

온도변화에 따른 건조 스트레스 환경에서 고추 세균점무늬병 발생 영향

Evaluation of Bacterial Spot Disease of *Capsicum annuum* L. in Drought Stress Environment by High Temperature***Corresponding author**

Tel: +82-64-741-2580

Fax: +82-64-749-2066

E-mail: swkoh@korea.kr

ORCID

https://orcid.org/0000-0003-3695-6322

장종옥¹ · 김병혁^{1,2} · 이중복² · 좌재호³ · 고상욱^{1*}¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소, ²주비에이치앤바이오 생물산업소재개발연구소,³농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소Jong-Ok Jang¹, Byung-Hyuk Kim^{1,2}, Jung-Bok Lee², Jae-Ho Joa³, and Sangwook Koh^{1*}¹Research Institute for Climate Change and Agriculture, NIHHS, RDA, Jeju 63240, Korea²Institute for Development of Bio-industrial Materials, BHN BIO Co., LTD., Gyeongbuk 36729, Korea³Citrus Research Institute, NIHHS, RDA, Jeju 63607, Korea

The global warming by increased CO₂ will effect of plant pathogenic microorganisms and resistance of host plants, and it is expected to affect host-pathogen interactions. This study used *Capsicum annuum* L. and *Xanthomonas euvesicatoria*, a pathogenic bacteria of pepper, to investigate interactions between hosts and pathogens in a complex environment with increased cultivation temperature and drought stress. As a result, the bacterial spot disease of *C. annuum* L. caused by *X. euvesicatoria* was 35°C higher than 25°C. In addition, the effect on water potential on bacterial spot disease was much greater water potential -150 kPa than -30 kPa. The disease progress and severity higher than water potential -30 kPa. This result will useful for understanding interaction with red pepper and *X. euvesicatoria* under the complex environment with increased cultivation temperature and in water potential -150 kPa drought stress in the future.

Keywords: Bacterial spot disease, CO₂, pathogenic bacteria, red pepper, *Xanthomonas euvesicatoria*

Received October 1, 2018

Revised June 5, 2019

Accepted June 11, 2019

서 론

20세기 인류는 산업화에 따른 사회·경제적인 발전을 이루었고, 이는 화석연료의 이용을 통해 가능했다. 화석연료는 제한된 매장지역과 매장량으로 인해 여러 차례 세계경제 위기의 원인으로 지적되었다. 무분별한 화석연료의 사용은 막대한 온실가스를 발생시켜 지구온난화와 같은 다양한 환경문제를 야기했다(Pittman 등, 2011). 대기 중 CO₂ 농도는 1750년 이후 30%

정도 증가하여 현재 400 ppm 이상으로 확인된다. 그러나, RCP (Representative Concentration Pathway) scenario 4.5, 6.0, 8.0에 따르면 2100년 지구 평균 CO₂ 농도는 각각 540 ppm, 670 ppm, 940 ppm이 될 것으로 예측하고 있다(Jones 등, 2016). 미국해양기상청(NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration)은 2015년 3월 지구 CO₂ 농도가 400.83 ppm으로 400 ppm을 넘었다고 발표하였다. 한국은 안면도 기후변화감시소 CO₂ 관측 결과 2012년 399.9 ppm, 2013년 402.9 ppm, 2016년 409 ppm으로 매년 평균 2.09 ppm씩 증가하는 추세를 확인하였다(Korea Meteorological Administration, 2017).

온도는 지리적 분포와 식물의 생존을 결정하는 요인 중 하나이며, 각 식물체는 생장 및 발달에 필요한 최적 온도 범위

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

를 가지고 있으며, 그 한계를 넘으면 고사한다(Xu 등, 2012). 일반적으로 온도 증가는 식물의 생장 기간을 연장시키고, 질소의 무기물화를 증가시켜 수목의 생장을 촉진한다고 알려졌다(Kilpeläinen 등, 2003). 그러나, 온도 상승에 대한 실험적 연구와 모델 연구에 따르면 온난화에 의한 식물의 생장은 수중에 따라 다양한 반응을 보였다(Barber 등, 2000; Danby와 Hik, 2006; Volder 등, 2004).

또한, 온난화는 기온변화 이외에도 토양수분 함량에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 온난화에 대한 식물의 생장 반응이 건조 스트레스에 영향을 주기도 한다(Rustad 등, 2001; Yin 등, 2008). 건조 스트레스는 식물의 생산성을 제한하는 주요 원인으로 뿌리에 공급되는 수분이 부족하거나 증산속도가 빠를 경우 발생한다. 건조스트레스로 인한 식물의 생장 감소는 앞에서의 수분함량과 잎의 수분포텐셜이 감소함에 따라 광합성 속도와 효율이 감소하기 때문에 식물의 생산량 감소로 이어진다(Chaves와 Oliveira, 2004; Lawlor, 2002; Lawlor와 Cornic, 2002; Lawson 등, 2003).

고추(*Capsicum annuum* L.)는 중부아메리카 원산지로 국내는 17세기 초 전래되어 현재까지 재배되는 채소이며 2017년 국내 재배면적 28,337 ha, 생산량 55,714 ton으로 조미채소 중 가장 많은 생산량과 경제적 규모를 가지는 매우 중요한 작물이다(Statistics Korea, 2018). 고추에 세균점무늬병을 일으키는 *Xanthomonas euvesicatoria*는 식물체의 각 부분에 발병하지만 주로 잎에 황녹색의 점무늬를 나타내며 병반이 점차 확대되며 잎 전체가 황화되어 조기 낙엽을 유발한다.

온난화에 따른 기온상승은 식물 병원성 미생물의 발병력과 식물체의 저항성에 영향을 줄 수 있을 것이며, 미생물과 식물체 간의 상호작용에도 영향을 미칠 것으로 예상된다. 온도와 토양 수분은 식물에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 비생물학적 요소이며, 식물병원성 미생물에도 직·간접적인 영향이 보고되었다(Coakley 등, 1999; Manning과 Tiedemann, 1995). 1990년대부터 영국, 미국, 독일을 비롯한 많은 나라에서 CO₂ 증가와 병원성 미생물에 대한 연구를 보고하였으나 복합적 비생물학적 요인에 기인한 병원균과 식물병간 상관성에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다(Chakraborty 등, 2008; Mitchell과 Zentmyer, 1971; Percy 등, 2002).

본 연구는 고온과 건조가 지속되는 복합 환경에서 고추 병원균과 식물간의 상호작용을 확인하고자 하였다. 고추와 고추 세균점무늬병 병원균 *X. euvesicatoria*를 이용하였으며, 각각의 환경에 따른 고추 내의 병저항성 관련 유전자의 발현양상을 quantitative Real-time PCR로 분석하였다. 본 연구를 통해 미래의 변화된 환경에서 한국의 주요 경제작물인 고추와 고추의

주요피해 병원균인 *X. euvesicatoria*의 발병양상을 이해하는데 필요한 기초자료를 제공할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

식물 및 미생물. 본 실험에서 사용한 고추(*Capsicum annuum* L.)는 N사의 천년약속고추 종자를 구입하여 사용하였다. 각 종자는 유리온실 내에서 육묘용 상토가 담긴 72공 포트에 파종 후 25°C, 매일 수분을 충분히 공급하여 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 이를 사용하였다.

병원균 접종 및 고추의 생장 조건. 병원균은 6주 된 천년약속고추에 접종하였다. *X. euvesicatoria*는 TSB (Tryptic Soy Broth) 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 최종 병원균의 양은 TSB배양액으로부터 원심분리한 후 상등액을 제거하고, DW로 세척하여 10⁸ cfu/ml이 되게 희석한 후 분무기를 이용하여 식물체에 접종하였다. 각 pot의 배양조건은 온도는 25°C, 30°C와 35°C로 유지하고, 토양 수분 조건은 -30 kPa와 -150 kPa로 유지시켰으며 시험구 식물체는 20개로 각 조건별 3반복하여 배양하였다. CO₂의 농도는 각각 400 ppm이 유지되는 생장상에서 L/D cycle은 16/8, 광량은 400 μmol/m²/s'로 실험을 수행하였다. 또한 생장상의 병 접종 후 24시간 뒤 유전자 분석을 위한 시료를 채취하였다. 토양수분측정은 적외선수분 측정기(MS-70)를 이용하여 측정하였으며, 모든 실험은 온도, 습도, 광원의 세기 및 CO₂ 농도가 자동 조절되는 배양챔버(2 m × 2.5 m × 2 m)에서 식물체를 배양하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성. *X. euvesicatoria* 접종 24시간 후 고추 잎을 액체 질소에 얼려 분쇄한 후, RNeasy® Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)으로 정량하였다. cDNA합성은 1 μg의 RNA와 1 ul oligo dT (100 pmol/L)를 혼합 후, DEPC-treated distilled water로 전체 부피를 16 ul로 맞춘 뒤, 70°C에서 5분간 처리하였다. 이후, 5X reverse transcription master mix (Biofact)를 4 ul 첨가하고, 42°C에서 90분, 94°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)에 의한 병 관련 유전자 분석. 병 관련 유전자 분석을 위한 primer는 NCBI에 등록되어 있는 유전정보를 활용하여 primer3 (<http://>

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

Gene	Type of primer	Sequence (5'-3')	product size (bp)	Annealing temp.	GenBank.	Detection organisms
<i>xopP</i>	F	ATTCTCGTGTCTTCGACGTTGTC	208	67.9	AY756270	<i>X. euvesicatoria</i>
	R	GAAGTATTGAGCAAGGCCTCATCC				
<i>CaLRR1</i>	F	ATGAGGTTTCATTGCCCTGG	594	64.2°C	AY237117	<i>C. annuum</i> . L
	R	CTAGGCTTTCATGTCTTGGAC				
<i>CaPIK1</i>	F	GGCTCTTGGTTCCTGGAAGATCATCTA	285	62.6°C	GU295436	<i>C. annuum</i> . L
	R	GCACAGTATCCATATGTACCCATCACTCTG				
<i>CaPR10</i>	F	ATGGGTGCTTATACCTTTACTGAC	481	62.6°C	DQ351935	<i>C. annuum</i> . L
	R	TAAACATAGACAGAAGGATTGG				
<i>CaWRKY1</i>	F	CAACAAGATCCGACACTCATACCC	369	64.0°C	EF468464	<i>C. annuum</i> . L
	R	CAGGAATCAGAATGGGGATAGACC				

primer3.ut.ee/)를 이용하여 설계하였다(Table 1). qRT-PCR 분석을 위한 standard clone은 설계된 primer를 이용하여 PCR한 후, 각각 PCR 산물을 All-in-one vector (Biofact)에 cloning한 후, plasmid DNA는 HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit (Biofact)를 이용하여 추출하여 염기서열을 결정하였다. 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)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)과 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)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 fluorescence intensity를 측정하고 45 cycles을 수행하였다. *CaLRR1*, *CaPIK1*, *CaPR10*, *CaWRKY1* 유전자의 annealing 값은 각각 64.2°C, 62.6°C, 62.6°C 및 64.0°C이다. Final extension은 72°C에서 5 min 동안 수행하였다. Melting curve 분석은 65°C부터 95°C까지 0.2°C씩 증가시키면서 fluorescence를 측정하였다.

각 유전자의 발현 양은 qRT-PCR을 수행하여 분석하였다. 정량을 위한 표준 유전자를 1 ng/ul부터 serial dilution하여 qRT-PCR을 3반복 수행하였으며, 분석하고자 하는 DNA 농도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)을 이용하여 1 ng/ul

를 분석에 이용하였다(Kim 등, 2017).

Total DNA 추출 및 *X. euvesicatoria* 정량. Total DNA는 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio)를 이용하여 추출하였으며, 추출된 DNA의 농도 및 순도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)을 이용하여 확인하였다. *X. euvesicatoria* 정량을 위해 *X. euvesicatoria*의 *xopP* gene (AY756270)을 이용하여 primer를 제작하여 probe로 확인하였다(Table 1)(Jang 등, 2018).

발병 조사. 온도 증가에 따른 따른 고추 세균점무늬병의 발병 양상을 확인하기 위해 *X. euvesicatoria*를 접종 후 7일 뒤 발병도를 확인하였다. 또한, 발병도 조사를 위한 시료는 각각 20 개체 반복 수행하였다. 발병률은 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(Jang 등, 2018).

통계분석. 모든 실험은 최소 3회 반복하여 진행하였으며, 각 시료들의 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 실험 결과의 통계적 유의성 검토는 대조구와 비교하여 student's t에 의해 판정하였다. F값이 0.1 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 토의

식물의 온도와 토양 수분 복합스트레스의 영향 및 발병양상. 온난화로 인한 작물 재배지의 온도 상승과 강수량 변화에

따라 식물의 생장에 영향이 있으며, 이에 따른 온도 증가 환경에서 식물체 병 저항성과 연관성이 보고되었다 (Jang 등, 2018). 따라서 미래의 온도 증가 환경에서 고추 세균점무늬병의 발병과 이에 따른 식물체의 병 저항성 관련 유전자의 발현양상을 확인하고자 하였다. 현재 대기중 CO₂ 농도 400 ppm에서 25°C, 30°C, 35°C의 성장상에서 연구를 수행하였다.

고추에 세균점무늬병원균인 *X. euvesicatoria*를 접종하고, 7일 후 고추는 성장 적합환경인 -30 kPa에서 고추 성장이 저해되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 온도가 증가함에 따라 성장 속도가 증가하는데, 30°C의 고추 잎이 35°C 고추 잎보다 큰 것을 확인하였다. 그러나 건조 스트레스 환경인 -150 kPa에서 고추의 성장은 둔화되는 것을 확인하였고, 35°C 조건에서는 고사되는 것을 확인했다(Fig. 1). 온도 증가는 식물 생리작용에 영향을 주며, 다양한 반응을 유발한다고 보고되었다(Danby와 Hik, 2006; Kilpeläinen 등, 2003; Volder 등, 2004; Yin 등, 2008). 고추는 24시간 평균 온도가 24°C 이상으로 높아질 경우 호흡량이 증가하여 낙화 및 낙과율이 높아져 성장이 저해된다고 알려져 있다. 그리고, 동일한 온도에서 모두 건조 스트레스 환경에서 식물체의 성장이 더욱 저해되는 것을 확인하였다. 이를 통해 고추의 성장에 있어서 온도보다 토양 수분 함수량의 영향이 더 크다는 것을 알 수 있다.

또한, 고추의 성장 조건에 따라 세균점무늬병원균인 *X. euvesicatoria*를 접종하고 7일 후 발병도를 확인한 결과는 Fig. 2와 Supplementary Table 1과 같다. -30 kPa 토양 수분포텐셜의 고추의 세균점무늬병 발병도는 25°C에서 13%, 30°C에서 17%, 35°C에서 30%로 발병도가 증가하며, 온도가 증가할수록 발병률도 증가하는 것을 확인하였다. 그리고, 각 25°C ~ 30°C, 30°C ~ 35°C의 온도구간별 발병도는 각각 4%와 13%로 온도가 높아질수록 증가폭이 상승하였다. 그리고, -150 kPa 토양 수분포텐셜의 고추의 세균점무늬병 발병도는 25°C에서 20%, 30°C에서 23%, 35°C에서 63%로 발병률이 매우 높게 증가하는 것으로 확인되었다. 또한, 각 25°C ~ 30°C와 30°C ~ 35°C의 온도구간별 발병도는 각각 3%와 40%로 나타났으며, 온도증가가 세균점무늬병의 발병률을 증가시키는 것을 확인하였다. 그리고, 동일한 온도 조건에서도 건조 스트레스를 받으면 세균점무늬병의 발병률이 증가하였다. 복합스트레스 환경조건에서 30°C에서 증가율은 4%에 그쳤으나, 고온 스트레스환경에서 발병 증가율은 13%인 것에 비해, 복합스트레스 환경인 35°C의 건조스트레스 환경에서는 40%의 발병률로 증가율이 매우 높아진다는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 온도에 따른 건조 스트레스인 복합환경조건에서 발병률을 조사한 후 각 점들간의 추세선을 구했다(Fig. 3). -30 kPa 토양

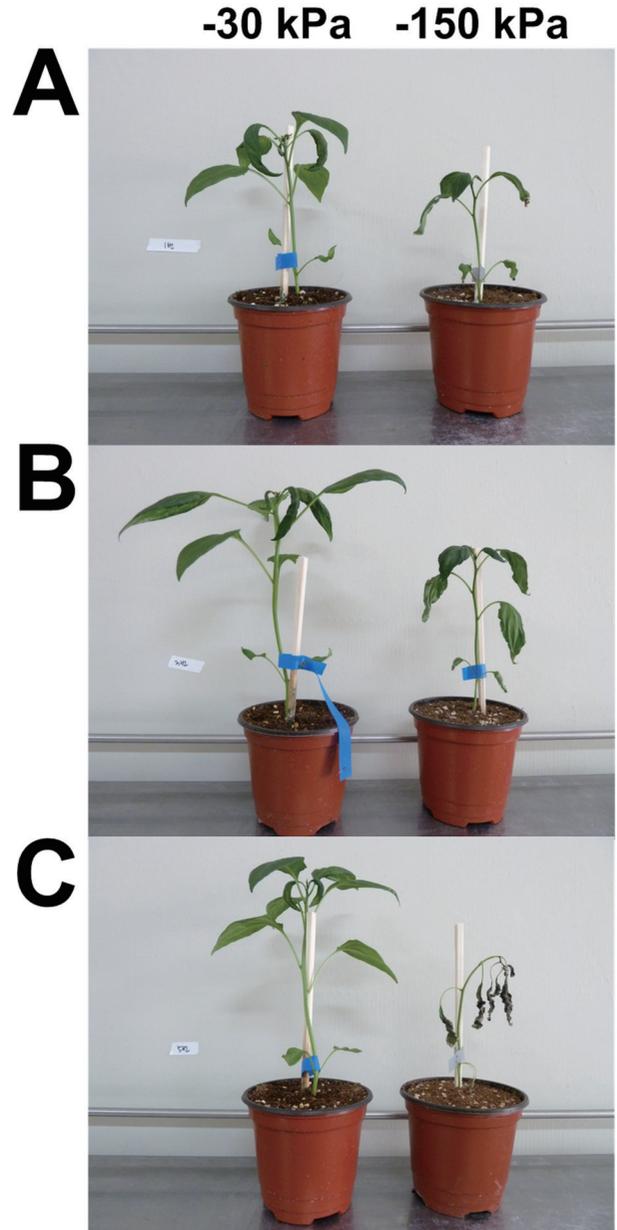


Fig. 1. Comparison of red pepper grown under different temperatures and water conditions. Photographics were taken 7 days after combined drought stress and inoculation of *X. euvesicatoria*. A; 25°C, B; 30°C, C; 35°C.

수분포텐셜 조건에서 온도가 증가함에 따라 발생하는 세균점무늬병의 기율기보다 -150 kPa 토양 수분포텐셜 건조 스트레스 조건에서 온도가 증가함에 따라 발생하는 세균점무늬병의 기율기가 더욱 큰 것을 확인하였다. 이를 통해 향후 지구 온난화 환경에서 고추 세균점무늬병의 발병은 온도에 의한 영향보다는 토양 수분포텐셜에 의한 영향이 더 크다는 것을 추론할 수 있다. 한국에서 고추세균성점무늬병 연구는 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 관한 연구가 활발히 진행되었으며, *X. euvesicatoria* 연구는 2010년경 시

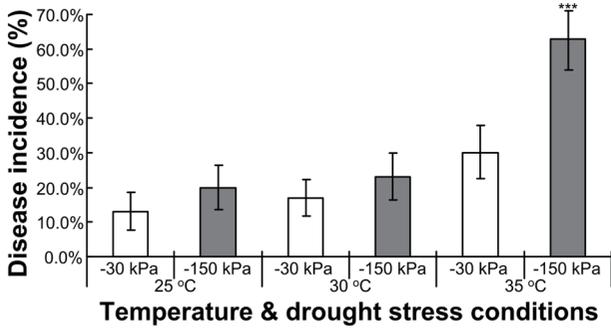


Fig. 2. Effect of water stress on disease incidence and severity by *X. euvesicatoria*. **, <0.05, ***, <0.01.

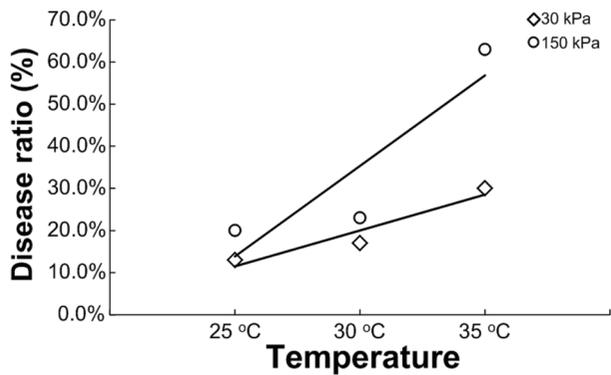


Fig. 3. The disease rate of *Capsicum annuum* L. according to the temperature and water stress.

작하여 연구 결과가 부족한 상황이나, *X. campestris* pv. *vesicatoria*는 온도와 CO₂ 증가와 같은 복합스트레스 환경에서 발병률간에 연관성을 주장하였으며, 본 연구와 유사한 것을 확인할 수 있다(Shin과 Yun, 2010). 현재까지 지구온난화에 의한 병원성 미생물과 식물간 상호작용 연구는 두 가지 관점에서 연구되었다. 먼저, CO₂의 증가에 의한 식물 병원성 미생물의 변화를 연구하였다. *Erysiphe graminis*는 보리흰가루병원균으로 350 ppm 보다 700 ppm의 CO₂에서 생장률이 높아졌으며(Hibberd 등, 1996), *Stylosanthes scabra*의 탄저병원균인 *Collectotrichum gloeosporioides*는 높은 CO₂ 농도에서 초기 생장이 지연되나 콜로니가 형성되면 빠르게 생장률이 높아진다고 보고되었다(Chakraborty 등, 2000). 다른 하나로 CO₂ 증가에 따른 식물의 변화로 인해 병원성 미생물에 대한 저항성의 변화를 규명하려는 연구가 진행되었다. CO₂ 700 ppm이 된 환경에서 식물의 defense structure인 papilla 형성 및 기공 밀도 감소에 의한 병원체의 침입 방지는 식물체의 내성 증가와 상관관계가 매우 높다고 보고되었다(Bettarini 등, 1998). 그러나, CO₂ 농도 증가는 식물병원체와 식물체에 다양한 변화를 준다는 것을 의미하며, 결론적으로 환경 요인이 어느 쪽으로 더 유리하게 작용하는가에 따라 결과가 달라질 수 있다는 것을 추측할 수 있다.

복합스트레스 환경에서의 고추 세균점무늬병원균의 정량분석. 대기 중 온도 증가로 인한 환경에서 토양 수분포텐셜 -30 kPa와 -150 kPa에서 *X. euvesicatoria*를 접종하고 24시간 후 시료를 채취하여 *X. euvesicatoria*의 *xopP* gene (Fig. 4)과 고추의 병 저항성 유전자(*CaLRR1*, *CaPIK1*, *CaPR10*, *CaWRKY1*)의 발현양상을 정량 분석하였다(Fig. 5).

고추 세균점무늬병원균인 *X. euvesicatoria*를 접종 후 초기량은 토양 수분포텐셜 -30 kPa과 -150 kPa에서 $2.29 \times 10^5 \pm 9.26 \times 10^3$ molecule-copy/mg 와 $2.21 \times 10^5 \pm 2.82 \times 10^3$ molecule-copy/mg로 정량되었다(data not shown). 접종 24시간 후 처리구별로 *xopP* gene을 정량하였으며, 토양 수분포텐셜 -30 kPa 조건하 25°C, 30°C와 35°C에서 *X. euvesicatoria*는 $3.39 \times 10^5 \pm 1.09 \times 10^4$ molecule-copy/mg, $5.51 \times 10^5 \pm 3.02 \times 10^4$ molecule-copy/mg, $4.32 \times 10^3 \pm 4.76 \times 10^3$ molecule-copy/mg로 확인되었다. 또한, 건조조건인 토양 수분포텐셜 -150 kPa 조건하 25°C, 30°C와 35°C에서 *X. euvesicatoria*는 $3.94 \times 10^5 \pm 1.29 \times 10^4$ molecule-copy/mg, $4.19 \times 10^5 \pm 8.06 \times 10^3$ molecule-copy/mg, $2.07 \times 10^5 \pm 1.64 \times 10^4$ molecule-copy/mg로 각각 분석되었다 (Fig. 3).

토양 수분포텐셜 -30 kPa에서의 *X. euvesicatoria*의 성장은 4.0×10^5 molecule-copy/mg 수준에서 유지되었으며, 30°C에서 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, 25°C와 30°C 처리구에서 *X. euvesicatoria*의 증가에 따른 고추 세균점무늬병의 발병률의 증가는 4%로 낮은 수치를 보였다(Supplementary Table 1). 하지만, 35°C에서 *X. euvesicatoria*는 4.0×10^5 molecule-copy/mg 수준을 유지하였으나, 고추 세균점무늬병의 발병률은 30%로 증가되었으며, 발병률 변화는 25°C보다 17% 높아진 것을 확인하였다. 그리고, 토양 수분포텐셜 -150 kPa에서의 *X. euvesicatoria*의 성장은 25°C와 30°C 조건에서 4.0×10^5 molecule-copy/mg 수준에서 유지되었으며, 35°C에서 2.0×10^5 molecule-copy/mg

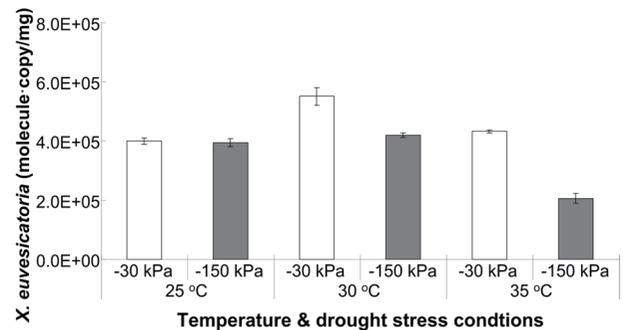


Fig. 4. Quantification of *X. euvesicatoria* under different temperatures and water conditions by the Real-Time PCR. The real time PCR was taken 24 hr after combined drought stress and inoculation of *X. euvesicatoria*.

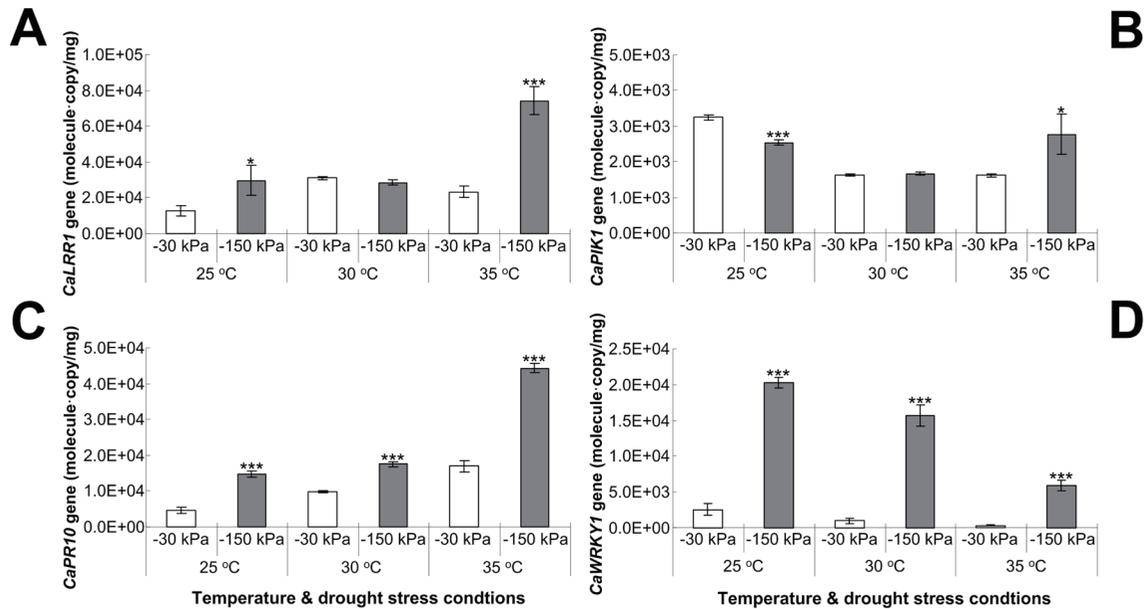


Fig. 5. Expression of disease resistance gene *CaLRR1* (A), *CaPIK1* (B), *CaPR10* (C), and *CaWRKY1* (D) in *C. annuum* L. by *X. euvesicatoria*. The qRT-PCR was taken 24 hr after combined drought stress and inoculation of *X. euvesicatoria*. *, <0.1, **, <0.05, ***, <0.01.

수준으로 감소되었다. 건조 스트레스환경에서 *X. euvesicatoria*에 개체수에 따른 고추 세균점무늬병의 발병은 25°C와 30°C 조건에서 20% 정도로 비슷한 발병률을 확인하였다. 그러나 매우 특이적으로 35°C 조건에서 *X. euvesicatoria*에 개체수가 감소되나 고추 세균점무늬병의 발병률은 63%로 3배정도 증가하는 것을 확인하였다. 위 결과를 통해 *X. euvesicatoria*의 성장은 온도보다 토양 수분포텐셜이 더 크게 영향을 미치는 것을 확인하였다(Fig. 3, Supplementary Table 1). 그리고, *X. euvesicatoria*의 개체수와 고추 세균점무늬병의 발병관계가 비례관계에 있지 않음을 확인하였으며, 고추 세균점무늬병의 발병은 *X. euvesicatoria*의 개체수보다 배양 환경이 더 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 이것은 온도 증가에 따른 고온 및 건조스트레스 조건에서 *X. euvesicatoria* 내의 발병 관련 유전자가 과발현되거나 비생물학적 요인에 의해 고추 세균점무늬병 발병률이 증가한다는 가능성을 추측할 수 있다.

복합스트레스 환경에서의 식물체 내 식물병 관련 유전자의 정량분석. -30 kPa의 온도 25°C, 30°C, 35°C에서 *CaLRR1* 유전자 발현량은 1.29×10^4 molecule-copy/mg, 3.09×10^4 molecule-copy/mg, 2.33×10^4 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다. 그리고, 건조스트레스 조건인 -150 kPa에서 온도에 따른 유전자의 발현량은 2.96×10^4 molecule-copy/mg, 2.86×10^4 molecule-copy/mg, 7.41×10^4 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다(Fig. 5A, Supplementary Table 2). *CaLRR1* 유전자 발현은 35°C와 토양 수분포텐셜 -150 kPa 환경에서 가장 높

게 발현되는 것을 확인하였다. 또한 같은 온도의 -30 kPa환경에서 *CaLRR1* 유전자 발현은 다른 온도조건인 25°C, 30°C, 35°C에서 발현량과 유사한 것을 확인하였다. 이것은 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 의한 고추에서의 *CaLRR1* 유전자의 발현 연구에서 병원성 박테리아에 의한 식물체의 감염이 *LRR* 유전자의 발현에 관여한다고 보고된 결과와 유사하였으며(Hipskind 등, 1996), 고온 건조한 환경에서 *X. euvesicatoria*를 접종 시 *CaLRR1*의 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

또한, *CaPIK1* 유전자 발현 양상을 확인한 결과, -30 kPa의 온도 25°C, 30°C, 35°C에서 *CaPIK1* 유전자 발현량은 3.24×10^3 molecule-copy/mg, 1.63×10^3 molecule-copy/mg, 1.61×10^3 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다. 그리고, 건조스트레스 조건인 -150 kPa에서 온도에 따른 유전자의 발현량은 각 온도당 2.54×10^3 molecule-copy/mg, 1.67×10^3 molecule-copy/mg, 2.77×10^3 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다(Fig. 5B, Supplementary Table 2). *CaPIK1*은 receptor-like cytoplasmic protein kinase (RLCK)와 높은 유사성이 확인되었으며, 식물에서만 확인되는 단백질로 알려져 있다(Shiu와 Bleecker, 2001, 2003). 최근 보고에 따르면 *X. campestris* pv. *vesicatoria*에 의해 감염 초기 단계의 고추에서 높은 수준의 *CaPIK1* 유전자가 발현되었으며, 이것은 *CaPIK1*단백질이 병원균 침입에 대한 고추 식물의 방어 반응과 상관관계가 매우 높은 것을 알 수 있다(Kim과 Hwang, 2011).

복합 환경스트레스에 따른 *CaPR10* 유전자의 발현 양상을 분석하였다(Fig 4C, Supplementary Table 2). 토양 수분포텐셜

-30 kPa의 25°C, 30°C, 35°C 환경에서 *CaPR10* 유전자 발현량은 4.63×10^3 molecule-copy/mg, 9.90×10^3 molecule-copy/mg, 1.69×10^4 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다. 그리고, 토양 수분포텐셜 -150 kPa에서 온도에 따른 유전자의 발현량은 1.47×10^4 molecule-copy/mg, 1.76×10^4 molecule-copy/mg, 4.43×10^4 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다(Fig 5C, Supplementary Table 2). 고추의 *CaPR10* 유전자 발현은 모든 온도조건에서 -30 kPa 보다 -150 kPa에서 최소 1.77배에서 3.18배 이상 높게 발현되는 것을 확인하였다. *PR10* 유전자는 유도성 방어 유전자로서 salicylic acid와 ethylene과 같은 저분자 물질 또는 암(dark) 상태나 가뭄의 환경적 스트레스에 의해서 유도가 된다고 보고되었다(Durner 등, 1997; Ecker, 1995; Wang 등, 1999; Ziadi 등, 2001).

WRKY 단백질은 노화 및 병원성미생물로부터 방어기작에 관여하며, 생물학적 또는 비생물학적으로 조절되는 단백질로서 *Arabidopsis*에서 100여 개가 발견되는 superfamily에 속한다(Eulgem 등, 2000; Jang 등, 2018). 이에 본 연구에서 복합 환경스트레스에 따른 *CaWRK1* 유전자의 발현 양상을 분석하였다(Fig 5D, Supplementary Table 2). 토양 수분포텐셜 -30 kPa의 25°C, 30°C, 35°C 환경에서 *CaWRK1* 유전자 발현량은 2.55×10^3 molecule-copy/mg, 9.64×10^2 molecule-copy/mg, 3.52×10^2 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다. 그리고, 토양 수분포텐셜 -150 kPa에서 온도에 따른 유전자의 발현량은 2.03×10^4 molecule-copy/mg, 1.56×10^4 molecule-copy/mg, 5.96×10^3 molecule-copy/mg 로 각각 확인되었다. 수분 스트레스 환경에서 *CaWRK1* 유전자 발현량은 25°C에서 7.95배, 30°C와 35°C에서 16.02배와 16.91배 높게 발현되는 것을 정량 분석을 통해 확인하였다. 수분스트레스 환경에서 방어기작 유전자인 *CaWRK1* gene은 -30 kPa보다 -150 kPa에서 더 높게 발현되었으며, 이것은 세균점무늬병의 병원성균인 *X. euvesicatoria*이 강하게 작용하거나 비생물학적 요인에 의한 것이라 추론할 수 있다.

식물의 방어유전자는 성장과 대사과정에서 up-regulation 또는 down-regulation된다. *CaWRK1* 단백질이 과발현된 담배 식물체가 담배 모자이크 바이러스에 감염되었을 때 대조군보다 더 광범위한 괴사 증상을 보인 결과가 보고되었다(Oh 등, 2008). 본 연구를 통해 *X. euvesicatoria*의 병원성 영향력은 토양 수분포텐셜 -30 kPa 환경보다 건조스트레스 환경인 토양 수분포텐셜 -150 kPa에서 더 큰 영향을 준다고 판단되며, 복합 스트레스 환경에서는 온도보다는 토양 수분포텐셜이 더 큰 영향력을 보이는 것을 확인하였다. 그러나, 병원성 미생물과 CO₂ 증가가 동시에 작용하는 복합스트레스 환경에 따른 식물의 상호작용 연구에서 환경요인이 비생물학적 요인과 생물학적 요인

중 어느 쪽으로 더 유리하게 작용하는가에 따라 결과가 달라질 수 있다고 보고하고 있으며(Bettarini 등, 1998; Chakraborty 등, 2000; Hibberd 등, 1996), 본 연구결과에서는 수분 스트레스 환경에서 저항성 유전자가 강하게 증가하는 것을 확인하였는데 이는 생물학적 요소에 의해 증가되기도 하지만, 비생물학적 요인에 의해서도 증가할 수도 있다고 판단된다. 또한, 본 연구와 같은 복합스트레스 환경에서 *CaLRR1*, *CaPIK1*, *CaPR10*, *CaWRK1*와 같은 유전자 연구는 매우 부족한 상황으로 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단되며, 본 연구와 같이 저항성 유전자의 발현이 증가함에도 발병도가 증가하지만, 비생물학적 요인이나 생물학적 요인이 보다 강하게 작용하였을 가능성을 생각할 수 있을 것이다. 향후 보다 심도 깊은 연구가 진행될 필요성이 있으며, 본 연구는 이에 대응하기 위한 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구는 온난화가 가속화된 환경에서 온도와 수분의 복합적인 스트레스에 의한 환경에서 고추세균점무늬병의 발병양상을 조사하였으며, 온도에 의한 발병률보다 토양의 수분함량에 의해 세균점무늬병 발병률이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 온난화에 의한 1차적인 온도상승보다 2차적인 건조 스트레스에 따라 세균점무늬병의 발병률에 더 큰 영향을 주며, 온난화가속에 따라 작물의 건조스트레스를 피하여 고추세균점무늬병의 피해를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgements

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.

References

- Barber, V. A., Juday, G. P. and Finney, B. P. 2000. Reduced growth of Alaskan white spruce in the twentieth century from temperature-induced drought stress. *Nature* 405: 668-673.
- Bettarini, I., Vaccari, F. P. and Miglietta, F. 1998. Elevated CO₂ concen-

- trations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO₂ spring in central Italy. *Glob. Chang. Biol.* 4: 17-22.
- Chakraborty, S., Pangga, I. B., Lupton, J., Hart, L., Room, P. M. and Yates, D. 2000. Production and dispersal of *Colletotrichum gloeosporioides* spores on *Stylosanthes scabra* under elevated CO₂. *Environ. Pollut.* 108: 381-387.
- Chakraborty, S., Luck, J., Hollaway, G., Freeman, A., Norton, R., Garrett, K. A. et al. 2008. Impacts of global change on diseases of agricultural crops and forest trees. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 3: 054.
- Chaves, M. M. and Oliveira, M. M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55: 2365-2384.
- Coakley, S. M., Scherm, H. and Chakraborty, S. 1999. Climate change and plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 399-426.
- Danby, R. K. and Hik, D. S. 2006. Responses of white spruce (*Picea glauca*) to experimental warming at a subarctic alpine treeline. *Glob. Chang. Biol.* 13: 437-451.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D. F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 226-274.
- Ecker, J. R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667-675.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. and Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199-206.
- Hibberd, J. M., Whitbread, R. and Farrar, J. F. 1996. Effect of elevated concentrations of CO₂ on infection of barley by *Erysiphe graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 37-53.
- Hipskind, J. D., Nicholson, R. L. and Goldsbrough, P. B. 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.
- Jang, J.-O., Kim, B.-H., Moon, D.-G., Koh, S. and Joa, J.-H. 2018. Analysis of bacterial spot disease in red pepper caused by increase of CO₂ concentration. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 46: 77-84.
- 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. Clim.* 26: 4398-4413.
- Kilpeläinen, A., Peltola, H., Ryyppö, A., Sauvala, K., Laitinen, K. and Kellomäki, S. 2003. Wood properties of Scots pines (*Pinus sylvestris*) grown at elevated temperature and carbon dioxide concentration. *Tree Physiol.* 23: 889-897.
- Kim, D. S. and Hwang, B. K. 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.
- Kim, B.-H., Jang, J.-O., Kang, Z., Joa, J. H. and Moon, D.-G. 2017. The microbial diversity analysis of the Korea traditional post-fermented tea (Chungtaejeon). *Korean J. Microbiol.* 53: 170-179.
- Korea Meteorological Administration. 2017. Report of global atmosphere watch 2016. Korea Meteorological Administration, Seoul, Korea. 235 pp (in Korean).
- Lawlor, D. W. 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* 89: 871-885.
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25: 275-294.
- Lawson, T., Oxborough, K., Morison, J. I. and Baker, N. R. 2003. The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in arrange of species are similar. *J. Exp. Bot.* 54: 1743-1752.
- Manning, W. J. and Tiedemann, A. V. 1995. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ. Pollut.* 88: 219-245.
- Mitchell, D. J. and Zentmyer, G. A. 1971. Effect of oxygen and carbon dioxide tensions on growth of several species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 61: 787-791.
- Oh, S. K., Baek, K. H., Park, J. M., Yi, S. Y., Yu, S. H., Kamoun, S. et al. 2008. *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytol.* 177: 977-989.
- Percy, K. E., Awmack, C. S., Lindroth, R. L., Kubiske, M. E., Kopper, B. J., Isebrands, J. G. et al. 2002. Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ and O₃. *Nature* 420: 403-407.
- Pittman, J. K., Dean, A. P. and Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* 102: 17-25.
- Rustad, L., Campbell, J., Marion, G., Norby, R., Mitchell, M., Hartley, A. et al. 2001. A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia* 126: 543-562.
- Shin, J.-W. and Yun, S.-C. 2010. Elevated CO₂ and temperature effects on the incidence of four major chili pepper diseases. *Plant Pathol. J.* 26: 178-184.
- Shiu, S. H. and Bleecker, A. B. 2001. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 10763-10768.
- Shiu, S. H. and Bleecker, A. B. 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 530-543.
- Statistics Korea. 2018. Crop production statistics 2017. Statistics Korea, Daejeon, Korea. 185 pp (in Korean).
- Volder, A., Edwards, E. J., Evans, J. R., Robertson, B. C., Schortemeyer, M. and Gifford, R. M. 2004. Does greater night-time, rather than constant, warming alter growth of managed pasture under under ambient and elevated atmospheric CO₂? *New Phytol.* 162: 397-411.
- Wang, C. S., Huang, J. C. and Hu, J. H. 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.
- Xu, Z., Hu, T. and Zhang, Y. 2012. Effects of experimental warming on phenology, growth and gas exchange of treeline birch (*Betula utilis*) saplings, Eastern Tibetan Plateau, China. *Eur. J. For. Res.* 131: 811-819.
- Yin, H. J., Liu, Q. and Lai, T. 2008. Warming effects on growth and physiology in the seedlings of the two conifers *Picea asperata* and *Abies faxoniana* under two contrasting light conditions. *Ecol. Res.* 23: 459-469.
- Ziadi, S., Poupard, P., Brisset, M. N., Paulin, J. P. and 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 Pathol.* 59: 33-43.