

CO₂ 농도 상승 효과에 의한 고추 세균점무늬병 발병 양상 분석

장종옥¹, 김병혁¹, 문두경¹, 고상욱¹, 좌재호^{2*}

¹농촌진흥청, 국립원예특작과학원, 온난화대응농업연구소

²농촌진흥청, 국립원예특작과학원, 감귤연구소

Received: August 28, 2017 / Revised: November 28, 2017 / Accepted: January 5, 2018

Analysis of Bacterial Spot Disease in Red Pepper Caused by Increase of CO₂ Concentration

Jong-Ok Jang¹, Byung-Hyuk Kim¹, Doo-Gyung Moon¹, Sang-wook Koh¹, and Jae-Ho Joa^{2*}

¹Research Institute for Climate Change and Agriculture, ²Citrus Research Institute, NIHHS, RDA, Jeju 63240, Republic of Korea

An increase in CO₂ will affect plant pathogenic microorganisms, the resistance of host plants, and host-pathogen interactions. This study used *Capsicum annuum* and *Xanthomonas euvesicatoria*, a pathogenic bacterium of pepper, to investigate the interactions between hosts and pathogens in conditions of increased CO₂ concentrations. Our analysis of disease resistance genes under 800 ppm CO₂ using quantitative RT-PCR showed that the expression of CaLRR1, CaPIK1, and PR10 decreased, but that of negative regulator WRKY1 increased. Additionally, the disease progress and severity was higher at 800 ppm than 400 ppm CO₂. These results will aid in understanding the interaction between red pepper and *X. euvesicatoria* under increased CO₂ concentrations in the future.

Keywords: CO₂, red pepper, *Xanthomonas euvesicatoria*, bacterial spot disease

서론

사회·경제적 발전과 기후 정책에 따라 대기 중 누적 CO₂ 농도의 예측 모델링은 다양하게 제시되고 있다. RCP (Representative Concentration Pathway, 대표농도경로) 시나리오에 따르면 2100년 지구 평균 CO₂ 농도는 온실가스 배출량이 낮은 시나리오인 RCP 2.6일 때 500 ppm 미만으로 줄어들지만, 중간 시나리오인 RCP 4.5와 RCP 6.0일 때 500–600 ppm, 온실가스 배출이 매우 높은 시나리오인 RCP 8.5일 때는 1,000 ppm 이상 증가할 것으로 예상하고 있다[1]. 대기 중 CO₂의 농도는 1750년 이후 30%가 증가하였으며, 2100년에는 현재 수준에서 두 배 혹은 그 이상이 될 것으로 예상된다. 미국해양대기청(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)에 따르면 2015년 3월 전 지구의 CO₂ 농도가 400.83 ppm으로, 관측 이래 처음으로 400 ppm이 넘었다고 발표하였다. 우리나라의 경우 안면도 기후변화감시소에서 1999년 관측을 시작한 이래 2012년 399.9 ppm,

2013년 402.4 ppm, 2016년 409 ppm으로 매년 2.09 ppm씩 증가하는 추세이다.

CO₂의 상승은 식물 병원성 미생물의 발병력과 기주 식물의 저항성에 영향을 미칠 것이며, 기주와 병원체의 상호 작용에도 영향을 미칠 것으로 예상된다. CO₂는 식물에 직접적인 생물학적 영향을 미칠 수 있는 요소이며, 식물 병원성 미생물에도 직접 또는 간접적으로 영향을 미친다[2, 3]. 식물 병원성 세균인 *Erwinia carotovora*와 *Pseudomonas fluorescens*는 높은 CO₂ 농도에서 성장 저해를 받으며, 식물 병원성 곰팡이인 *Phytophthora capsici*는 포자 형성에 영향을 받는다는 연구결과가 이미 보고되었다[4, 5]. 1990년대부터 영국, 호주, 미국, 독일 등 많은 나라에서 CO₂ 농도 증가와 병원성 미생물에 대한 연구를 발표하였으나 대부분 350 ppm에서 700 ppm으로 증가하였을 때의 결과이며, 빠르게 변하는 기후 하에서 병원균과 기주 식물간의 새로운 데이터는 매우 부족한 실정이다[6, 7].

식물은 외부적 스트레스에 저항하기 위해 과민성 반응(hypersensitive response, HR)을 보이거나, HR의 반응 결과로 병저항성(pathogenesis-related, PR) 단백질이 유도된다[8–10]. 병원성 미생물이나 곤충 등에 의한 환경 스트레스에 의해 식물 스스로 방어할 수 있는 반응 기작인 HR은 감

*Corresponding author

Tel: +82-64-730-4172, Fax: +82-64-733-9564

E-mail: choa0313@korea.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

염된 부위를 아주 빠르게 괴사시켜 병원체의 감염을 차단하여 식물체를 보호하며[11, 12], 차후 병원균의 침입을 억제할 수 있는 전신 획득 저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 유도시킨다[13, 14]. 식물체의 대표적인 HR 관여 유전자는 PIK1 [15, 16], LRR1 [17, 18], WRKY1 [19, 20] 등이 있다.

고추(*Capsicum annuum* L.)는 2013년 국내 재배 면적이 45,360 ha로, 경제적으로 매우 중요한 작물이며 우리나라의 식생활 문화와도 밀접한 관계를 가진다[21]. 고추에 세균점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*)는 식물체의 각 부분에 발병하지만 주로 잎에 황녹색의 점무늬를 나타내며 병반이 점차 확대되면 잎 전체가 황화되어 조기 낙엽을 유발한다. *Xcv*에 감염된 고추는 HR 반응과 함께 유전자-유전자 간의 상호 작용에 의해 병에 대한 저항성이 조절된다[22]. 병원체에 의해 고추에 유도된 CaLRR1 (Leucine-rich repeat)은 5개의 glycosylation 부위와 5개의 LRR domain을 가지며 효소 억제제, 리보솜 결합 단백질, 호르몬 수용체 등 다수의 활성 단백질의 주요 구조에서 발견된다[23-26]. CaLRR과 마찬가지로 HR 반응에 의해 유도되는 식물의 WRKY 전사 요소군은 생리 및 대사 조절작용에 관여하는 매우 독특한 전사조절체라 보고되어 있다[27-29]. 고추 식물체에서 확인된 *CaWRKY1* (zinc finger-domain transcription factor 1) 유전자는 비숙주 병원균인 *Xanthomonas axonopodis*에 의해 감염된 고추에서 확인되었다[30].

Protein kinase는 유전자의 발현, 세포의 성장과 분화 조절에 관여하는 생물학적 시스템의 주요 요소이며[31, 32], 병원균을 인식하여 식물의 방어 반응을 유발하는데 필수적 단백질이다[33, 34]. Protein kinase의 하나인 *CaPIK1*은 VIGS (virus-induced gene silencing) 방법을 이용하여 *CaPIK1* knockdown 된 고추 식물체에서 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 감염에 감수성이 증가하였고, 이러한 결과는 *CaPIK1*이 *Xcv*의 감염에 대한 방어 및 내성의 양성 조절 인자로서 기능을 한다는 것을 알 수 있다[35].

PR 단백질은 병원체의 감염, 식물체의 발달 과정, 생물학적인 스트레스에 적응할 때 유도 되는 단백질로, 많은 식물에서 발견된다[36, 37]. 그 중 병원체의 감염에 의해 유도되는 PR 단백질은 감염부위에 국소적, 전신적(SAR)으로 축적되는 종 특이적 단백질로 곰팡이, 박테리아 또는 바이러스의 감염에 과민 혹은 저항의 반응으로 다량 생산된다[38]. 세포의 PR 단백질은 가수 분해 효소(chitinase, β -glucanase 등)와 항균성 물질 등이 있으며, 세포 내 PR 단백질은 배양된 파슬리에서 elicitor 처리에 의해 처음 기술되었고[39], 그 외 담배의 PR-1, 2, 3, 4 등과 토마토의 PR-6, 7 등 14가지 이상의 PR 단백질이 알려져 있다[40, 41]. 특히 고추는 우리나라에서 활발하게 연구되고 있는데 잎 조직에서 매우 낮은 수준의 CaPR10 단백질은 담배 모자이크 바이러스 TMV-P₀에

의해 극적으로 유도되었으며 이는 ribonucleolytic 활성의 증가와 관련이 있다는 보고가 있다[42]. 또한 고추의 PR4b 단백질은 LRR1 단백질과 상호 작용하여 식물 세포 사멸 및 방어 반응의 양성 조절 인자로서 기능을 한다는 보고가 있다[43].

본 연구는 CO₂ 상승 환경에서 기주와 병원체 간의 상호 작용을 연구하기 위하여 고추와 고추에 세균점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas euvesicatoria*를 이용하였다. 고추 식물체에 *X. euvesicatoria*를 접종 후, 대기의 CO₂ 농도와 유사한 400 ppm과 대기보다 2배 높은 800 ppm의 CO₂ 환경에서 *CaLRR1*, *CaWRKY1*, *CaPIK1* 그리고 *CaPR10* 유전자를 Quantitative RT-PCR로 분석하여 고추 병저항성 관련 유전자의 발현 양상을 확인하였고, 최종적으로 고추 식물체에서의 점무늬병 발병 양상을 확인하였다. 본 연구결과를 통해 미래의 CO₂ 증가 환경에서 우리나라의 중요 경제 작물인 고추와 고추의 주요 피해 병원균인 *X. euvesicatoria*의 발병 양상을 이해하는 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에서 사용한 고추(*Capsicum annuum*)는 Early Calwonder (ECW) 계통인 ECW-30R을 경북대학교 원예학과 과로부터 분양받아 사용하였다. 각 종자는 유리온실 내에서 육묘용 상토가 담긴 72공 포트에 파종하여 발아시켰으며, 4엽이 되었을 때 지름 9 cm의 포트에 옮겨 심었다. 고추에 세균점무늬병을 일으키는 병원균인 *Xanthomonas euvesicatoria* KACC 18722는 25% glycerol stock 상태로 -80°C에 보관하며 사용하였다.

병원균 접종 및 CO₂ 처리

병원균은 8주 된 ECW-30R에 접종하였다. *X. euvesicatoria*는 TSB (Tryptic Soy Broth, 1.7% pancreatic digest of casein, 0.3% papaic digest of casein, 0.25% dextrose, 0.5% sodium chloride, 0.25% dipotassium phosphate) 배지에 접종 후 25°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 미네랄 오일 : 병원균 현탁액은 1:4가 되도록 혼합하여 최종 병원균의 양은 10⁸ cfu/ml이 되게 한 후 분무기를 이용하여 식물체에 접종하였다. 각 pot의 배양조건은 온도는 30°C로 유지되며, CO₂의 농도는 각각 400 ppm과 800 ppm의 조건이 유지되는 생장상에서 각각 습식 처리하였다. 병 접종 후 2일 뒤에 유전자 분석을 위한 시료를 채취하였고, 병 접종 후 2주 뒤 발병도를 조사하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

X. euvesicatoria 접종 2일 후 병징이 나타난 고추 잎 조직

을 액체 질소에 얼려 분쇄한 후, Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 DeNovix DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix, USA)로 정량하였다. cDNA 합성은 2 µg의 RNA와 1 µl oligo dT (100 pmol/l)를 혼합 후, DEPC-treated distilled water로 전체 부피를 16 µl로 맞춘 뒤, 70°C에서 5분간 처리하였다. 이 후, 5× reverse transcription master mix (Elpis Biotech, Korea)를 4 µl 첨가하고, 42°C에서 90분, 94°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

Quantitative RT-PCR에 의한 병 관련 유전자 분석

병 관련 유전자 분석을 위한 primer는 NCBI에 등록되어 있는 유전자를 참조하였으며, primer3 (<http://primer3.ut.ee/>)를 이용하여 설계하였다(Table 1). 각 유전자의 발현 양은 quantitative RT-PCR (Real Time-PCR)을 수행하여 분석하였다. qRT-PCR 분석을 위한 standard clone은 설계된 primer를 이용하여 PCR한 후, 각각의 PCR 산물을 All-in-one vector (Biofact, Korea)에 cloning하였으며, plasmid DNA는 HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 추출하였다. 염기서열 분석은 All-in-one Vector systems manual에 따라 M13-20F와 M13-20R primer를 이용하여 분석하였고, BLAST search를 통해 확인하였다. 염기서열이 확인된 plasmid DNA는 real-time PCR (Bio-Rad, USA)을 이용하여 melting curve 분석 후 정량분석을 위한 표준 유전자(artificial standard clone)로 사용하였다.

정량 PCR은 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)과 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Germany)을 이용하였다. 각 유전자의 정량 PCR은 앞에서 설계한 각각의 primer를 이용하였으며(Table 1), 반응조건은 95°C에서 15 min 동안 pre-denaturation 시켜, 95°C에서 30 sec denaturation, 각 유전자 별로 30 sec annealing, 72°C에서 30 sec extension 후 fluorescence를 측정하고 45 cycles을 수행하였다. *CaLRR1*, *CaWRKY1*,

CaPIK1, *CaPR10* 유전자의 annealing 값은 각각 64.2°C, 64.0°C, 62.6°C 및 62.6°C이다. Final extension은 72°C에서 5 min 동안 수행하였다. Melting curve 분석은 65°C 부터 95°C까지 0.2°C씩 증가시키면서 fluorescence를 측정하였다.

정량을 위한 표준 유전자를 1 ng/µl부터 serial dilution하여 qRT-PCR을 수행하였으며, 분석하고자 하는 DNA 농도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, USA)을 이용하여 1 ng/µl를 분석에 이용하였다.

발병 조사

CO₂ 농도에 따른 고추 세균점무늬병의 발병 양상을 확인하기 위해 *X. euvesicatoria*를 접종 후 14일 뒤에 이병엽를 확인하였으며, 이병엽를 발병엽수와 전체 엽수를 조사하여 백분율로 산출하였다. 발병도 조사는 각 잎의 병반 부위를 세어 0-4 (0; 병반 부위 없음, 1; 1-20개, 2; 21-40개, 3; 41-60개, 4; 61개 이상)로 발병 정도를 구분하여, 구분된 수의 평균값을 발병도로 정의하였다.

결과 및 고찰

CO₂ 농도 상승 조건에서의 *CaLRR1* 유전자 발현 양상

CO₂ 농도에 따른 *X. euvesicatoria* 처리구와 무처리구의 *CaLRR1* qRT-PCR 결과는 Fig. 1과 같다. 400 ppm에서 *X. euvesicatoria* 무처리구는 1.0×10^3 molecule·copy/µl, 처리구는 1.7×10^4 molecule·copy/µl로 처리구에서 약 17배 증가하였다. 800 ppm에서는 무처리구 9×10^3 molecule·copy/µl, 처리구는 1.5×10^4 molecule·copy/µl로 약 1.6배 증가하였다. 400 ppm과 800 ppm의 무처리구에서 *CaLRR1* 발현량이 800 ppm에서 9배로 높았으나, *X. euvesicatoria* 처리구에서는 800 ppm이 400 ppm보다 감소하는 경향을 보였다. 이것은 사탕수수에서 *Collectotrichum graminicola*에 의한 *SLRR* 유전자의 발현이나[44], *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 의한 고추에서의 *CaLRR1* 유전자의 발현 연구에서 병원

Table 1. Nucleic acid sequence of oligonucleotide primers used qRT-PCR assay for the disease resistance gene of *Capsicum annuum* L. in this study.

Gene	Type of primer	Sequence (5'-3')	product size (bp)	GenBank access No.
CaLRR1	F	ATGAGGTTTCATTGCCCTGG	594	AY237117
	R	CTAGGCTTTCATGTCTTGGAC		
CaWRKY1	F	CAACAAGATCCGACACTCATACCC	369	EF468464
	R	CAGGAATCAGAATGGGGATAGACC		
CaPIK1	F	GGCTCTGGTTCACTGGAAGATCATCTA	285	GU295436
	R	GCACAGTATCCATATGTACCCATCACTCTG		
CaPR10	F	ATGGGTGCTTATACCTTTACTGAC	481	DQ351935
	R	TTAAACATAGACAGAAGGATTGG		

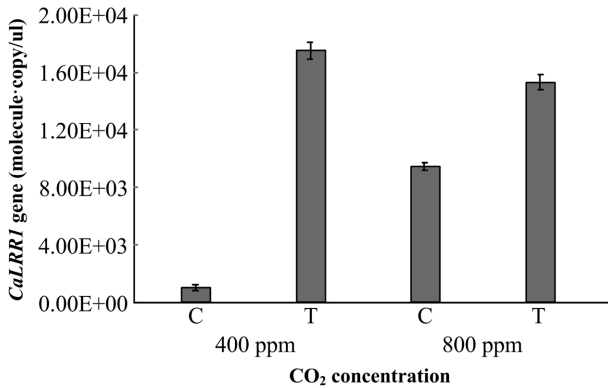


Fig. 1. Expression of disease resistance gene *CaLRR1* in *Capsicum annuum* L. by *Xanthomonas euvesicatoria*. The control means none treated *X. euvesicatoria*. C; control, T; treatment.

성 박테리아에 의한 식물체의 감염이 *LRR* 유전자의 발현에 관여된다는 연구 결과와 마찬가지로 각각의 CO₂ 농도에서 *X. euvesicatoria*를 접종 시 *CaLRR1*의 발현량이 높아졌다. 400 ppm과 800 ppm의 대조구를 비교하면 800 ppm에서 *CaLRR1*의 발현량이 높아졌으나, *X. euvesicatoria*를 접종한 처리구를 비교하면 800 ppm에서의 발현량이 400 ppm 보다 13% 낮아졌다.

CO₂ 농도 상승 조건에서의 *CaWRKY1* 유전자 발현 양상

WRKY 단백질은 노화, 병원체로부터 방어 등 생물학적 또는 비생물학적인 프로그램을 조절하며 arabidopsis에서 100여개가 발견되는 superfamily이다[45, 46]. CO₂ 농도 400 ppm에서 무처리구와 처리구의 qRT-PCR 결과는 각각 5.2×10^3 molecule·copy/μl와 5.8×10^3 molecule·copy/μl로 *X. euvesicatoria*에 의한 유전자의 변화는 크게 차이가 나지 않았다. 800 ppm에서는 무처리구와 처리구가 3.1×10^3 molecule·copy/μl, 8.9×10^3 molecule·copy/μl로 *X. euvesicatoria* 처리구가 무처리구보다 약 3배 높았다(Fig. 2). 무처리구 간 비교 시 800 ppm이 400 ppm 보다 40% 감소하였으나, 처리구 간 비교 시에는 800 ppm이 45% 증가하였다. *CaWRKY1*은 본 연구에서 분석한 다른 3개의 유전자와 달리 400 ppm 처리구 보다 800 ppm 처리구에서 발현 량이 증가하였다. 식물의 방어는 대사와 성장을 포함하여 up-regulation이 되는 유전자도 있지만 down-regulation의 경향을 보이는 유전자도 있다. 이는 고추의 *CaWRKY1* 단백질이 병원균을 방어 하기 위해 negative regulator의 역할을 하며, *CaWRKY1* 단백질이 과발현 된 담배 식물체가 담배 모자이크 바이러스에 감염되었을 때 대조군 보다 더 광범위한 괴사 병변을 보인 결과와 유사하다[47]. 즉, *CaWRKY1* 유전자가 800 ppm에서 발현이 높아졌다는 것은 *X. euvesicatoria*에 의한 *CaWRKY1*

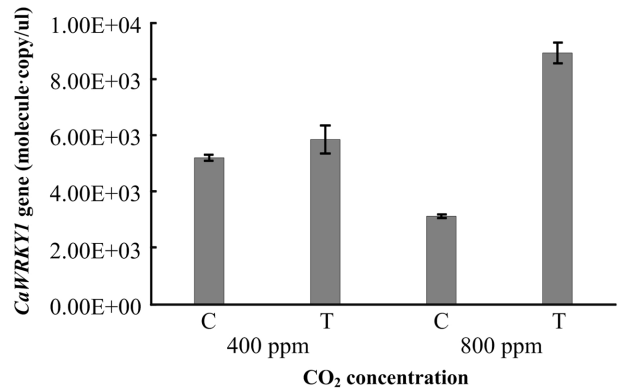


Fig. 2. Expression of disease resistance gene *CaWRKY1* in *Capsicum annuum* L. by *Xanthomonas euvesicatoria*. The control means none treated *X. euvesicatoria*. C; control, T; treatment.

단백질의 발현이 적어졌다는 것을 유추할 수 있으며, *X. euvesicatoria*의 병원성에 400 ppm 보다 800 ppm의 환경에서 고추 식물체가 더 많은 영향을 받았기 때문이라 사료된다. 무처리구에서는 400 ppm 보다 800 ppm에서 *CaWRKY1* 유전자 발현이 낮아진 이유도 이러한 맥락으로 해석이 가능할 것이다.

CO₂ 농도 상승 조건에서의 *CaPIK1* 유전자 발현 양상

*CaPIK1*은 RLCK (receptor-like cytoplasmic protein kinase)와 높은 유사성을 가진다. RLCK는 식물에서만 발견되는 독특한 단백질로 알려져 있다[48, 49]. 본 연구에서 CO₂ 농도에 따른 *CaPIK1* 유전자의 발현 패턴을 분석한 결과 400 ppm일 경우 대조구에서는 3.3×10^2 molecule·copy/μl, 처리구에서는 1.3×10^3 molecule·copy/μl로 발현되었으며 처리구에서 약 4배 높게 발현되었다. 800 ppm일 경우 대조구는 6.6×10^2 molecule·copy/μl, 처리구에서는 9.8×10^2 molecule·copy/μl로 약 1.4배 높게 발현되었다(Fig. 3). 각 CO₂ 농도의 무처리구만 비교하면 400 ppm보다 800 ppm에서 2배 정도 발현량이 증가하였지만, *X. euvesicatoria*가 접종 된 처리구에서는 발현량이 30% 정도 감소하였다. Kim 등의 연구에 따르면 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 의해 감염 초기 단계에서 고추 식물체 내 높은 수준의 *CaPIK1* 유전자가 발현되었으며 이 결과는 *CaPIK1* 단백질이 병원균 침입에 대한 고추 식물의 방어 반응과 연관된 것이라는 결과와 유사하다 [35]. 즉, 400 ppm에서 대조구와 비교해 처리구에서의 발현 양이 증가한 것은 *X. euvesicatoria*에 의한 고추 식물의 방어 반응에 대한 결과이며, 800 ppm의 *X. euvesicatoria* 처리구는 800 ppm의 대조구보다는 발현 양이 높지만 400 ppm의 처리구보다 낮게 발현되었기 때문에 400 ppm 보다 800 ppm에서 *X. euvesicatoria*에 의한 식물체의 방어 반응이 낮아질

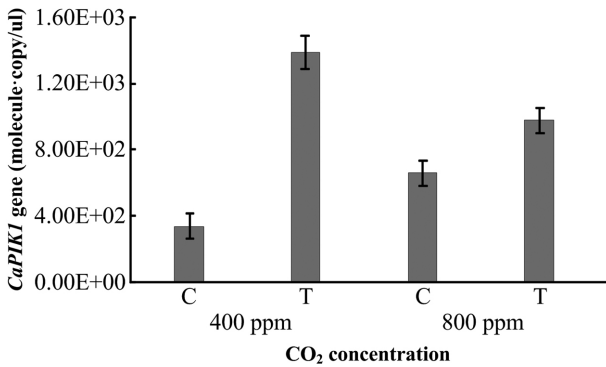


Fig. 3. Expression of disease resistance gene *CaPIK1* in *Capsicum annuum* L. by *Xanthomonas euvesicatoria*. The control means none treated *X. euvesicatoria*. C; control, T; treatment.

것이라 예상된다.

CO₂ 농도 상승 조건에서의 *CaPR10* 유전자 발현 양상

CO₂ 농도에 따른 *CaPR10* 유전자의 발현 양상은 Fig. 4와 같다. CO₂ 농도 400 ppm의 무처리구에서는 *CaPR10* 유전자가 발현되지 않았으나, *X. euvesicatoria* 처리구에서는 5.7×10^3 molecule·copy/μl가 발현되었다. 400 ppm과 800 ppm의 처리구간 비교 결과 800 ppm에서 발현량이 10% 감소하였으며 이는 *CaLRR1*, *CaWRKY1*, *CaPIK1*과 같은 양상을 보인다. 다른 유전자 발현과 차별되는 결과는 800 ppm에서의 무처리구와 처리구의 발현 양상이다. 무처리구에서의 발현량은 7.2×10^3 molecule·copy/μl, 처리구에서는 5.1×10^3 molecule·copy/μl로 다른 유전자와는 다르게 무처리구에서의 *CaPR10*의 발현이 더 높았다. 유도성 방어 유전자인 *PR10* 유전자는 salicylic acid, ethylene 같은 저분자의 물질 또는 암(dark) 상태나 가뭄의 환경적 스트레스에 의해서 유도가 된다[50-53]. 같은 조건의 1일차 고추 식물체 샘플에서

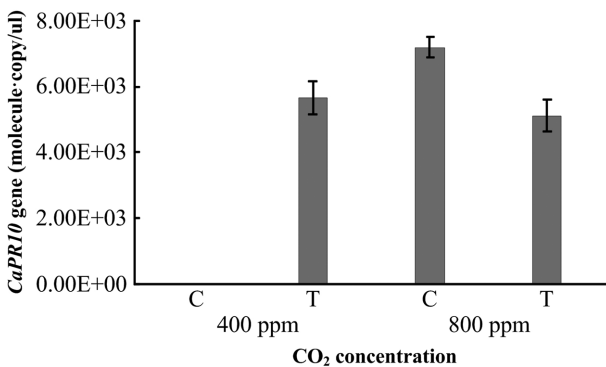


Fig. 4. Expression of disease resistance gene *CaPR10* in *Capsicum annuum* L. by *Xanthomonas euvesicatoria*. The control means none treated *X. euvesicatoria*. C; control, T; treatment.

도 무처리구의 *CaPR10* 유전자 발현이 처리구의 발현보다 높았던 것과 35℃에서 같은 조건으로 실험했을 때도 유사한 결과(data not shown)가 나왔던 것을 감안한다면 *CaPR10* 유전자가 CO₂의 농도에 영향을 받는 것으로 추측할 수 있다. 하지만, 현재까지 CO₂와 *CaPR10*에 대한 연구가 부족한 실정이기 때문에 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

CO₂ 농도 상승 조건에서의 발병조사

현재 대기 중의 CO₂ 농도인 400 ppm과 2배 높은 800 ppm의 조건에서 *X. euvesicatoria*에 의한 고추 세균점무늬병의 발병 정도는 Table 2와 같으며, *X. euvesicatoria*를 접종하지 않은 대조구에서는 세균점무늬병이 발병하지 않음을 확인하였다. 각 CO₂ 농도에서 이병엽률은 400 ppm에서 34.7%, 800 ppm에서 61.6%로 약 2배 높아졌다. 또한, 발병도는 400 ppm에서 0.8, 800 ppm에서 1.2로 이병률과 마찬가지로 발병도 역시 800 ppm이 높은 것으로 확인하였다. 고추에 세균점무늬병을 일으키는 *X. euvesicatoria*는 과거에 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*로 표기되었으나 최근 분자유전학적 분류 체계의 발전으로 *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* 그리고 *X. gardneri*의 4종으로 세분화되었으며, 그 중 *X. euvesicatoria*가 고추의 세균점무늬병을 일으키는 주요 원인균으로 보고되었다[54-56]. 우리나라에서는 대부분 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 대한 연구가 주를 이루며, 2010년경부터 *X. euvesicatoria*를 연구하기 시작하여 관련 연구 결과가 부족한 상황이다. 그러나 Shin과 Yun의 보고에 의하면, *X. campestris* pv. *vesicatoria*는 온도와 CO₂의 증가가 발병률 증가와 연관이 있다 하였고, 이는 *X. euvesicatoria*로 연구한 본 실험의 결과와 유사하다[57].

또한, *Phytophthora capsici*에 대한 감수성과 저항성 고추 식물체의 PR 관련 유전자를 분석한 결과 저항성 품종이 감수성 품종 보다 PR 관련 유전자가 높게 발현된다고 보고되었고[58], 식물 면역에 관여하는 chitinase인 *ChiIV3* 유전자는 PCI (*Phytophthora capsici* inoculation)에 의해 유도되며 유도 유전자 침묵(virus-induced gene silencing)과 일시

Table 2. Effect of CO₂ on disease ratio and severity by *Xanthomonas euvesicatoria*.

CO ₂ concentration (ppm)	Treated <i>X. euvesicatoria</i>	Ratio of diseased leaves (%)	Disease severity
400	X	0	0
	O	34.7 ± 1.2	0.8 ± 0.1
800	X	0	0
	O	61.6 ± 3.8	1.2 ± 0.25

The temperature of the incubation room is maintained at 30℃.

적인 과발현(transient overexpression)에 의해 PR 유전자의 상향 조절을 유발한다고 보고되었다[59]. 즉, 식물은 면역 반응에 의해 PR 관련 유전자가 높게 발현되어 외부 스트레스에 대응하지만 본 연구에서는 높은 CO₂ 환경에서 PR 관련 유전자의 발현량이 감소하는 결과를 보였으며, 이는 발병도 및 이병엽률이 낮아지는 결과와 연관되는 것으로 사료된다.

CO₂ 증가에 따른 병원성 미생물과 식물의 상호작용 연구는 두 가지 관점으로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째 관점은 CO₂의 증가에 따른 병원성 미생물 생장의 변화이다. 탄저병인 *Collectotrichum gloeosporioides*은 2배 높은 CO₂ 농도에서 초기의 생장이 지연되었으나 한번 콜로니가 형성되면 빠르게 생장률이 높아졌고[60], 보리흰가루병인 *Erysiphe graminis*는 350 ppm 보다 700 ppm의 CO₂에서 생장률이 높아졌다는 보고가 있다[61]. 두 번째 관점은 CO₂ 증가에 따른 식물의 변화로 형태적 변화나 생리적 변화로 인해 병원성 미생물에 대한 저항성의 변화이다. 예를 들어, CO₂가 700 ppm으로 상승된 경우 식물의 defense structure인 파필라(papilla)의 형성과 기공의 밀도 감소에 의한 병원체의 침입 방지는 식물체의 내성 증가와 관련된다[61, 62]. 하나는 미생물의 변화이고 다른 하나는 식물의 변화이지만 두 관점 모두 CO₂ 농도가 높아짐에 따라 병원체와 기주 식물의 변화는 일어나며, 결론적으로 환경 요인이 어느 쪽으로 더 유리하게 작용하는가에 따라 결과가 달라질 수 있다는 것을 의미한다.

본 연구는 대기 중 CO₂ 농도가 현재보다 2배 증가할 경우 고추 세균점무늬 병의 발병 양상을 예측하기 위해 병원성 관련 유전자의 발현 패턴을 분석하고, 병의 표현형인 발병도 및 이병엽률을 조사하였다. 실험 결과 *X. euvesicatoria*가 접종된 처리구의 *CaLRR1*, *CaPIK1* 그리고 *CaPR10* 유전자는 400 ppm 보다 800 ppm에서 발현 양이 감소하였고, negative regulator인 *CaWRKY1*은 발현 양이 증가하였다. *X. euvesicatoria* 접종 14일 후 식물체의 표현형을 확인한 결과 이병엽률과 발병도 모두 800 ppm에서 증가되었으며, 이 결과로부터 높은 대기 중 CO₂ 농도는 이병엽률과 발병도 증가의 원인이 될 수 있음을 추측할 수 있다. 추가적으로 4가지 병원성 관련 유전자는 식물의 병 저항성을 증가 또는 감소시킬 수 있지만, 800 ppm의 CO₂ 환경에서 식물체 병 저항성의 감소와 연관성이 있을 것으로 추측된다. 따라서 미래의 CO₂ 증가 환경에서 고추 세균점무늬병의 발병은 지금보다 증가할 것으로 예상되며, 본 연구는 이에 대응하기 위한 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

CO₂의 상승은 식물 병원성 미생물의 발병력과 기주 식물

의 저항성에 영향을 미칠 것이며, 기주와 병원체의 상호 작용에도 영향을 미칠 것으로 예상된다. 본 연구는 CO₂ 상승 환경에서 기주와 병원체간의 상호 작용을 연구하기 위하여 고추(*Capsicum annuum*)와 세균점무늬병을 유발하는 *X. euvesicatoria*를 이용하였다. 고추 식물체의 병저항성 관련 유전자인 *CaLRR1*, *CaWRKY1*, *CaPIK1* 그리고 *CaPR10* 유전자를 quantitative RT-PCR로 분석한 결과 800 ppm에서 *CaLRR1*, *CaPIK1* 그리고 *PR10* 유전자의 발현이 감소하였으며, negative regulator인 *CaWRKY1* 유전자는 발현이 증가하였다. 400 ppm과 800 ppm의 CO₂ 농도에서 이병엽률과 발병도를 확인 한 결과 800 ppm에서 발병도가 증가된 것을 확인하였다. 이들 결과는 미래의 CO₂ 농도가 증가 된 환경에서 고추와 고추의 주요 피해 병원균인 *X. euvesicatoria*에 의한 고추 세균점무늬병의 발병 양상을 이해하는 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

Acknowledgments

This study was supported by 2016 the RDA Fellowship Program (Project title: Impact assessment on disease incidence of bacterial spot of pepper according to increase of temperature and CO₂ concentration, No. PJ011966012017) of National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea. We also thank Dr. Byung-Soo Kim, who kindly provided the pepper seeds ECW-30R for this study.

References

- Jones C, Robertson E, Arora V, Friedlingstein P, Shevliakova E, Bopp L, et al. 2016. Twenty-first-century compatible CO₂ emissions and airborne fraction simulated by CMIP5 earth system models under four representative concentration pathways. *J. Climate*. **26**: 4398-4413.
- Coakley SM, Seherm H, Chakraborty S. 1999. Climate change and plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 399-426.
- Manning WJ, Tiedemann AN. 1995. Climate change: Potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet (UV-B), radiation on plant diseases. *Environ. Pollut.* **88**: 219-245.
- Wells JM. 1974. Growth of *Erwinia carotovora*, *E. atroseptica* and *Pseudomonas fluorescens* in low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. *Phytopathol.* **64**: 1012-1015.
- Mitchell DJ, Zentmyer GA. 1971. Effect of oxygen and carbon dioxide tensions on growth of several species of *Phytophthora*. *Phytopathol.* **61**: 787-791.
- Chakraborty S, Luck J, Hollaway G, Freeman A, Norton R, Garrett KA, et al. 2008. Impacts of global change on diseases of agricultural crops and forest trees. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutr. Nat. Resour.* **3**: 1-15.

7. Percy KE, Awmack CS, Lindroth RL, Kubiske ME, Kopper BJ, Isebrands JG, *et al.* 2002. Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ and O₃. *Nature* **420**: 403-407.
8. Mesarich CH, Stergiopoulos I, Beenen HG, Cordovez V, Guo Y, Jashni MK, *et al.* 2016. A conserved proline residue in dothideomycete Avr4 effector proteins is required to trigger a Cf-4-dependent hypersensitive response. *Mol. Plant Pathol.* **17**: 84-95.
9. Roeschlin RA, Favaro MA, Chiesa MA, Alemano S, Vojnov AA, Castagnaro AP, *et al.* 2017. Resistance to citrus canker induced by a variant of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is associated with a hypersensitive cell death response involving autophagy-associated vacuolar processes. *Mol. Plant Pathol.* **18**: 1267-1281.
10. Hayashi K, Fujita Y, Ashizawa T, Suzuki F, Nagamura Y, Hayano-Saito Y. 2016. Serotonin attenuates biotic stress and leads to lesion browning caused by a hypersensitive response to *Magnaporthe oryzae* penetration in rice. *Plant J.* **2016**: 46-56.
11. Guo A, Salih G, Klessig DF. 2000. Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant J.* **21**: 409-418.
12. Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**: 249-266.
13. Stahl E, Bellwon P, Huber S, Schlaeppi K, Bernsdorff F, Vallat-Michel A, *et al.* 2016. Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. *Molecular Plant.* **9**: 662-681.
14. Niu D, Wang X, Wang Y, Song X, Wang J, Guo J, *et al.* 2016. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through NPR1- and SA-dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **469**: 120-125.
15. Kim DS, Kim NH, Hwang BK. 2015. The *Capsicum annuum* class IV chitinase ChitIV interacts with receptor-like cytoplasmic protein kinase PIK1 to accelerate PIK1-triggered cell death and defence responses. *J. Exp. Bot.* **66**: 1987-1999.
16. Kim NH, Kim DS, Chung EH, Hwang BK. 2014. Pepper suppressor of the G2 Allele of *skp1* interacts with the receptor-like cytoplasmic kinase1 and type III effector AvrBsT and promotes the hypersensitive cell death response in an phosphorylation dependent manner. *Plant Physiol.* **165**: 76-91.
17. Caddell DF, Park C-J, Thomas NC, Canlas PE, Ronald PC. 2017. Silencing of the rice gene *LRR1* compromises rice *Xa21* transcript accumulation and XA21-mediated immunity. *RICE.* **10**: 1-11.
18. Huang L-F, Lin K-H, He S-L, Chen J-L, Jiang J-Z, Chen B-H, *et al.* 2016. Multiple patterns of regulation and overexpression of a ribonuclease-like pathogenesis-related protein gene, *OsPR10a*, conferring disease resistance in rice and *Arabidopsis*. *PLoS One* **11**: 1-27.
19. Qiao Z, Li C-L, Zhang W. 2016. WRKY1 regulates stomatal movement in drought stressed *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **91**: 53-65.
20. Konda AK, Farmer R, Soren KR, S. SP, Setti A. 2017. Structural modelling and molecular dynamics of a multi-stress responsive WRKY TF-DNA complex towards elucidating its role in stress signalling mechanisms in chickpea. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1-13.
21. Park J-H, Park S-J, Kwon O-H, Choi S-Y, Park S-D, Kim J-E. 2015. Effect of mixed treatment of nitrogen fertilizer and zeolite on soil chemical properties and growth of hot pepper. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **48**: 44-49.
22. Minsavage GV, Dahlbeck D, Whalen MC, Kearney B, Bonas U, Staskawicz BJ, *et al.* 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **3**: 41-47.
23. Dangle JL, Jones JDG. 2001. Plant pathogens and intergrated defense response to infection. *Nature* **411**: 826-833.
24. Kobe B, Deisenhofer J. 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 415-421.
25. Jung HW, Hwang BK. 2007. The leucine-rich repeat (LRR) protein, CaLRR1, interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein, CaHIR1, and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 503-514.
26. Hong JK, Hwang IS, Hwang BK. 2017. Functional roles of the pepper leucine-rich repeat protein and its interactions with pathogenesis-related and hypersensitive-induced proteins in plant cell death and immunity. *Planta* **246**: 351-364.
27. Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C, Yu D. 2012. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**: 120-128.
28. Tang M, Lu S, Jing Y, Shou X, Sun J, Shen S. 2005. Isolation and identification of a cold-inducible gene encoding a putative DRE-binding transcription factor from *Festuca arundinacea*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 233-239.
29. Eulgem T. 2006. Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathogens.* **2**: 1028-1030.
30. Oh S-K, Baek K-H, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, *et al.* 2008. *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytol.* **177**: 177-989.
31. Johnson LN, Noble MEM, Owen DJ. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149-158.
32. Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA. 2008. Plant receptor like serine threonine kinase: roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **21**: 507-517.
33. Zhang X, Dai Y, Xiong Y, DeFraia C, Li J, Dong X, *et al.* 2007. Overexpression of *Arabidopsis* MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant J.* **52**: 1066-1079.
34. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, *et al.* 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.
35. Kim DS, Hwang BK. 2011. The pepper receptor-like cytoplasmic protein kinase CaPIK1 is involved in plant signaling of

- defense and cell-death responses. *Plant J.* **66**: 642-655.
36. Leon J, Yalpani N, Raskin I, Lawton MA. 1993. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**: 323-328.
 37. van Loon LC, van Strein EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant P.* **55**: 85-97.
 38. Upadhyay P, Rai A, Kumar R, Singh M, Sinha B. 2014. Differential expression of pathogenesis related protein genes in tomato during inoculation with *A. solani*. *J. Plant Pathol. Microb.* **5**: 217.
 39. Lo S-CC, Hipskind JD, Nicholson RL. 1999. cDNA cloning of sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Collectotrichum sublineolum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 479-489.
 40. Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller TH. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**: 245-264.
 41. Guevara-Morato MA, Lacoba MGd, Garcia-Luque I, Serra MT. 2010. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L³ plants with dual RNase and DNase activities. *J. Exp. Bot.* **61**: 3259-3271.
 42. Park C-J, Kim K-J, Shin R, Park JM, Shin Y-C, Paek K-H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper function as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* **37**: 186-198.
 43. Hwang IS, Choi DS, Kim NH, Kim DS, Hwang BK. 2014. Pathogenesis-related protein 4b interacts with leucine-rich repeat protein 1 to suppress PR4b-triggered cell death and defense response in pepper. *Plant J.* **77**: 521-533.
 44. Hipskind JD, Nicholson RL, Goldsbrough PB. 1996. Isolation of a cDNA encoding a novel leucine-rich repeat motif from *Sorghum bicolor* inoculated with fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 819-825.
 45. Moon J-C, Kim JY, Beak S-B, Kwon Y-U, Song K, Lee B-M. 2014. Transcription factor for gene function analysis in maize. *Korean J. Crop Sci.* **59**: 263-281.
 46. Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199-206.
 47. Oh S-K, Baek K-H, Park JM, Yi SY, Yu SH, Kamoun S, et al. 2008. Capsicum annum WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytol.* **177**: 977-989.
 48. Shiu SH, Bleecker AB. 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**: 530-543.
 49. Shiu SH, Bleecker AB. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10763-10768.
 50. Duner J, Shah J, Klessig DF. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **2**: 226-274.
 51. Ecker JR. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675.
 52. Ziadi A, Poupard P, Brisset MN, Paulin JP, Simoneau P. 2001. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiol. Mol. Plant P.* **59**: 33-43.
 53. Wang CS, Huang JC, Hu JH. 1999. Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Mol. Biol.* **40**: 807-814.
 54. Jones JB, Stall RE, Bouzar H. 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Ann. Rev. Phyto.* **36**: 41-58.
 55. B. Jonesa. J, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System Appl. Microbiol.* **27**: 755-762.
 56. Byeon SE, Abebe AM, Jegal YH, Wai KPP, Siddique MI, Mo HS et al. 2016. Characterization of sources of resistance to bacterial spot in Capsicum peppers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **34**: 779-789.
 57. Shin J-W, Yun S-C. 2010. Elevated CO₂ and temperature effects on the incidence of four major chili pepper diseases. *Plant Pathol. J.* **26**: 178-184.
 58. Silvar C, Merino F, Diaz J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* **165**: 1120-1124.
 59. Liu Z, Shi L, Yang S, Lin Y, Weng Y, Li X, et al. 2017. Functional and promoter analysis of *ChilV3*, a chitinase of pepper plant, in response to *Phytophthora capsici* infection. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1661.
 60. Chakraborty S, Pangga IB, Lupton J, Hart L, Room PM, Yates D. 2000. Production and dispersal of *Collectotrichum gloeosporioides* spores on *Stylosanthes scabra* under elevated CO₂. *Environ. Pollut.* **108**: 381-387.
 61. Hibberd JM, Whitbread R, Farrar JF. 1996. Effect of elevated concentrations of CO₂ on infection of barley by *Erysiphe graminis*. *Physiol. Mol. Plant P.* **48**: 37-53.
 62. Bettarini I, Vaccari FP, Miglietta F. 1998. Elevated CO₂ concentrations and stomatal density observations from 17 plant species growing in a CO₂ spring in central Italy. *Glob. Change Biol.* **4**: 17-22.