kaneto, H., Suzuki, K., Asahi, M., Fujii, J., &

- Taniguchi, N. (1997). TGF- β 1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(6), 1007-1017.
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., & Nasiri, A. (2002). Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & *Esfand* from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 17(6), 465-467.
- Jeung, E.-B., & Choi, I.-G. (2007). Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *The Journal of Microbiology*, 460-465.
- Jham, G. N., Dhingra, O. D., Jardim, C. M., & Valente, V. M. (2005). Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4), 404-408.
- Judge, V., Narasimhan, B., Ahuja, M., Sriram, D., Yogeewari, P., De Clercq, E., Balzarini, J. (2012). Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activities, and QSAR studies of isonicotinic acid-1-(substituted phenyl)-ethylidene/cycloheptylidene hydrazides. *Medicinal Chemistry Research*, 21(8), 1935-1952.
- Khalid, K. A. (2014). Essential Oil Composition of Some Spices Treated with Phosphorous in Arid Regions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 972-980.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible

- mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS yeast research*, 11(1), 114-122.
- Kim, K.-H., Choi, Y.-J., Seo, S.-T., & Shin, H.-D. (2009). *Raffaelea quercus-mongolicae* sp. nov. associated with *Platypus koryoensis* on oak in Korea. *Mycotaxon*, 110(1), 189-197.
- Kim, S. W., Kim, K. S., Lamsal, K., Kim, Y.-J., Kim, S. B., Jung, M., Kim, J. K. (2009). An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *J Microbiol Biotechnol*, 19(8), 760-764.
- Kim, Y.-G., Lee, J.-H., Kim, S.-I., Baek, K.-H., & Lee, J. (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International journal of food microbiology*, 195, 30-39.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
- Kujur, A., Kiran, S., Dubey, N., & Prakash, B. (2017). Microencapsulation of *Gaultheria procumbens* essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of antimicrobial activity, stability and mode of action. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 132-138.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., & Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945-952.
- Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of

- action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lee, H. C., Cheng, S. S., & Chang, S. T. (2005). Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12), 2047-2053.
- Lee, S.-O., Choi, G.-J., Jang, K.-S., Lim, H.-K., Cho, K.-Y., & Kim, J.-C. (2007). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 23(2), 97-102.
- Lee, S. H., Lee, S., Kim, J., Lee, C.-K., Kim, K., & Yi, Y. (2012). Antifungal Property of Microorganisms against Korea Oak Wilt Pathogen, *Raffaelea quercus-mongolicae*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* Vol, 40(1), 66-69.
- Lee, Y.-S., Kim, J., Lee, S.-G., Oh, E., Shin, S.-C., & Park, I.-K. (2009). Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(3), 138-143.
- Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., & Park, I. K. (2008). Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and fragrance journal*, 23(1), 23-28.
- Lehtijärvi, H. D. (2006). Antifungal effect of essential oils from some Turkish herbs against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopathologia*

Mediterranea, 45(3), 261-265.

- Li, H., Yang, T., Li, F.-Y., Yao, Y., & Sun, Z.-M. (2014). Antibacterial activity and mechanism of action of *Monarda punctata* essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), 7389.
- Liu, T.-T., & Yang, T.-S. (2012). Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *International journal of food microbiology*, 156(1), 68-75.
- Marčetić, M., Božić, D., Milenković, M., Malešević, N., Radulović, S., & Kovačević, N. (2013). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygia* Scop. *Phytotherapy Research*, 27(11), 1658-1663.
- Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., & Abdelgaleil, S. A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61.
- Marschall, R., & Tudzynski, P. (2014). A new and reliable method for live imaging and quantification of reactive oxygen species in *Botrytis cinerea*: technological advancement. *Fungal Genetics and Biology*, 71, 68-75.
- Michel, M.-F., Brasileiro, A. C. M., Depierreux, C., Otten, L., Delmotte, F., & Jouanin, L. (1990). Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Applied and*

- environmental microbiology, 56(11), 3537-3545.
- Miyazawa, M., & Kawata, J. (2006). Identification of the main aroma compounds in dried seeds of *Brassica hirta*. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 89-92.
- Mukhopadhyay, M., Bantawa, P., Mondal, T. K., & Nandi, S. K. (2016). Biological and phylogenetic advancements of *Gaultheria fragrantissima*: Economically important oil bearing medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 81, 91-99.
- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34-40.
- New, P., & Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *Journal of Applied Microbiology*, 35(2), 279-287.
- Onawunmi, G. O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in applied microbiology*, 9(3), 105-108.
- Onawunmi, G. O., Yisak, W.-A., & Ogunlana, E. (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of ethnopharmacology*, 12(3), 279-286.
- Otten, L., Burr, T., & Szegedi, E. (2008). *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In *Agrobacterium: from biology to biotechnology* (pp. 1-46): Springer.
- Paranagama, P., Wimalasena, S., Jayatilake, G., Jayawardena, A., Senanayake, U., & Mubarak, A. (2010). A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon

- (*Cinnamomum zeylanicum* Blum) grown in Sri Lanka. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 29(3-4).
- Pawar, V., & Thaker, V. (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(8), 1099-1106.
- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., . . . D'amore, M. (1992). Environmental and economic costs of pesticide use. BioScience, 42(10), 750-760.
- Powolny, A. A., & Singh, S. V. (2008). Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. Pharmaceutical research, 25(9), 2171-2180.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC complementary and alternative medicine, 6(1), 39.
- Pradhanang, P., Momol, M., Olson, S., & Jones, J. (2003). Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. Plant disease, 87(4), 423-427.
- Prado-Prone, G., Silva-Bermúdez, P., García-Macedo, J., Almaguer-Flores, A., Ibarra, C., & Velasquillo-Martínez, C. (2017). Photocatalytic antibacterial effect of ZnO nanoparticles into coaxial electrospun PCL fibers to prevent infections from skin injuries. Paper presented at the Energy-based Treatment of

Tissue and Assessment IX.

- Pramanik, A., Laha, D., Bhattacharya, D., Pramanik, P., & Karmakar, P. (2012). A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96, 50-55.
- Rai, M. (2011). *Natural antimicrobials in food safety and quality*: CABI.
- Rai, S. K., Mallavarapu, G. R., Pandey-Rai, S., Srivastava, S., Singh, D., Mishra, R., & Kumar, S. (2006). Constituents of the flower oil of *Carissa opaca* growing in the Aravalli mountain range at New Delhi. *Flavour and fragrance journal*, 21(2), 304-305.
- Rasoul, M. A. A., Marei, G. I. K., & Abdelgaleil, S. A. (2012). Evaluation of antibacterial properties and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(15), 3667-3672.
- Shetty, R., Singhal, R., & Kulkarni, P. (1994). Antimicrobial properties of cumin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(2), 232-233.
- Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., . . . Hun, L. T. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116-131.
- Sikkema, J., De Bont, J., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.
- Silva, C. d. B. d., Guterres, S. S., Weisheimer, V., & Schapoval, E. E.

- (2008). Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 63-66.
- Stępniewska-Jarosz, S., Mańka, M., & Asiegbu, F. (2006). Studies on anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolates causing disease in two forest nurseries in Poland. *Forest Pathology*, 36(2), 97-109.
- Suh, D. Y., Son, S.-Y., Kim, S. H., Seo, S. T., Kim, K. H., & Ko, H. K. (2012). Investigation of fungi in pesticide fumigated oak wilt-diseased logs. *The Korean Journal of Mycology*, 40(4), 288-291.
- Taweechaisupapong, S., Ngaonee, P., Patsuk, P., Pitiphat, W., & Khunkitti, W. (2012). Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. *South African Journal of Botany*, 78, 37-43.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274-3280.
- Van den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.
- Vanitha, s. (2004). Studies on the management of leaf blight disease on manathakkali (*Solanum Nigrum* L.) caused by *Alternaria*

- Chlamydospora Mouchacca by chemical and non chemical methods. Tamil Nadu Agricultural University Coimbatore,
- Wang, S.-Y., Chen, P.-F., & Chang, S.-T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96(7), 813-818.
- Wang, T., Si, M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., Luo, Z.-Q. (2015). Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS pathogens*, 11(7), e1005020.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., & Soontorntanasart, T. (1996). Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. *Phytotherapy Research*, 10(7), 551-554.
- Warnke, P. H., Becker, S. T., Podschun, R., Sivananthan, S., Springer, I. N., Russo, P. A., . . . Sherry, E. (2009). The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 37(7), 392-397.
- Xie, Y., Huang, Q., Wang, Z., Cao, H., & Zhang, D. (2017). Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 97, 388-394.
- Zhang, H., Balaban, M., Principe, J. C., & Portier, K. (2005). Quantification of spice mixture compositions by electronic nose: part I. Experimental design and data analysis using neural

networks. Journal of food science, 70(4).

Abstract

Antimicrobial activity and mode of action of four plant essential oils, their constituents and *trans*-cinnamaldehyde derivatives against three tree pathogens

Lee Ji-eun

Major in Forest Environmental Science

Department of Forest Science

The Graduate School

Seoul National University

This study was conducted to investigate the effect and mode of action of four plant essential oils, components of the active essential oils and *trans*-cinnamaldehyde derivatives against the oak wilt disease (*Raffaelea quercus-mongolicae* KH Kim, YJ Choi & HD Shin),

damping-off disease (*Rhizoctonia solani* JG Kühn), and crown-gall disease (*Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend).

In a fumigant test, cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) plant essential oils showed 100% fumigant antifungal activity against *R. quercus-mongolicae* at 5 μ l/paper disc concentration. In a test with *R. solani*, cinnamon bark and lemongrass oils showed 100% fumigant antifungal activity at 1.25 μ l/paper disc concentration and 2.5 μ l/paper disc concentration, respectively. Cinnamon bark, cumin (*Cuminum cyminum*), lemongrass and wintergreen (*Gaultheria fragrantissima*) oils showed fumigant antibacterial activity against *A. tumefaciens* with length of inhibition zone of 2.20 cm, 1.76 cm, 1.50 cm and 1.04 cm at 10 μ l/paper disc concentration, respectively.

In a contact antifungal activity test with *R. quercus-mongolicae*, MICs (minimum inhibitory concentrations) of cinnamon bark, cumin and lemongrass oils were 250 μ g/ml, 800 μ g/ml, and 450 μ g/ml, respectively. In a test with *R. solani*, MICs of the cinnamon bark, cumin and lemongrass oils were 200 μ g/ml, 850 μ g/ml and 400 μ g/ml, respectively. In a contact antibacterial activity test with *A. tumefaciens*, MICs of the cinnamon bark, cumin and lemongrass oils were 250 μ g/ml, 900 μ g/ml and 450 μ g/ml, respectively.

Among identified compounds in active oils and *trans*-cinnamaldehyde derivatives, salicylaldehyde, eugenol and hydrocinnamaldehyde showed 100% fumigant antifungal activity against *R. quercus-mongolicae* at

0.625 μl /paper disc concentration, 0.625 μl /paper disc concentration and 2.5 μl /paper disc concentration, respectively. In a test with *R. solani*, *trans*-cinnamaldehyde, neral and hydrocinnamaldehyde showed 100% fumigant antifungal activity at 0.3125 μl /paper disc concentration, 1.25 μl /paper disc concentration and 1.25 μl /paper disc concentration, respectively. In a fumigant activity test with *A. tumefaciens*, salicylaldehyde, hydrocinnamaldehyde, cuminaldehyde and *trans*-cinnamaldehyde showed antibacterial activity with length of inhibition zone of 2.80 cm, 2.26 cm, 2.08 cm and 1.92 cm, respectively.

In a contact antifungal activity test with *R. quercus-mongolicae*, MICs of neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamyl alcohol and hydrocinnamaldehyde were 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. MICs of commercial fungicides benomyl, propiconazole, and tebuconazole were 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. In a test with *R. solani*, MICs of neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamyl alcohol and hydrocinnamaldehyde were 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. MICs of commercial fungicides benomyl, propiconazole, and tebuconazole were 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. In a contact antibacterial activity test with *A. tumefaciens*, MICs of neral, cuminaldehyde, geraniol, geranial, *trans*-cinnamaldehyde, eugenol and cinnamyl alcohol were 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 650 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. MICs of commercial

antibiotics, streptomycin sulfate salt was 3.125 µg/ml.

In conclusion, cinnamon bark, lemongrass, neral, geranial, *trans*-cinnamaldehyde showed strong fumigant and contact antimicrobial activity against three pathogens of tree diseases.

Fumigation and contact antimicrobial activity of three pathogen were significantly lowered in the artificial blend in which the *trans*-cinnamaldehyde was removed from cinnamon bark oil components. Fumigation and contact antimicrobial activity of three pathogen were significantly lowered in the artificial blends in which the neral and geranial were individually removed from lemongrass oil components.

In conclusion, *trans*-cinnamaldehyde in cinnamon bark is the most active fumigation and contact antimicrobial agent against three pathogen of tree diseases. Neral and geranial in lemongrass are the most active fumigation and contact antimicrobial agents against three pathogen of tree diseases.

In order to elucidate the mode of action of plant essential oils, their constituents and *trans*-cinnamaldehyde derivatives, differentially expressed genes and gene ontology of *A. tumefaciens* treated with *trans*-cinnamaldehyde and salicylaldehyde were investigated. As a result, it was confirmed that expression of genes regulating hydroxyl radical was suppressed in all experimental groups. Based on these results, the

expression of reactive oxygen species and the cell membrane destruction were investigated to figure out gene expression leads to actual biotic reactions. As a result, fumigant treatments against three pathogen of tree diseases with cinnamon bark, lemongrass, *trans*-cinnamaldehyde, neral, geranial, salicylaldehyde and hydrocinnamaldehyde overexpressed the reactive oxygen species and destroyed the cell membrane.

In conclusion, three pathogen of tree diseases treated with plant essential oils, their constituents and *trans*-cinnamaldehyde derivatives could not regulate reactive oxygen species , which may result in damage to cell membrane.

keywords: plant essential oil, *Raffaelea quercus-mongolicae*, *Rhizoctonia solani*, *Agrobacterium tumefaciens*, antimicrobial activity, reactive oxygen species, cell membrane damage

Student Number: 2016-21461