

최종
연구보고서

유전공학기법을 통한 고추역병 저항성 품종 개발

Development of Red Pepper Cultivar Resistant to *Phytophthora* blight through Genetic Engineering

고추 역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발
Development of Specific Promoter to *Phytophthora* blight and HR-Inducing Elicitin

고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메카니즘
Phytoalexin Biosynthesis and the Resistance Mechanism to *Phytophthora* blight in Red Pepper

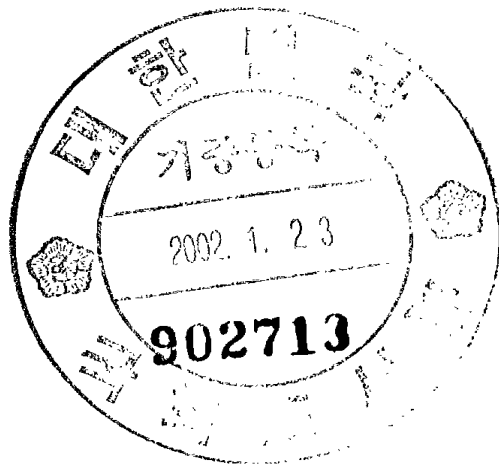
고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색
Identification of Phytoalexin Related to Defence in Red Pepper

고추 역병저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정
Development of Transgenic Red Pepper Plant Resistant to *Phytophthora* blight

연구기관

경북대학교
안동대학교
영양고추시험장

농림부



최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 유전공학기법을 통한 고추역병 저항성 품종 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001 년 10 월 일

주관연구기관 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 신 동 현 (인)

주관연구기관장 : 경북대학교 총장

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전공학기법을 통한 고추역병 저항성 품종 개발” 과제 (“고추 역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발”, “고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메카니즘”, “고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색”, “고추 역병 저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정”)의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 일

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 신 동 현

세부연구책임자 : 김 길 웅

연 구 원 : 이 인 중

연 구 원 : 김 학 윤

연 구 원 : 윤 용 휘

연 구 원 : 이 정 훈

협동연구기관명 : 안동대학교

협동연구책임자 : 정 형 진

협동연구기관명 : 영양고추시험장

협동연구책임자 : 허 봉 구

여 백

요 약 문

I. 제 목

유전공학기법을 통한 고추역병 저항성 품종 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

고추는 우리나라 농가의 가장 보편적인 소득작목이고 양념채소로서 그 비중이 매우 높으며 식품가공산업에도 많이 이용되는 주요작물로 간주되고 있으나, 고추재배시에 역병의 피해로 생산이 불안정하여 가격파동이 반복되고 있다.

고추의 역병은 *Phytophthora capsici*의 감염으로 발생하며 많은 고추재배지에서 가장 큰 피해를 일으키는 토양전염병으로 알려져 있으며 (Barksdale et al. 1984; Leonian, 1992; Kim et al. 1989) 살균제의 처리로 효과적으로 방제가 되지 않기 때문에 저항성품종을 육성하여 사용하던지 아니면 윤작에 의해 그 피해를 줄이고 있다 (Bruin and Edgington, 1981; Davidse, 1981; Shew, 1985; Sung and Hwang, 1988; Kim et al. 1989). 고추역병 저항성은 1960년 Kimble and Grogan에 의해 보고되었으며 두 개의 우성유전자가 독립적으로 작용하는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 이러한 저항성품종도 병원균의 감염기간이 길어지거나 농도가 높아지면 병해증상을 나타내기 때문에 안정하고 지속적인 저항성 개발에 많은 연구가 절실히 요구되며, 고추재배에서 가장 시급히 해결해야 할 연구분야로 생각된다. 이와 같이 재래육종방법에 의한 저항성품종 개발은 한계가 있기 때문에 생명공학기법을 이용하여 고추역병균의 침입시에 자기방어기작

을 지닌 역병 저항성 신기능 고추품종 개발의 중요성과 필요성이 절실히 요구되고 있다.

생명공학의 농업적 이용의 궁극적인 목적은 이와 같이 클로닝된 저항성유전자를 이용하여 실용 가능한 식물체의 육성이기 때문에 현재까지 여러 연구자들에 의해서 클로닝된 저항성유전자를 CaMV 35S promoter와 연결하여 형질전환체를 만들어 식물체의 저항성을 증대시키는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 35S promoter의 경우 형질전환체의 전생육기간 동안 병원균의 감염유무에 관계없이 저항성유전자를 작동시켜 식물체내의 에너지대사의 불균형 및 종자의 발아시나 생육초기에 hypersensitive response (HR)로 인해 식물이 고사하게 된다 (Honee et al., 1995). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 형질전환체의 도입유전자의 형질 발현을 적절히 조절해 줄 수 있는 특이적 promoter의 개발이 선행되어야 한다. 따라서 특정유전자의 specific promoter 개발은 생명공학의 효율적인 농업적 이용을 위해서 유전공학연구에서 가장 시급히 이루어져야 하는 필수불가결한 분야로 대두되고 있다.

따라서 역병균의 침입시에만 작동하는 specific promoter에 HR이나 SAR을 유도하는 elicitor gene을 붙여서 고추의 형질전환체를 만들면 고추재배에서 가장 문제시되는 고추역병 저항성 신기능 식물의 육성이 가능하리라 사료된다.

본 연구의 목표는 고추가 역병균에 감염되었을 때 hypersensitive response 등으로 병원균의 체내로 전염이나 확산을 막을 수 있는 즉 자기방어능력을 지닌 고추품종의 육성이라고 할 수 있다. 이와 같은 연구를 위해서 가장 중요한 것은 첫째로 병원균의 침입시에만 작동하는 specific promoter의 개발이며 이런 promoter

는 아주 specific 하게 조절되는 gene으로부터 얻을 수 있다. 둘째로는 고추에서 강력한 hypersensitive responses를 일으키는 gene (elicitin)의 분리·동정이다. 셋째로는 이와 같이 개발된 specific promoter와 elicitin gene으로 이루어진 construct를 고추에 도입하는 형질전환시스템의 개발이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 내용 및 범위
고추 역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sesquiterpene cyclase의 클로닝 및 동정 <ol style="list-style-type: none"> (1) cDNA와 gDNA library 작성; UV를 처리한 고추 앞의 mRNA로부터 cDNA와 gDNA library 작성 (2) cDNA와 gDNA clones의 screening ; 담배의 sesquiterpene cyclase(5-EAS) gene을 probe로 사용하여 cDNA와 gDNA를 screening (3) cDNA와 gDNA의 sequencing; USB사의 Sequenase를 이용하여 dideoxynucleotide chain-termination 방법에 준하여 수행 2) <i>In vitro</i> mutagenesis에 의한 elicitin mutant 개발 <ol style="list-style-type: none"> (1) elicitin의 <i>in vitro</i> mutagenesis (2) mutant elicitors의 <i>E. coli</i> expression (3) 정제 elicitin 처리에 의한 담배 및 고추앞의 과사활성 검정 (4) Elicitin mutants로부터 elicitin의 정제 3) 5-EAS specific promoter + Elicitin gene construct 작성

구분	연구개발 내용 및 범위
<p>고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메카니즘</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성에 영향을 미치는 요인과 효소활성 검정 2) 각종 stress에 의한 고추의 sesquiterpene cyclase gene의 유도 3) 면역반응을 이용한 sesquiterpene cyclase 단백질의 유도 pattern 조사
<p>고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Phytoalexin 생성관련 효소의 특성구명 2) 현탁배양세포를 이용한 capsidiol 동정 3) 고추생체로부터 capsidiol 추출, 정제 및 동정 방법 확립 4) 고추품종간 Phytoalexin의 생성과 역병 저항성 조사 및 관련 요인 구명 5) 각종 elicitor 처리에 의한 capsidiol 생성과 메카니즘 6) 스트레스에 의한 항산화효소 활성 및 동위 효소 패턴의 변화
<p>고추역병 저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 고추의 여러 조직으로부터 callus 유도조건 구명 2) 고추의 callus 유도 및 식물체 재분화 3) 작성한 gene construct를 이용하여 고추의 형질전환체 육성 4) 상기시험에서 개발된 형질전환 식물체의 포장 검정시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

본 연구는 고추의 역병저항성 관련 유전자의 분리·동정을 통하여 특이성 promoter를 개발하여 HR을 일으키는 강력한 elicitin gene과 fusion 시켜 재래종 고추에 도입하여 역병 저항성 품종을 육성함을 목표로 1) 고추 역병의 specific promoter와 HR을 유도하는 elicitin 개발, 2) 고추 phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메커니즘, 3) 고추의 생체방어물질인 phytoalexin의 탐색, 4) 고추역병 저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정에 대한 시험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 고추 역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발

- 1) 두 개의 고추 sesquiterpene cyclase cDNA clone (CASC1과 CASC2)을 선별하였고, CASC1은 1,918 bp로서 30 bp의 5'-UTR region, 1,680 bp의 ORF, 268 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 65,095 Da의 분자량을 가진 559-deduced amino acid polypeptide는 TEAS와 77%의 identity를 보였다. CASC2는 1,941 bp로서 41 bp의 5'-UTR region, 1,683 bp의 ORF, 217 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 64,907 Da의 분자량을 가진 560-deduced amino acid polypeptide는 CASC1과 77%, TEAS와 74%, vetispiradiene과 71%의 identity를 보였다.
- 2) 고추에서 분리한 sesquiterpene cyclase cDNA를 probe으로 사

용하여 수비초 genomic library를 screening 하여 11개의 positive clone을 얻었다. 이중 gCASC 25와 gCASC 34는 coding region과 약 5 kb, 4.3 kb의 promoter 부위를 가지고 있었다.

- 3) Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter 영역은 gCASC 25에서 1,049 bp, gCASC 34에서 1,162 bp를 얻어 이들의 상동성을 비교하였다. Translational start site부터 gCASC 25 sequence의 -139, gCASC 34 sequence의 -135 base에 TATA box가 존재하였고 -285 base까지는 두 clone 간에 높은 상동성을 나타내었다. 특이적 promoter를 분리하기 위하여 gCASC 25와 gCASC 34에서 6개의 deletion clone을 만들었다.
- 4) 형질전환을 통해 sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter를 분석한 결과, GUS staining은 pBI121-KF3과 pBI121-KF6으로 형질전환된 담배의 잎에서 가장 진하게 되어 cloning된 promoter 부분은 그 길이에 따라 GUS의 발현 정도가 다르게 나타났다. 또한 형질전환된 담배의 잎을 UV 처리하여 GUS 유전자의 발현정도를 양적으로 측정된 결과, pBI121-KF6에서 무처리에 비해 3.5배 정도 증가하였다.
- 5) *Phytophthora parasitica*에서 분리된 parasiticein gene의 아미노산 서열 13번 alanine을 valine으로, 68번 proline을 alanine으로 바꾸는 등의 *in vitro* mutagenesis에 의해 point mutation 시킨 elicitin을 선발하였다. 고추 형질전환을 위하여 specific promoter와 선발된 elicitin을 재조합 하여 plant expression vector인 pBI101에 cloning 하였다.

나. 고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메카니즘

- 1) 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성은 UV 처리에 의해 유도되었으며 최대 활성은 처리 후 38 h - 48 h에서 나타났고 역병저항성 품종인 CM334 계통이 감수성인 수비초에 비해 효소활성이 빨리 유도될 뿐만 아니라 활성정도가 감수성 품종에 비해 훨씬 높은 현상을 보여주었다. 또한 여러 가지 무기성분의 처리에 의한 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성 유도는 처리물질간에 현저한 차이를 보여주었는데, HgCl_2 , CuCl_2 의 경우 처리 후 12 시간 내에 효소의 활성이 나타났고 36 시간 이후에 최고 수준에 달하였다. EGTA 2 mM 처리시 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성의 유도가 크게 증가하였다.
- 2) Sesquiterpene cyclase gene의 유도를 Northern blot analysis를 통해 분석한 결과, CuCl_2 , HgCl_2 , UV 처리에서 강하게 나타났다. UV-C를 처리한 고추잎으로부터 단백질을 추출하여 담배의 sesquiterpene cyclase에서 획득한 monoclonal antibody를 이용하여 cross activity을 관찰한 결과 cross activity가진 단백질이 생성됨을 관찰하였다.

다. 고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색

- 1) 역병균의 접종에 의하여 수비초는 접종 후 3일째에 발병되었으나 저항성인 CM331은 6일 후에도 발병되지 않았으며 metalaxyl과 키토산 처리는 역병의 발병을 지연시키는 효과가 있었다. 역병균의 접종에 의해 저항성 품종계통인 YCM 334가 공시된

고추품종 중에서 줄기 내의 capsidiol 함량이 가장 높았고, 감수성 품종인 수비초가 가장 낮았다. Metalaxyl 단독 처리는 capsidiol 생성을 유도하지 못하였으나 metalaxyl 처리 후 역병균 접종시에 YCM334의 capsidiol 생성이 가장 높게 나타났다.

- 2) 고추 역병 감수성 품종인 수비초와 저항성품종인 CM331 식물체의 부위별로 성분을 분리 동정 해 본 결과, 총 70개의 성분 중에서 두 품종간에 차이를 보이는 성분은 30개 였다. 고추의 역병 발병정도가 심할수록 앞에서는 hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등의 지방산 성분들이 감소하였고, 줄기에서는 phenol, ethyl tridecanate, phytol 등이 증가하였으나, 1,2-benzendicarboxylic acid, linoleic acid 등의 성분은 감소하였다. 뿌리에서는 α -D-xylofuranoside, phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등이 감소하였다.
- 3) UV를 식물체에 10, 20, 40, 60분 조사시 수비초의 앞에서는 capsidiol이 생성되었으나, CM331의 전 부위 및 수비초의 뿌리와 줄기에서는 생성되지 않았다.
- 4) 고추 현탁배양세포에 pectinase, jasmonic acid, cellulase, chitioligosaccharide 등의 elicitor를 처리하였을 때 무처리에 비해 생성이 많은 물질이 다수 있었으나 품종간이 차이를 보였다. 그러나 1,2-benzendicarboxylic acid 성분은 공시한 전 elicitor 처리에서 CM331이 수비초에 비하여 많이 생성되었고 capsidiol 성분은 수비초에 jasmonic acid 처리 시에만 발현되었다.

- 5) 역병균 및 UV-B 처리시에 POD와 SOD의 활성 변화를 보면 POD 활성은 역병 감수성 및 저항성 품종 공히 무처리에 비하여 식물체의 전 부위에서 증가하였다. 품종간에는 전 부위에서 수비초가 금탑에 비하여 높았다. SOD의 활성은 역병균 접종시 무처리에 비하여 수비초의 줄기에서 9.5배, 뿌리에서는 39.7배의 활성이 증가하였다.

라. 고추역병 저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정

- 1) 재래종 고추인 수비초와 칠성초의 자엽을 이용한 식물체 재분화 조건을 구명하기 위해 시험한 결과, shoot 분화율은 zeatin 2~4 mg/L에서 NAA 0.05 mg/L 혼용에서 분화율이 높았고, Root 분화율은 NAA 0.5 mg/L에서 높았다.
- 2) 고추 형질전환은 고추 자엽에 *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600- *syn a*)을 이용한 cyc600 promoter + Elicitin 유전자의 형질전환시 shoot의 형성율은 수비초의 경우 Zeatin 3 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 11.1%, Zeatin 4 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 12.8%를 보였다. 그리고 *Agrobacterium* 공동배양 기간은 전배양 3일, 공동배양 3일~4일에서 재분화율이 높았다. 자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 NPTII 유전자 primer를 이용한 PCR 분석에서 형질전환된 재분화 식물체는 536 bp의 밴드를 보여 형질전환체임을 확인하였다. 이들을 membrane에 transfer하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석한 결과, 고추형질전환 식물체는 536 bp 부위에 강한 signal을 보였다.
- 3) Elicitin gene을 이용한 역병 저항성 형질전환체 수비초 T₀세

대의 생육은 계통간에 다소 차이는 보였고, 모든 계통의 생육은 저조한 반면 개화 및 수정 등의 임성은 정상적이었다. 자식을 통해 채종한 T₁ 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 elicitin primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, T₀ 식물체 S1~S5 계통에서 elicitin 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T₁ 식물체인 S1-1 등 7계통에서 elicitin 밴드가 나타났고, S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체가 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다. Syn α clone을 이용하여 Southern blot analysis를 한 결과 band가 나타난 300 bp 위치에서 강한 signal을 관찰할 수 있었다. 위의 결과에서 cyc600 promoter + syn α 의 construct가 수비초의 genomic DNA에 삽입되었으며, 실제로 후대에 유전될 수 있는 것으로 나타났다.

- 4) 고추 형질전환체 T₁ 및 T₂ 세대의 유묘에 역병균을 접종한 결과 유주포자 10³개/ml에서 접종 5일후 역병 발병율은 0101계통 4.0%, 0104계통 16.0%였으며, 접종 12일후는 0108계통 40.0%, 0109계통 80.0%로 대비종인 금탑과 수비초 100%에 비해 발병율이 떨어져 유주포자 10³개/ml에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다. 획득된 역병 저항성 형질전환체를 영양고추시험장의 역병 상습포장에서 재배한 결과 생육, 개화소요일수, 과특성 등은 계통간에 다소 차이가 있었으나, 과실모양은 수비초와 매우 유사하였다. 포장에서의 역병의 발생은 계통간에 차이가 많았으며, 계통 0101, 0102, 0106, 0109는 시판종인 금탑에 비해 약 30% 정도 적었다. 포장에서 선발된 형질전환체는 세대의 진전을 통해 저항성의 고정이 필요한 것으로 판단된다.

2. 연구결과 활용에 대한 건의

가. 시책건의

- o 고추 역병 저항성 형질전환체의 선발 (형질전환체 중에서 역병 저항성이 높고 다른 농업적 형질이 우수한 계통)

나. 학술논문발표

- o Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*
<Plant Cell Physiol. 39(9):899-904>
- o Cloning of a sesquiterpene cyclase and its functional expression by domain swapping strategy
<Mol. Cells 10(2):220-225>
- o Cloning and characterization of gene(s) related to defense mechanism in red pepper
경북대학교 - 한국생명공학연구원 공동심포지움
(2000. 11. 30)

다. 고추 역병 저항성 형질전환체 계통의 분양

- o 역병 저항성 계통으로 선발된 것 중에서 역병 저항성이 높고 다른 농업적 형질이 우수한 계통을 대상으로 타 기관에 분양하여 중간모본으로 사용케 할 계획임

SUMMARY

I. TITLE

Development of Red Pepper Cultivar Resistant to *Phytophthora* blight through genetic engineering

II. Research Purpose and Significance

The red pepper is the most important money making vegetables taking a lot of proportions of spice and food industry in Korea. However, the price of red pepper is fluctuating by *phytophthora* blight causing a great damage to red pepper.

The root rot of a red pepper generated by *Phytophthora capsici* as soil infection is one of the most serious disease in the cultivating area (Barksdale et al., 1984; Leonian, 1992; Kim et al., 1989). Because of its difficulty for control, Development of resistant cultivars and rotating corps were considered as an effective management methods (Bruin and Edgington, 1981; Davidse, 1981; Shew, 1985; Sung and Hwang, 1988; Kim et al., 1989). Kimble and Grogan firstly reported that the resistant characteristics of pepper root rot was caused by two independent dominant gene (Kimble and Grogan, 1960). Development of stable and sustainable red pepper cultivars

resistant to the root rot is strongly required for sustainable production of red pepper.

With the limitation from conventional breeding for overcoming the damage caused by *P. capsici* in pepper, development of cultivars with a novel function of resistance to pepper root rot using biotechnological methods that enable to endow defense mechanism was significantly and necessarily required.

Most of biotechnological modification methods on crucial agricultural crop used CaMV 35S promoter as a promoter for constitutive expression of genes introduced. The expression of CaMV 35S promoter fused with some defense related and HR-related genes impeded the growth of early sage or induced variance with the nutrition metabolism (Honee et al., 1995). Therefore, Specific promoters that have advantages to surmount the inveterate and sporadic problems as a constitutive expression promoter is employed for transformation should be developed and used to develop a cultivar which has a regulatory ability to environmental stresses such as a specific disease.

The final aim of this study is to develop a set of the specific promoter that alternatively switches on when stimulated by infection of *Phytophthora capsici* and off when the stresses are removed and elicitor gene that cause HR (hypersensitive response) in red pepper as inoculated by *Phytophthora* genus.

This research consists of several experiments as follows.

- 1) development of the specific promoter with regulatory expression of intrinsic defense-related gene by pathogen challenge,
- 2) the identification and cloning of elicitor gene having strong hypersensitive response to *Phytophthora capsici*,
- and 3) the establishment of plant transformation system using specific promoter fused with elicitor gene.

III. Content and Scope of Research

This project consists of four subjects to develop red pepper cultivar resistant to *Phytophthora* blight through genetic engineering. Each subject was conducted by molecular biologist, natural product chemist and plant breeder, and they worked together as an interdisciplinary research team, in collaboration with several institutes. The research contents and scope can be summarized as follows:

1. Development of specific promoter to *Phytophthora* blight and HR-inducing elicitor

- 1) Cloning of sesquiterpene cyclase gene
 - Construction of cDNA and gDNA: A cDNA library was constructed with poly(A)⁺ RNA isolated from 24 h UV-challenged leaves of pepper and a genomic DNA library.
 - Screening of cDNA and gDNA clones: Screening of cDNA and gDNA library with probe of tobacco sesquiterpene cyclase.

- Sequencing of cDNA and gDNA: Sequencing of cDNA and gDNA using Sequenase ver. 2.0 and ALF automatic sequencer

2) Development of elicitor mutant by in vitro mutagenesis

- *In vitro* mutagenesis of elicitor
- *E. coli* expression of mutant elicitors
- Test of necrosis activities of tobacco and pepper leaves using purified elicitor
- Purification of elicitor from elicitor mutant

3) Construction of chimeric gene of 5-EAS specific promoter and elicitor gene

2. Phytoalexin biosynthesis and the resistance mechanism to *Phytophthora* blight in red pepper

- Identification of factors affecting sesquiterpene cyclase activity
- Sesquiterpene cyclase gene expression by various stresses
- Investigation of expression patterns of sesquiterpene cyclase gene by immunological reaction

3. Identification of phytoalexin related to defence in red pepper

- Isolation of capsidiol from red pepper suspension culture.
- Establishing method of elution, purification and

identification of capsidiol from fresh red pepper samples.

- Investigation of factors affecting phytoalexin biosynthesis and resistance to *Phytophthora* blight between red pepper cultivars.
- Effect of various elicitors on capsidiol biosynthesis in red pepper
- Analysis of anti-oxidant enzyme activity and isozyme patterns as affected by various elicitors

4. Development of transgenic red pepper plant resistant to *Phytophthora* blight

- Callus induction from plant tissues using various phytohormone.
- Callus induction and plant regeneration from pepper plant
- Creation of transgenic red peppers using chimeric gene (CASC promoter or cyc600 + elicitor gene) construct
- Field test of newly created transgenic red pepper plants

IV. Results and Their Applications

1. Research Abstract

This research was conducted for : (1) development of

specific promoter to *Phytophthora* blight and HR-inducing elicitor, (2) Phytoalexin biosynthesis and the resistance mechanism to *Phytophthora* blight in red pepper, (3) Identification of phytoalexin related to defence in red pepper, (4) development of transgenic red pepper plant resistant to *Phytophthora* blight. To achieve the above goals, natural product chemist, plant breeder and molecular biologist worked together as an interdisciplinary research team, in collaboration with several institutes.

1) Development of specific promoter to *Phytophthora* blight and HR-inducing elicitor

The plant responding to pathogen or pathogen-derived elicitors represents the resistant characteristics as producing a specific phytoalexins that provide defense to pathogen invading or diffusing in an attacked part of plant. In the case of red pepper, well known phytoalexin, capsidiol is catalyzed by 5'-*epi* aristolochene synthase that converts FPP (farnesyl pyrophosphate) to C₁₅ sesquiterpenoid in a branching and first step. This kinds of defense-related genes effectively respond to pathogen attack and expressed by specific promoters that induced by recognition against peculiar virulent and avirulent compounds.

This study was accomplished firstly to clone useful genes that has specific promoters and 5'-*epi* aristolochene synthase

responded to fungal pathogen and also was to construct chimeric gene reacting to pathogen attacks, ultimately for the sake of obtaining red pepper lines that can be utilized as breeding materials for resistant cultivar to *Phytophthora*-induced root rot.

Complementary DNA library was constructed for the cloning of 5'-*epi* aristolochene synthase genes using the probe of tobacco gene. Isolated and sequenced two cDNA clones were reported in GenBank (AF062815, AF212433). For isolation of promoter regions with pathogen specific response, we constructed genomic DNA library and screened 50 clones for the first screening. In the second screening of genomic DNA library, we obtained 11 clones exhibiting positive signal in Southern blot analysis. These were subcloned to pUC18 vector and sequenced the insert fragment that has promoters of 5'-*epi*aristolochene synthase gene. The two obtained clones named gCASC 25, and gCASC 34 containing 1409 bp and 1062 bp, respectively have PAL, CHS, IFR, PRI and other motifs. Six deleted fragments from two promoters containing such specific motif were fused with GUS (β -glucuronidase) in the plant expression vector pBI101 and transformed a tobacco plant for the purpose of elucidating the structural and functional character of the cloned promoters. Transgenic tobacco plants confirmed by PCR and Southern blot analysis were used for measuring GUS by histochemical assay that enable to explain the specific expressional ability

against stresses such as pathogen invasion.

The *Phytophthora*-derived elicitor which causes HR (hypersensitive response) in plants was also isolated and mutated by *in vivo* mutagenesis for elevating the activity of HR. The modified elicitor was expressed in bacterial cells and the elicitor protein was purified and used for tests of HR-like symptoms.

The pBI 101 constructs consisting of modified elicitor and six CASC and cyc600 promoters were introduced to red pepper using *Agrobacterium*-mediated transformation. These transgenic red peppers were analyzed by PCR and Southern blot analysis to determine whether the targeted gene was integrated or not. Furthermore, their offspring were consequently tested for resistance to *Phytophthora capsici* by inoculation of zoospore concentrations in field conditions. In this study, some of the transgenic red peppers were screened as more resistant than 'Kumtap', which is an F₁ hybrid cultivar.

2) Phytoalexin biosynthesis and the resistance mechanism to *Phytophthora* blight in red pepper

This study was conducted to investigate abiotic factors affecting phytoalexin production in red pepper and the resistant mechanism of the plants to *Phytophthora* blight, and to detect induction of sesquiterpene cyclase gene in red pepper as affected by abiotic elicitors, such as wounding, UV-C (260 nm),

HgCl₂, CuCl₂, NaCl, EGTA.

Sesquiterpene cyclase, a branch point enzyme in the general isoprenoid pathway for the synthesis of phytoalexin capsidiol, was highly induced in detached leaves of *Capsicum annuum* irradiated by UV and showed higher level in the challenged leaves at 38 h - 48 h after irradiation. The induction of sesquiterpene cyclase enzyme was higher and more rapid in CM334 which is resistant line to *Phytophthora capsici* than that of Subicho designated as sensitive line.

The activities of sesquiterpene cyclase induced by various inorganic compounds treatment was increased in the HgCl₂ and CuCl₂ treatment and represented the highest enzyme activities at 36 h after treatment. The induction of sesquiterpene cyclase activities was observed in the treatment of 2 mM EGTA. Sesquiterpene cyclase gene was induced by CuCl₂, HgCl₂ and UV-irradiation and confirmed by northern blot analysis.

The inducibility of cyclase enzyme activities paralleled the absolute amount of cyclase proteins in red pepper immunodetected by monoclonal antibodies raised against tobacco sesquiterpene cyclase.

3) Identification of phytoalexin related to defence in red pepper

Phytoalexins are produced in the plants affected by several environmental factors such as fungi, chemicals, and

UV-irradiation.

When red pepper and tobacco cell suspension cells were grown on a basal MS medium supplemented with 2,4-D (1 mg/l), benzyl adenine (0.001 mg/l) and 100 μ M jasmonic acid, capsidiol was produced and eluted into culture solution, and identified on thin-layer chromatography and by GC/MS.

In red pepper plants, 70 compounds were identified and 30 compounds of them were different in the two cultivars, CM331 and Subicho. The compounds such as hexadecanoic acid, ethyl tridecanoate, linoleic acid were decreased in the leaf; 1,2-benzendicarboxylic acid, linoleic acid in stem; 1,2-benzendicarboxylic acid, α -D-xylofuranoside, phenol, ethyl tridecanate, linoleic acid in the root as red pepper was severely damaged by *Phytophthora* blight.

Capsidiol biosynthesis was differed from the stresses such as inoculation of *P. capsici*, metalaxyl treatment and the UV-B irradiation. The content of capsidiol in the plant inoculated by *P. capsici* followed by metalaxyl treatment was higher than *P. capsici* without metalaxyl treatment. In the UV-irradiated plant, capsidiol was produced only in the leaf and contents were highest at 24 h after irradiation.

The activities of the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in the red pepper irradiated by UV or inoculated by *P. capsici* were increased in both of resistant and susceptible cultivars. SOD activities in the stem and root

of Subicho were increased 9 and 39 times compared to untreated control.

4) Development of transgenic red pepper plant resistant to *Phytophthora* blight

The study was carried out to develop transformants resistant to *Phytophthora* blight disease in pepper plants using two domestic varieties, Subicho and Chilsungcho. Cotyledons of the two native varieties, were used to establish conditions for plant regeneration. Differentiation rate of shoot was higher in 2 to 4 mg/L zeatin and 0.05 mg/L NAA than other treatments. Meanwhile, differentiation rate of roots was the highest in NAA 0.5 mg/L.

Transformation of red pepper was attempted to get a resistant cultivar to *Phytophthora* blight using *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101) method. Gene constructs of CASC promoters or cyc600 fused with elicitor gene were made by other research group in the same project. Rate of shoot formation in Subicho was 11.1% in medium containing zeatin 3 mg/L and NAA 0.05 mg/L, and also 12.8% in medium containing combination of zeatin 4 mg/L and NAA 0.05 mg/L. The highest rate of regeneration was achieved by preculture for 3 days and coculture for 3 to 4 days.

For PCR analysis using NPTII gene primer of transformants regenerated from cotyledons, We detected a specific band of 536

bp. Strong signal at position of 536 bp was observed in Southern blot analysis when NPTII gene was used as probe. The transformants of T₀ generation produced from Subicho had same morphological characteristics with intact plant and normal fertility.

For PCR analysis to recognize gene introduction of T₁ plants collected from selfing plants, S1 to S5 lines of T₀ plants were transplanted and used for PCR. The bands corresponding to elicitor gene were observed in 7 lines. In Southern blot analysis using elicitor gene, only one strong signal of 300 bps was appeared. Based on the results, We considered that the construct of syn600 promoter fused with elicitor gene might be inserted into genomic DNA of Subicho plant.

For the resistance test of T₁ and T₂ transformants against *Phytophthora* blight, blight fungus was inoculated to seedlings of the T₁ and T₂ transformants by concentration of 10³/ml zoospore. Occurrence rate of blight disease at 5 days after inoculation was 4.0% in 0101 line and 16.0% in 0104 line. For field test in the Youngyang Pepper Experiment Station, in which blight was commonly occurred, the transformants were similar in the morphological characteristics to domestic varieties, but more resistant to blight compared to commercial varieties of Kumtap. So, we concluded that the transformants showing blight resistance have an advanced defense mechanism by introducing the gene construct.

2. Application of Results

- 1) Development of a new red pepper cultivar which has resistance to *Phytophthora* blight using for reduced production costs and favoring environment.

- 2) Reduced and efficient production of red pepper through using resistance to *Phytophthora* blight cultivar in field

CONTENTS

Chapter 1. Comprehensive Description of Research	35
Section 1. Research Significance	35
Section 2. Research Purpose and Scope	40
Chapter 2. Development of specific promoter to <i>Phytophthora</i> blight and HR-inducing elicitin	43
Section 1. Introduction	43
Section 2. Materials and Methods	45
1. Cloning and characterization of 5-epi aristolochene (EAS)	46
2. Analysis of sesquiterpene cyclase gene in red pepper	49
3. Elicitin mutant developed by in vitro mutagenesis and bioassay	53
4. Gene constructs of 5-EAS specific promoter fused with elicitin gene	54
Section 3. Results and Discussion	55
1. Cloning and characterization of 5-epi aristolochene (EAS)	55
2. Analysis of sesquiterpene cyclase gene in red pepper	67

3. Elicitin mutant developed by <i>in vitro</i> mutagenesis and bioassay	85
4. Gene constructs of 5-EAS specific promoter fused with elicitin gene	88
Section 4. Abstract	92
Section 5. Literature Cited	94
 Chapter 3. Phytoalexin biosynthesis and resistance mechanism to <i>Phytophthora</i> blight in red pepper	101
Section 1. Introduction	101
Section 2. Materials and Methods	102
1. Factors affecting enzyme activity of sesquiterpene cyclase in red pepper	102
2. Induction of sesquiterpene cyclase gene by several stresses	104
3. Immunoblot analysis and sesquiterpene cyclase enzyme activity	105
Section 3. Results and Discussion	106
1. Factors affecting enzyme activity of sesquiterpene cyclase in red pepper	106
2. Induction of sesquiterpene cyclase gene by several stresses	109
3. Immunoblot analysis and sesquiterpene cyclase enzyme activity	111
Section 4. Abstract	112
Section 5. Literature Cited	113

Chapter 4. Identification of phytoalexin related to defence in red pepper	117
Section 1. Introduction	117
Section 2. Materials and Methods	119
1. Factors affecting phytoalexin biosynthesis in suspension cells and plant	119
2. Effect of various elicitors on capsidiol biosynthesis	122
3. Antioxidant enzymes activities and isozyme patterns as affected by various stresses	123
Section 3. Results and Discussion	124
1. Factors affecting phytoalexin biosynthesis in suspension cells and plant	124
2. Effect of various elicitors on capsidiol biosynthesis	146
3. Antioxidant enzymes activities and isozyme patterns as affected by various stresses	150
Section 4. Abstract	152
Section 5. Literature Cited	154
Chapter 5. Development of transgenic red pepper resistant to <i>Phytophthora</i> blight	157
Section 1. Introduction	157
Section 2. Materials and Methods	159

1. Callus induction and plant regeneration from red pepper tissues	159
2. Development of transgenic red pepper resistant to <i>Phytophthora</i> blight	160
3. Characteristics of transformants and expression of the gene introduced	162
4. Disease resistance of transgenic red pepper to <i>Phytophthora</i> blight and field trial for screening	163
Section 3. Results and Discussion	165
1. Callus induction and plant regeneration from red pepper tissues	165
2. Development of transgenic red pepper resistant to <i>Phytophthora</i> blight	169
3. Characteristics of transformants and expression of the gene introduced	172
4. Disease resistance of transgenic red pepper to <i>Phytophthora</i> blight and field trial for screening	178
Section 4. Abstract	184
Section 5. Literature Cited	186

목 차

제 1 장 서 론	35
제1절 연구개발의 필요성	35
제2절 연구개발의 목적과 범위	40
제 2 장 고추 역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발	43
제1절 서 설	43
제2절 재료 및 방법	45
1. 5-epi aristolochene synthase (EAS)의 클로닝 및 동정 ...	46
2. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조 분석	49
3. <i>In vitro</i> mutagenesis에 의한 elicitin mutant 개발과 생물검정	53
4. 5-EAS specific promoter + Elicitin gene construct 작성	54
제3절 결과 및 고찰	55
1. 5-epi aristolochene synthase (EAS)의 클로닝 및 동정 ...	55
2. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조 분석	67
3. <i>in vitro</i> mutagenesis에 의한 elicitin mutant 개발과 생물검정	85
4. 5-EAS specific promoter + Elicitin gene construct 작성	88

제4절 적 요 92

제5절 참고문헌 94

제 3 장 고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성
메카니즘 101

제1절 서 설 101

제2절 재료 및 방법 102

1. 고추의 Sesquiterpene cyclase 효소활성에 영향을 미치는 요인과 효소활성 검정 102
2. 각종 Stress에 의한 고추의 Sesquiterpene cyclase gene의 유도 104
3. 면역반응을 이용한 Sesquiterpene cyclase 단백질의 유도 pattern 조사 105

제3절 결과 및 고찰 106

1. 고추의 Sesquiterpene cyclase 효소활성에 영향을 미치는 요인과 효소활성 검정 106
2. 각종 Stress에 의한 고추의 Sesquiterpene cyclase gene의 유도 109
3. 면역반응을 이용한 Sesquiterpene cyclase 단백질의 유도 pattern 조사 111

제4절 적 요 112

제5절 참고문헌 113

제 4 장 고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색	117
제1절 서 설	117
제2절 재료 및 방법	119
1. 고추 현탁배양세포 및 식물체에서 Phytoalexin 생성요인 검정	119
2. 각종 elicitor 처리에 의한 Capsidiol 생성과 메카니즘	122
3. 스트레스에 의한 항산화효소 활성 및 동위효소 패턴의 변화	123
제3절 결과 및 고찰	124
1. 고추 현탁배양세포 및 식물체에서 Phytoalexin 생성요인 검정	124
2. 각종 elicitor 처리에 의한 Capsidiol 생성과 메카니즘	146
3. 스트레스에 의한 항산화효소 활성 및 동위효소 패턴의 변화	150
제4절 적 요	152
제5절 참고문헌	154
제 5 장 고추역병 저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정	157
제1절 서 설	157
제2절 재료 및 방법	159

1. 고추의 조직으로부터 Callus 유도 및 식물체 재분화	159
2. 형질전환에 의한 고추 역병저항성 식물체 육성	160
3. 병저항성 형질발현 및 품종의 특성조사	162
4. 고추 역병저항성 식물체의 병검정과 포장시험	163
제3절 결과 및 고찰	165
1. 고추의 조직으로부터 Callus 유도 및 식물체 재분화	165
2. 형질전환에 의한 고추 역병저항성 식물체 육성	169
3. 병저항성 형질발현 및 품종의 특성조사	172
4. 고추 역병저항성 식물체의 병검정과 포장시험	178
제4절 적 요	184
제5절 참고문헌	186

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 필요성

우리나라에서 고추의 역병이 다발하는 원인은 여러 가지 환경조건과도 관련이 있으나 고도의 저항성을 지닌 품종이 없는 것이 가장 큰 원인으로 생각되며, 1986년 우리나라 고추 주산단지의 실태조사에서 고추재배의 가장 큰 장애요인은 고추역병으로 꼽히고 있다. 고추의 역병은 *Phytophthora capsici*에 의해 토양전염되는 심각한 병이며 살균제에 의해서 효과적인 방제가 어렵기 때문에 저항성품종의 개발이나 윤환재배 등의 종합적인 방제대책이 필요하다. 따라서 저항성품종의 육성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

고추의 저항성은 우성유전자에 의해 지배되거나 병원균의 감염기간이 길어지거나 농도가 높아지면 감수성을 나타내는 경우가 있기 때문에 안정되고 지속적인 저항성이 요구된다고 한다. 고추의 age-related resistance의 발현과 이와 관련된 phytoalexins의 생성에 대한 연구를 수행하여 *P. capsici*에 감염된 고추의 줄기와 뿌리의 capsidiol 농도는 저항성의 정도와 상관관계가 있다고 하였으며, 또한 저항성품종은 metalaxyl처리에 의해서 capsidiol의 축적이 감수성품종에 비해 많은 것으로 나타났다고 보고하였다.

이와 같은 연구결과는 본 연구과제의 수행에 기초적이고 중요한 정보 뿐만 아니라 병원균의 감염에 대한 고추의 생체방어기작에 관련된 phytoalexin capsidiol의 유도방법 등을 제공하여 주고 있으

며, 또한 본 연구과제 계획서의 타당성을 확인해 주는 연구결과라고 할 수 있다.

1) 기술적 측면

고추는 우리나라 농가의 가장 보편적인 소득작목이고 양념채소로서 그 비중이 매우 높으며 식품가공산업에도 많이 이용되는 주요작물로 간주되고 있으나, 고추재배시에 역병의 피해로 생산이 불안정하여 가격파동이 반복되고 있다.

고추의 역병은 *Phytophthora capsici*의 감염으로 발생하며 많은 고추재배지에서 가장 큰 피해를 일으키는 토양전염병으로 알려져 있으며 (Barksdale et al, 1984; Leonian, 1992; Kim et al, 1989) 살균제의 처리로 효과적으로 방제가 되지 않기 때문에 저항성품종을 육성하여 사용하던지 아니면 윤작에 의해 그 피해를 줄이고 있다 (Bruin and Edgington, 1981; Davidse, 1981; Shew, 1985; Sung and Hwang, 1988; Kim et al, 1989). 고추역병 저항성은 1960년 Kimble and Grogan에 의해 보고되었으며 두 개의 우성유전자가 독립적으로 작용하는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 이러한 저항성품종도 병원균의 감염기간이 길어진다든지 농도가 높아지면 병해증상을 나타내기 때문에 안정하고 지속적인 저항성 개발에 많은 연구가 절실히 요구되며, 고추재배에서 가장 시급히 해결해야 할 연구분야로 생각된다. 이와 같이 재래육종방법에 의한 저항성품종 개발은 한계가 있기 때문에 생명공학기법을 이용하여 고추역병균의 침입시에 자기방어기작을 지닌 역병 저항성 신기능 고추품종 개발의 중요성과 필요성이 절실히 요구되고 있다.

식물체는 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 선충 및 곤충의 침입에

대한 자기방어기작을 갖고 있으며, 이러한 방어기작은 식물체내의 저항성유전자와 병원균의 avirulence gene과의 특이한 상호작용으로 인해 식물체가 저항성을 발휘하게 된다. 이와 같은 상호작용은 gene for gene interaction 모델로 설명되어지고 병원균측의 avirulence gene과 식물측의 저항성유전자가 동시에 존재할 때 가능하며, 어느 한쪽의 유전자 즉 avirulence gene이나 저항성 유전자가 결여되었을 때 식물체는 방어기작을 상실하는 것으로 알려져 있다 (Flor, 1956; Crute, 1985).

최근 몇 년간 이러한 원리를 이용하여 담배로부터 TMV 저항성유전자, 토마토로부터 *pto* 및 *cf 9* 유전자, *Arabidopsis*의 RPM 1 유전자, 아마로부터 L6 유전자, 벼로부터 *xa 21* 저항성유전자들이 cloning 되었으며, 이 저항성유전자들은 특정병원균의 침입시에 식물의 방어기작을 작동시켜 식물체가 저항성을 갖도록 하는 역할을 한다.

생명공학의 농업적 이용의 궁극적인 목적은 이와 같이 클로닝된 저항성유전자를 이용하여 실용 가능한 식물체의 육성이기 때문에 현재까지 여러 연구자들에 의해서 클로닝된 저항성유전자를 CaMV 35S promoter와 연결하여 형질전환체를 만들어 식물체의 저항성을 증대시키는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 35S promoter의 경우 형질전환체의 전생육기간 동안 병원균의 감염유무에 관계없이 저항성유전자를 작동시켜 식물체내의 에너지대사의 불균형 및 종자의 발아시나 생육초기에 hypersensitive response (HR)로 인해 식물이 고사하게 된다 (Honee et al., 1995). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 형질전환체의 도입유전자의 형질 발현을 적절히 조절해 줄 수 있는 특이성 promoter의 개발이 선행되어야 한다. 따라서 특정유전자의

specific promoter 개발은 생명공학의 효율적인 농업적 이용을 위해서 유전공학연구에서 가장 시급히 이루어져야 하는 필수불가결한 분야로 대두되고 있다.

최근 Phytophthora 속에서 분리된 elicitin 단백질이 phytoalexin, defense-related PR protein 및 SA 합성에 의해서 담배의 hypersensitive responses와 SAR (systemic acquired resistance)을 유도하는 것으로 연구보고됨에 따라 가지과 식물의 elicitin 유도 및 생성에 의한 역병균 저항성 식물의 개발 가능성이 높아졌다.

따라서 역병균의 침입시에만 작동하는 specific promoter에 HR이나 SAR을 유도하는 elicitin gene을 붙여서 고추의 형질전환체를 만들면 고추재배에서 가장 문제시되는 고추역병 저항성 신기능 식물의 육성이 가능하리라 사료되며, 향후 고추 등의 가지과 식물의 내병성 품종 육성은 이와 같은 유전공학적 접근방법에 의해서 성공할 가능성이 매우 높기 때문에 본 과제와 같은 연구가 절실히 필요할 것이다.

2) 경제 · 산업적 측면

유전공학 등의 첨단기술을 이용한 작물 품종육성은 상업적으로 엄청난 효과를 가져오기 때문에 선진국을 중심으로 연구기관 및 기업체연구소에서 이 분야에 엄청난 투자를 하고 있는 실정이다. 특히 WTO 출범으로 인한 농산물의 교역이 비교우위론에 입각하여 이루어질 경우, 그 파급효과는 더욱 커질 것으로 전망된다.

외국에서는 담배의 specific한 sesquiterpene cyclase promoter를 개발하여 elicitin gene과 fusion시킨 후 형질전환 식물체를 만

들어서 내병성을 검정한 결과 병저항성(hypersensitive responses)을 지닌 식물체를 선발하였으며, 여기에 사용된 promoter는 특허출원 중에 있다고 하며, 현재는 실용 가능한 품종 개발 연구를 수행하고 있다고 한다.

고추의 경우도 담배와 유사한 기작에 의해서 생체방어기작에 관련된 phytoalexin인 capsidiol을 생성한다고 알려져 있기 때문에 담배에서와 같이 특이성을 지닌 promoter의 개발과 강력한 eliciting gene을 이용하면 고추역병 저항성 식물의 개발이 가능하리라고 생각된다.

만약 본 연구에서와 같이 유전공학적인 방법으로 신기능성을 지닌 내병성 고추품종이 개발된다면 농약사용으로 인한 경비절감 뿐만 아니라 종자산업에 직·간접적으로 이용할 수 있기 때문에 경제적·산업적 측면에서 이와 같은 연구가 절실히 필요하리라고 사료된다. 또한 이와 같은 연구모델을 타분야에 직접적으로 응용할 수 있으므로 본 연구과제의 개발이 절실하다고 하겠다.

3) 사회 · 문화적 측면

우리나라의 국민 식생활에서 고추가 차지하는 비중은 매우 크다고 할 수 있으며 WTO 출범으로 인하여 향후 농산물의 생산과 교역은 비교우위론에 입각하여 이루어질 것으로 예상됨에 따라 미국이나 남미 국가등에서도 유전공학적기법에 의한 고추의 병저항성과 특히 생체방어기작에 대한 연구가 이루어지고 있다. 어떤 작물에서 보다 우수한 형질이나 특징을 지니고 있는 신품종이 개발되었을 때 생산과 교역에서 그 품종이 차지하는 비중은 엄청나게 증가할 것으로 예상되고 있다.

따라서 선진외국에서는 유전공학기법에 의한 신기능성 및 내재해성 품종개발에 박차를 가하고 있으나, 우리의 경우 아직까지 이 분야의 기술이 매우 뒤떨어져 있는 실정이다. 만약 선진외국에서 유전공학적 방법으로 자기방어능력을 지닌 내병성 신기능 품종이 개발되어 상업적으로 유통될 경우 기존의 우리 품종은 과도한 농약사용으로 인한 환경오염과 생태계 파괴 및 소비자의 건강을 이유로 제배될 수 없고, 이로 인하여 외국에서 개발된 품종을 도입할 경우 엄청난 기술료(royalty)를 지불해야 할 것이다.

제2절 연구개발의 목적과 범위

최근에 와서 식물분자생물학 기술 중에서 가장 주목받는 연구분야의 하나는 식물이 병원균에 감염되었을 때 hypersensitive response 등으로 병원균의 체내로 전염이나 확산을 막을 수 있는, 즉 자기방어능력을 지닌 식물의 육성이라고 할 수 있다. 이와 같은 연구를 위해서 가장 중요한 것은 첫째로 병원균의 침입시에만 작동하는 specific promoter의 개발이며 이런 promoter는 아주 specific하게 조절되는 gene으로부터 얻을 수 있다. 둘째로는 고추에서 강력한 hypersensitive responses를 일으키는 gene (elicitin)의 분리·동정이다. 셋째로는 이와 같이 개발된 specific promoter와 elicitin gene으로 이루어진 construct를 고추에 도입하는 형질전환 시스템의 개발이다.

상기의 세 가지 연구가 성공적으로 완성되면 형질전환체의 병원균에 대한 반응과 형질발현기작에 대한 연구를 실시하게 되고, 최종

적으로 포장조건하에서 저항성 검정과 고추의 재배적·농업적 특성을 조사한다. 따라서 본 연구의 궁극적인 목표는 specific promoter 개발과 mutant elicitin gene 분리에 의한 고추역병에 저항성 (hypersensitive responses에 의한 자기방어능력)을 지닌 품종을 형질전환기법에 의해서 개발하는 것이며, 본 연구의 최종개발 목표를 요약하면 다음과 같다.

- 고추에서 specific 하게 조절되는 gene으로부터 역병균의 침입 시에만 작동하는 specific promoter를 개발하며
- In vitro mutagenesis 기법을 이용하여 고추에서 강력한 hypersensitive responses를 일으키는 mutant elicitin을 만든다
- Specific promoter와 elicitin gene으로 이루어진 construct를 고추에 도입하는 형질전환시스템을 개발함
- 형질전환체의 내병성 검정에 의한 고추역병 저항성 식물체의 선발
- 포장 검정시험을 통한 고추역병 저항성 품종육성

여 백

제 2 장 고추역병의 Specific promoter와 HR을 유도하는 Elicitin 개발

제1절 서 설

식물세포는 병원균이나 병원균에서 유래한 elicitors에 반응하여 항균성 phytoalexins을 생산하며 (Darvill et al., 1984; Ebel, 1986), 이와 같은 반응은 식물의 자기방어반응을 나타내는 것이기 때문에 지난 20여년간 연구자들의 상당한 관심을 끌고 있다. 식물에 의해 생성되는 phytoalexins의 종류는 식물의 과에 따라 다른데, 예를 들면 콩과식물에 의해서는 phenylpropanoid 유도체 (Loyal, 1984); 가지과식물로부터는 terpene phytoalexins (Koga, 1988); 화본과인 벼로부터는 diterpene이 생성된다. 고추에서 capsidiol은 FPP (farnesyl pyrophosphate)로부터 5-epi aristolochene synthase에 의해서 생성된다.

고추의 역병균에 대한 저항성의 차이는 고추가 이 병균에 감염되었을 때 식물체내에서 생성·축적되는 항균성물질인 phytoalexins에 기인한다는 보고가 많이 있다 (Back, 1998). 이와 같은 현상은 고추뿐만 아니라 담배 및 벼 등에서도 일어난다 (Hain, 1993). 최근에는 phytoalexin의 생합성기작이 밝혀지고 있으며 합성과정에 관련된 효소 및 유전자가 분리됨으로써 각종 작물에서의 내병성품종의 육성에 많은 관심과 연구가 이루어지고 있다.

Stoessl 등 (1972)이 최초로 고추 과육이 여러 가지의 병원성 및

비병원성균의 감염에 의하여 항균성 phytoalexin인 capsidiol을 생성한다고 보고하였고, 다른 균과 세균도 역시 capsidiol의 축적을 유도한다고 알려졌다 (Stoessl et al., 1972; Ward, 1973). 이와 같은 연구보고가 있는 이후 많은 연구자들이 capsidiol 생성·축적과 고추의 병저항성과의 관계를 구명하는 연구를 수행하게 되었다 (Facchini et al., 1992; Vogelet al., 1995; Yin, 1997).

Elicitins 은 Phytophthora 속의 종들이 분비하는 작은 단백질 (10 kDa)이며 담배의 Phytophthora에 대한 저항성을 나타내는 데에 결정적인 역할을 하는 것으로서 HR (hypersensitive response)과 SAR (systemic acquired resistance)을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Nespoulous, 1992; Kamoun et al., 1993; Huet et al., 1994; Potier et al, 1998). 현재까지 약 10 종의 elicitin이 분리·정제되어 이들의 아미노산 구조 등이 결정되어 있으며 이들 elicitin은 68-94% 정도의 아미노산이 동질인 것으로 밝혀져 있다 (Nespoulous et al., 1992; Ricci et al., 1995; Huet et al., 1993; Huet et al., 1989; Keller et al., 1997).

최근에 Yu 등(1995)은 10종의 elicitin sequences을 대상으로 담배의 괴사정도를 검정한 결과 sequence에 따라서 toxicity의 정도가 다름을 알았다. Elicitins이 담배세포에 미치는 영향은 급속한 전해질의 누출, protein phosphorylation, 활성산소의 발생과 에칠렌 및 capsidiol의 후기생성 등이며, 담배세포와의 초기 상호작용 부위는 알려져 있지 않지만 상호작용에 의해 식물의 일반적인 생체방어반응을 유도한다 (Yu, 1995). Elicitin isoform은 생물학적 활성과 구조적 성질에 따라 α -elicitin과 β -elicitin의 두 가지가 있으며, 담배잎의 괴사 실험에서 β -elicitin이 α -elicitin 보다 더욱 심한

괴사 (hypersensitive response) 현상을 나타낸다 (Huet et al., 1994; Nespoulous et al., 1992).

Kamoun 등 (1993)이 처음으로 *Phytophthora paracitica*로부터 elicitin gene을 클로닝하였으며, 이 gene은 118 amino acid로 구성되어 있으며 아미노산말단에 20 amino acid의 signal peptide sequence가 있는 것으로 보고하였다. Pernollet 등 (1993)은 정제된 elicitin 1 μ g을 고추잎에 처리했을 때 잎의 lamina에서 괴사 (necrosis) 현상이 나타났다고 보고함으로써 elicitin이 고추에서 괴사를 일으키며, 괴사에 따른 defense responses (phytoalexin 생성, defense-related PR protein 및 SA 합성 등)을 함께 유도할 것으로 추정된다.

따라서 본 연구는 고추의 역병저항성 관련 유전자를 cloning 하고 genomic DNA를 분리하여 분석함으로써 역병균 감염시에 유도되는 특이성 promoter를 분리·동정한다. 또한 강력한 elicitin gene을 선발하여 특이성 promoter + elicitin gene construct를 제작하여 재래종 고추에 도입하기 위하여 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

역병저항성인 CM331 등과 감수성인 재래종 수비초 등의 고추 품종은 경상북도 농업기술원 영양고추시험장에서 분양 받아 사용하였고, 각 시험에 사용된 시약과 kit 등은 관련회사로부터 구입하였다. 품종별로 온실에서 종자를 1주일 간격으로 파종하여 시험의 목적에 따라 적절한 시기에 실험재료로 사용하였다. UV 처리는 고추 잎을

따서 Hitachi germicidal lamp (15 W)의 20 cm 아래에서 15 분간 조사시킨 후 petri dish에 엽병이 물에 잠기도록 하여 성장실 두었다.

1. 5-epi aristolochene synthase (EAS)의 클로닝 및 동정

가. cDNA library 작성

1) Poly A⁺ RNA isolation : UV를 처리한 고추 잎으로부터 guanidine isothiocyanate/CsCl 방법 (Glisin et al., 1974)에 준하여 total RNA를 추출한 후 oligo (dT)-cellulose chromatography (Sambrook et al., 1989)로 poly A⁺ RNA을 분리하였다.

2) cDNA library 작성 : 미국 Stratagene사로부터 구입한 kit를 이용하여 2중쇄의 cDNA를 만들고 λZAP vector에 클로닝시켰다.

나. cDNA library로부터 Sesquiterpene cyclases의 Screening

1) Polymerase chain reaction : 담배에서 sesquiterpene cyclase gene (5-EAS)을 sequencing할 때 사용한 여러 가지 18-mer primers을 조합하여 고추 (수비초, CM331, CM334)에서 추출한 gDNA를 PCR template로 사용한 결과, 두 개의 primer조합에서 기대한 크기의 PCR product을 획득하였다.

2) PCR 생성물의 Sequencing : PCR 생성물에 klenow enzyme을 처리하여 blunt-ending화 한 후 pBluescript-KS의 EcoR-V위치에 subcloning하였다. 이 clones들을 bacteria에서 증폭시킨 후 plasmid를 정제하여 T₃ 및 T₇ primers을 이용 sequencing을 해 본 결

과, 담배의 sesquiterpene cyclase와 90% 이상 homology를 나타내었다. 이 PCR 생성물을 probe로 이용하여 cDNA 및 gDNA clones을 screening 하였다.

다. Genomic DNA library 작성

고추의 genomic DNA를 추출하여 EcoRI으로 partial digestion한 후 EcoRI fragments을 λ EMBL4 (Strategene)의 corresponding site에 삽입하여 고추 genomic DNA library를 작성하였다.

라. gDNA library screening

1) Sesquiterpene cyclase 유전자의 labelling

pBluescript-SK vector에 cloning된 sesquiterpene cyclase cDNA를 EcoRI, XhoI으로 digestion하여, 약 2 kb fragment를 gel에서 GeneClean kit을 이용하여 순수 분리하였다. 분리된 DNA fragment, 약 100 ng을 Amersham사의 Megaprime random labelling kit을 이용하여 α - P^{32} -dCTP로 labelling하였으며 이를 수비초 genomic DNA library를 screening 하는데 probe으로 사용하였다.

2) 고추 genomic library의 1st screening과 2nd screening

Screening plate에 LB 배지를 이용하여 genomic DNA library를 spreading한 후 Amersham사의 Nylon membrane N⁺에 phage plaque를 blotting 하였다. 이 blot을 0.5 M NaOH를 사용하여 denaturation한 후 Tris-Cl (pH 8.0)로 중화시켜 sesquiterpene cyclase cDNA probe와 hybridization 시켰다. Hybridization solution은 Denhart's 5X, Dextran, SSC, SDS, Salmon sperm DNA 등을 사용하였

고 hybridization 후 2X SSC, 1% SDS를 42℃에서 15분간 prewashing한 후 0.1X SSC, 0.1% SDS로 50℃에서 20분간 2회 세척하여 X-ray film에 2일간 노출시켰다. 1st screening에서 positive signal을 보이는 plaque를 선발하고, 각각 SM medium elution하여 2nd screening에 사용하였다. 2nd screening은 1st screening방법과 같게 하였다.

3) Screening된 phage의 Southern blot 분석

Screening한 phage의 DNA는 Sambrook (Molecular cloning, a laboratory manual) 등의 방법에 준하여 분리하였고 이를 EcoRI으로 digestion하여 0.7% agarose gel에 전기 영동하였고, vacuum으로 Nylon membrane N⁺에 transfer, UV crosslinking 하여 hybridization에 사용하였다.

따. cDNA, gDNA의 Sequencing

DNA sequencing은 dideoxynucleotide chain-termination 방법 (Sanger et al., 1977)에 준하여 수행하였다. Subcloning된 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 Promega사의 plasmid prep kit (Wizard SV plasmid prep kit)를 사용하여 plasmid를 순수 분리하였으며 Pharmacia의 autocycling kit을 이용하여 염기서열 분석을 위한 dideoxy chain termination 방법으로 반응시켰다. 그리고 반응산물들을 Pharmacia의 ALF express autosequencing 염기서열 분석 장치로 염기서열을 결정하였다. 그리고 일부 clone들은 USB사 sequenase version 2.0을 사용하여 manual로 sequencing하였다.

2. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조 분석

가. Sesquiterpene cyclase promoter 분석을 위한 PCR primer 제작

Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter를 분석하기 위하여 region A와 region B를 각각 나누어 PCR primer를 제작하였다. Promoter 부위는 gCASC 25와 gCASC 34에서 6개의 deletion clone을 얻을 수 있도록 하였으며, region A를 포함하는 280 bp 크기의 clone과 region B를 포함하는 1 kb clone, specific motif를 포함하는 410 bp 크기의 clone들을 PCR로 증폭할 수 있도록 primer를 제작하였다 (결과 및 고찰 참조).

나. PCR 반응 및 Promoter 단편의 획득

PCR 반응은 전체 volume이 50 μ l 되게 하였으며 1 μ l (5 U/ μ l) TaKaRa Taq, 1 μ l dNTP mixture (2.5 mM), 5 μ l 10 \times PCR Buffer, 1 μ l (0.05 μ M) primer, 1 μ l (1 μ g/ μ l) template DNA, 41 μ l 초순수로 전체가 50 μ l 되도록 양을 맞추었다. PCR 반응은 MJ research의 minicycler를 사용하여, 94 $^{\circ}$ C 3분 그리고 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 3분, 35 cycle 반응시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extension시켜 deletion clone을 얻었다. 아래 그림과 같이 promoter region의 clone들을 β -glucuronidase 유전자를 가지고 있는 plant expression vector인 pBI121 vector에 cloning 하기 위해 PCR primer forward에는 HindIII, reverse 방향에는 BamHI의 제한 효소 site를 넣어서 제작하여 PCR 반응에 사용하였다.

다. 형질전환을 통한 Promoter의 기능 분석

1) Plant expression vector에 Promoter 부위 Deletion fragments의 Cloning

HindIII, BamHI site가 포함된 primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물들을 plant expression vector인 pBI121 (CLONTECH, Inc)의 HindIII, BamHI site에 cloning하였다. pBI121 vector는 T-DNA 부분에 kanamycin 저항성 유전자인 NPTII와 GUS 유전자를 가지고 있으므로 GUS 유전자의 CaMV35S promoter 부분을 HindIII, BamHI으로 잘라내고 본 연구에서 clone된 6개의 promoter deletion fragments를 cloning 하였다.

2) 담배의 형질전환과 형질전환체의 분석

(1) Agrobacterium 내로 Plant expression vector의 형질

전환 : 본 연구에서 분석하고자 하는 6개의 예비 promoter를 pBI121 vector의 GUS gene 앞에 cloning 하여 각 promoter별 GUS의 발현량을 조사하고자 freeze-thaw method를 이용하여 Agrobacteria strain LBA4404에 도입하였다. LBA4404의 균주를 overnight culture하여 원심분리한 후 200 μ l, 20 mM CaCl₂에 녹이고, 제조한 벡터 DNA를 약 2 μ g 넣은 후, 액체 질소에서 5분, 37°C에서 5분간, 2회 반복하여 1 ml, YEP medium을 첨가하여 28°C에서 overnight 배양을 한 다음 kanamycin (100 μ g/ml)이 포함된 YEP (pH 5.6) 배지 (Bacto-peptone 1%, Bacto-yeast extract 1%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)에서 키웠다.

(2) 담배의 형질전환 : 담배 종자를 2% sodium

hypochloride에 15 min간 살균하여 증류수로 5회 세척 후 1/2MS media, 87×15 mm petri dish에 파종하였다. 2주 후 식물체가 5엽기가 되었을 때 Magenta 병에 이식하여 2,000 lux, 26 °C 그리고 낮/밤이 14/10 hr인 생장실 조건에서 생장시킨 담배를 형질전환 재료로 사용하였다. 담배 잎 절편을 1×1 cm 크기로 잘라 callus 유도용 고체배지 (CIM)에서 YEP medium에 28 °C에서 36시간 동안 culture한 6개 Agrobacteria 균주를 5 min 동안 shaking 하며 liquid coculture 하였으며 CIM solid media에 26 °C 조건에서 2일 동안 두어 solid cocultivation 하였다. Cocultivation 후 담배 잎 조각들을 멸균 증류수에 5회 세척하고, carbenicillin 250 mg/l 농도에 세척하여 SIM 배지로 옮겨 shoot를 유기하였다.

Shoot는 SIM 배지에 옮긴 후 2-3주 후에 출현하였는데 이를 SEM 배지에 옮겨 shoot가 자라고 본엽이 3-4개 나왔을 때 RIM 배지로 옮겨 root를 유도하였다. 그리고 RIM 배지에 옮긴 후 10 - 14일이 지나서 뿌리가 발생하는데 이를 pot에 옮겨 뿌리의 활착을 유도하였으며 pot에서 2 - 3 주 생장시킨 후 PCR 분석과 GUS 분석을 실시하였다. 그리고 담배 형질전환에 사용된 배지의 조성은 표 2-1에 나타내었다.

(3) 형질전환된 담배의 DNA 분리와 PCR 분석 : RIM 배지에서 pot로 옮기기 전에 주위의 잎을 채취하여 CTAB 방법으로 genomic DNA를 분리하고 PCR과 Southern blot 분석으로 형질전환체를 확인하고자 하였다. PCR 반응은 pBI121-KF1으로 형질전환된 식물체에서 DNA를 추출하여 1 μ l (5U/ μ l) TaKaRa Taq, 1 μ l dNTP mixture(2.5 mM), 5 μ l 10×PCR Buffer, 1 μ l (0.05 μ m)의 forward와 reverse

Table 2-1. The components of each medium.

CIM	SIM	SEM	RIM
1/2MS salt	MS salt	MS salt	1/2MS salt
BA 1 mg/L	BA 1 mg/L	BA 1 mg/L	Km 100 mg/L
IAA 0.1 mg/L	IAA 0.1 mg/L	IAA 0.1 mg/L	Cb 500 mg/L
	Km 200 mg/L	Km 100 mg/L	
	Cb 500 mg/L	Cb 500 mg/L	

CIM; callus inducing medium, SIM; shoot inducing medium, SEM; shoot elongation medium, RIM; root inducing medium.

primer, 41 μ l 초순수 물로 전체가 50 μ l가 되도록 양을 맞추었다. 그리고 PCR primer는 KF1, KR1을 사용하였고, PCR 반응은 MJ research의 minicycler를 사용하여, 94°C 3분 그리고 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 3분, 35 cycle 반응시킨 후 72°C에서 7분간 extension시켜 PCR 반응을 시켰는데 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 그 크기를 확인하였다. 그리고 pBI121-KF2, KF3, KF4, KF5, KF6로 형질전환된 식물체들도 PCR로 형질전환여부를 확인하였으며, GUS 분석의 재료로 사용하였다.

(4) 형질전환된 담배에서 GUS 유전자 발현의 조직학적 분석

: pBI121KF1 - pBI121KF6으로 형질전환된 담배의 잎을 채취하여 2 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -glucuronide), 50 mM sodium phosphate pH 7.0의 GUS staining 용액에 37°C 약 12시간 반응시킨 후, ethanol을 사용하여 chlorophyll을 제거하고 X-gluc로 염색된 부분을 실체 현미경으로 관찰하였다.

(5) GUS 유전자 발현의 형광발색의 분석 : pBI121-KF1으로 형질전환된 담배의 잎과 control 담배의 잎을 MS 배지에 올려놓고 UV를 15분간 조사하고 24시간 후에 0.5 g의 잎을 1 ml의 extraction buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.0, 10 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1% triton X-100)에 homogenization 후 상등액을 GUS activity 분석에 사용하였으며, 이 중 20 μ l의 crude enzyme에 2 mM MUG 200 μ l를 혼합한 후 37°C에서 0시간과 1시간을 반응시켰으며, 0.8 ml의 Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 GUS에 의해 MUG가 MU로 분해되었을 때 이들을 365 nm (Excitation), 455 nm (Emission) 파장에서 형광을 측정하였다.

3. In vitro mutagenesis에 의한 Elicitin mutant 개발과 생물검정

가. Elicitin의 *in vitro* mutagenesis

Promega사의 Altered sites II in vitro mutagenesis kit을 사용하여 Back and Chappell (미국 켄터키대학)로부터 분양 받은 elicitin (parasiticein)을 pALTER-1 vector에 실어 necrosis activity에 관련된 것으로 생각되는 13번 amino acid alanine을 valine으로; 68번 amino acid proline을 alanine으로 point mutation 시켰다. 그 외 mutation시킬 amino acid는 지금까지 알려진 elicitin의 necrosis activity를 기준으로 시행하였다.

나. Mmutant elicitins의 *E. coli* expression

상기 방법에 따라 mutation 시킨 elicitins gene을 *E. coli* periplasmic expression vector (Novagen)에 subcloning 하고 제한 효소와 sequencing으로 확인한 후 *E. coli* host strain인 BL21에

transformation 시켰다. Plasmid를 LB medium에 배양하고 cell의 생장이 OD₆₀₀ = 0.3에 도달하면 IPTG를 처리한 후 27 °C에서 5시간 동안 배양한 다음 medium층과 periplasm 층의 추출물을 사용하여 담배 및 고추의 잎에 감염시킨 후 necrosis activity를 측정하였다.

다. Elicitin mutants로부터 elicitin의 정제

Back 등 (미발표)의 연구방법에 따라 PCR 기법을 이용하여 elicitin gene의 카복실 말단에 6 histidine amino acid를 추가하여 periplasmic vector에서 발현시켜 6 histidine을 함유한 elicitin protein을 periplasmic 층에서 추출하여 Ni⁺² column을 통하여 recombinant elicitin 을 정제하였다.

라. 정제 Elicitin 처리에 의한 식물잎의 괴사활성 검정

정제된 elicitin protein을 여러 농도로 희석하여 절단한 담배 및 고추잎에 감염시켜 상온에서 2 ~ 3일 배양한 후 괴사정도를 측정하였다.

4. 5-EAS specific promoter + Elicitin gene construct 작성

상기 시험에서 클로닝한 gCASC 25와 34의 1 ~ 1.5 kb 크기의 promoter 부분과 여러 가지 elicitin을 이용하여 gCASC promoter + Elicitin construct을 작성한 후 pBI121에 클로닝 하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 5-*epi*-aristolochene synthase (EAS)의 클로닝 및 동정

가. cDNA library 작성

고추 잎 (수비초품종)에 UV-C (>260nm)을 처리한 후, 고추 잎으로부터 phenol/chloroform 방법으로 total RNA를 추출후, Qiagen사의 mRNA Isolation Kit 을 이용하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 3 μ g 상당의 UV-C에 유도된 mRNA를 template로 사용하여 미국 Strategene 사의 λ Zap-cDNA Library Kit을 이용, primary titer이 2×10^5 plaques에, recombination 율이 95% 되는 매우 우수한 cDNA library를 작성하였다.

나. cDNA library로부터 Sesquiterpene cyclases의 Cloning

UV를 처리한 고추에서 발현되는 sesquiterpene cyclase polypeptide는 담배의 5-*epi* aristolochene synthase (TEAS) monoclonal antibody에 대해 cross reactivity를 나타내어 이들 간에는 상당한 homology를 갖고 있음을 알았다. 이와 같은 사실은 UV를 처리한 고추에서 TEAS gene을 probe로 사용하여 고추의 sesquiterpene cyclase gene을 분리할 수 있다는 것을 나타내고 있다.

담배의 sesquiterpene cyclase (TEAS)을 방사성 동위원소 p^{32} -dCTP로 labeling한 후 cDNA library를 screening하는 probe로 사용하였다. 200,000 plaques을 screening한 결과 13개의 positive plaques을 획득하였다. 이들을 한꺼번에 in vivo excision 방법을 통해 pBluscript vector로 바꾼 후 plasmid mini prep을 한 후

EcoRI 과 XhoI로도 절단한 결과 1.2 - 2.0 kb 정도 크기의 inserts
을 확인할 수 있었다 (그림 2-1).

이들을 UV-Duralon membrane에 transfer한 후 담배의
sesquiterpene cyclase를 probe도 이용하여 DNA blot을 수행한 결
과, 이들 모두가 담배의 cyclase와 강하게 cross hybridization 되
는 것을 보아 screening한 이들 cDNA clones들이 고추에서 발현되는
sesquiterpene cyclase임을 추정할 수 있었다 (그림 2-2).

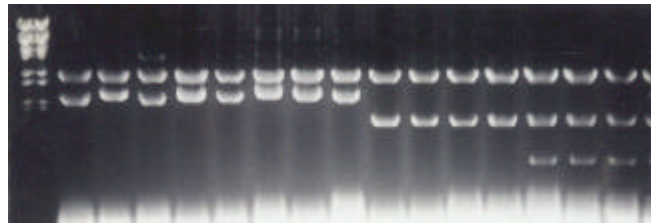
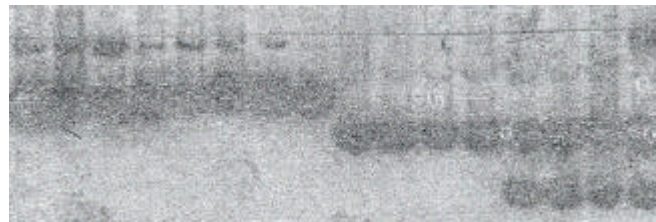


Fig. 2-1. Positive clones digested with EcoRI and XhoI showing 3.0kb pBluscript and various size of inserts. N; molecular size marker.



Figures 2-2. DNA blot analysis of positive clones.

EcoRI 과 XhoI으로 절단한 결과 1.2 - 2.0 kb 정도 크기의 inserts 을 확인할 수 있었다 (그림 2-1).

이들을 UV-Duralon membrane에 transfer한 후 담배의 sesquiterpene cyclase을 probe로 이용하여 DNA blot을 수행한 결과, 이들 모두가 담배의 cyclase와 강하게 cross hybridization 되는 것을 보아 screening한 이들 cDNA clones들이 고추에서 발현되는 sesquiterpene cyclase임을 추정할 수 있었다 (그림 2-2).

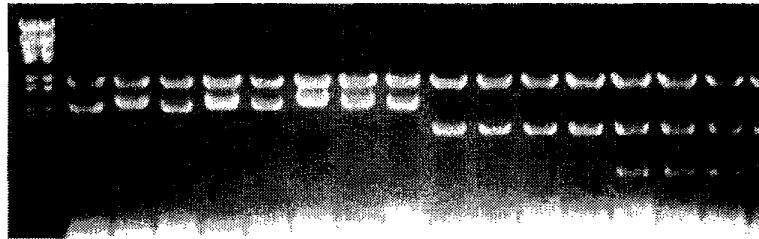


Fig. 2-1. Positive clones digested with EcoRI and XhoI showing 3.0kb pBluscript and various size of inserts. M; molecular size marker.

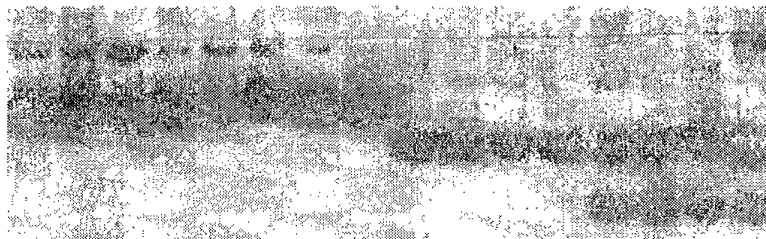


Figure 2-2. DNA blot analysis of positive clones.

Positive clones 중에서 두 개의 cDNA clone (CASC1과 CASC2)을 선별하여 분석하였는데, CASC1은 1,918 bp로서 30 bp의 5'-UTR region, 1,680 bp의 ORF, 268 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 65,095 Da의 분자량을 가진 559-deduced amino acid polypeptide는 TEAS와 77%의 identity를 보였다(GenBank accession number AF061285). CASC2는 1,941 bp로서 41 bp의 5'-UTR region, 1,683 bp의 ORF, 217 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 64,907 Da의 분자량을 가진 560-deduced amino acid polypeptide는 CASC1과 77%, TEAS와 74%, vetispiradiene과 71%의 identity를 보였다 (GenBank accession number AF212433). 고추의 sesquiterpene cyclase는 다른 terpenoid synthases와 같이 substrate binding site로 알려진 DDXXD motif를 가지고 있었다.

다. Genomic DNA library 작성

고추 품종 수비초의 genomic DNA를 추출하여 EcoRI으로 partial digestion한 후 EcoRI fragments을 λ EMBL4 (Stratagene)의 corresponding site에 삽입하여 고추 genomic DNA library를 작성하였다.

라. gDNA library screening

고추에서 분리한 sesquiterpene cyclase cDNA를 probe으로 사용하여 수비초 genomic library를 screening 하였다. 약 20 만개의 phage plaque 중에서 11개의 positive signal을 보이는 plaque를 선별하였고 이들을 pUC18 vector에 subcloning하여 염기서열을 분석하였다.

1) Sesquiterpene cyclase 유전자의 Labelling

pBluescript-SK vector에 cloning된 sesquiterpene cyclase cDNA (CASC1)를 EcoRI, XhoI로도 digestion하여, 약 2 kb fragment를 gel에서 GeneClean kit을 이용하여 순수 분리하였다. 분리된 fragment, 약 100 ng을 Amersham사의 Megaprime random labelling kit을 이용하여 α - P^{32} -dCTP도 labelling하였으며 이를 수피초 genomic DNA library를 screening 하는데 probe로도 사용하였다 (그림 2-3).

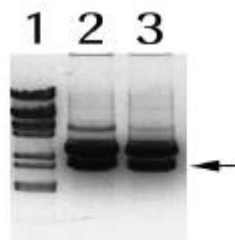


Fig. 2-3. The probe of sesquiterpene cyclase cDNA for genomic DNA library screening. Lane 1 : λ BstEII digested size maker, Lane 2, 3 : pSK-sesquiterpene cyclase was digested with EcoRI, XhoI. Arrow indicates the probe size.

2) 고추 Genomic DNA library의 1st and 2nd screening

고추 genomic DNA library를 CASC1을 probe로 screening하여 positive signal을 보이는 plaque를 1st screening에서 50개를 선발하였다 (그림 2-4). 그리고 이들 50개의 plaque를 각각 SM media에 elution하여 2nd screening을 실시하였다. 2nd screening의 방

1) Sesquiterpene cyclase 유전자의 Labelling

pBluescript-SK vector에 cloning된 sesquiterpene cyclase cDNA (CASC1)를 EcoRI, XhoI으로 digestion하여, 약 2 kb fragment를 gel에서 Geneclean kit을 이용하여 순수 분리하였다. 분리된 fragment, 약 100 ng을 Amersham사의 Megaprime random labelling kit을 이용하여 α -P³²-dCTP로 labelling하였으며 이를 수비초 genomic DNA library를 screening 하는데 probe으로 사용하였다 (그림 2-3).

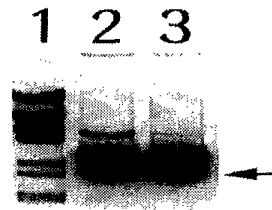


Fig. 2-3. The probe of sesquiterpene cyclase cDNA for genomic DNA library screening. Lane 1 : λ BstEII digested size maker, Lane 2, 3 : pSK-sesquiterpene cyclase was digested with EcoRI, XhoI. Arrow indicates the probe size.

2) 고추 Genomic DNA library의 1st and 2nd screening

고추 genomic DNA library를 CASC1을 probe로 screening하여 positive signal을 보이는 plaque를 1st screening에서 50개를 선발하였다 (그림 2-4). 그리고 이들 50개의 plaque를 각각 SM media에 elution하여 2nd screening을 실시하였다. 2nd screening의 방

법은 1st screening 방법과 같게 하였으며 1st screening에서 positive signal보인 50개 중에서 11개의 plaques가 2nd screening 과정에서 선발되었다 (그림 2-5).

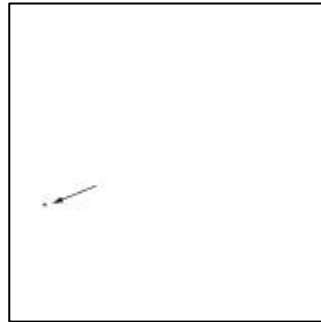


Fig. 2-4. The 1st screening of Subicho genomic DNA library. Arrow indicates positive signal.

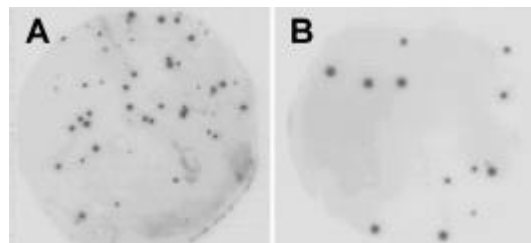


Fig. 2-5. The 2nd screening of Subicho genomic DNA library. A: 2nd screening of the phage No. 2, B: 2nd screening of the phage No. 34.

3) Screening된 phage의 Southern blot 분석

Screening한 phages에서 분리한 DNA를 EcoRI로도 digestion 하여

법은 1st screening 방법과 같게 하였으며 1st screening에서 positive signal보인 50개 중에서 11개의 plaque가 2nd screening 과정에서 선발되었다 (그림 2-5).

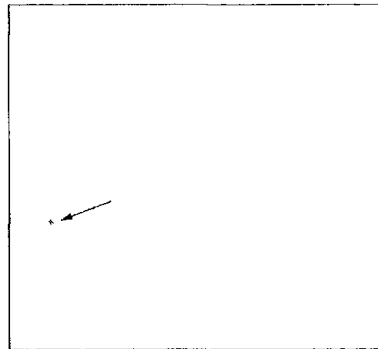


Fig. 2-4. The 1st screening of Subicho genomic DNA library. Arrow indicates positive signal.

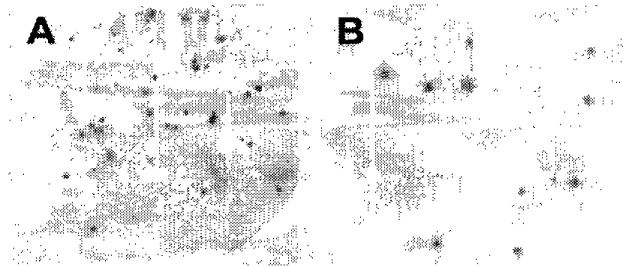


Fig. 2-5. The 2nd screening of Subicho genomic DNA library. A: 2nd screening of the phage No. 2, B: 2nd screening of the phage No. 34.

3) Screening된 phage의 Southern blot 분석

Screening한 phages에서 분리한 DNA를 EcoRI으로 digestion 하여

0.7% agarose gel에 전기 영동한 후 sesquiterpene cyclase cDNA (CASC1)를 probe로도 Southern blot 분석하고 (그림 2-6, 2-7), 이들 phage 들과 sesquiterpene cyclase 유전자간에 homology가 있는지를 확인하였다.

바. cDNA와 gDNA의 sequencing

1) Positive cDNA clones의 Sequencing

분리한 cDNA clones의 plasmid를 대당 정제한 후 (Qiagen), Sequenase v2.0 (USB)을 사용하여, T3, T7 primers를 이용하여 insert genes들의 N- or C- termini 부분을 sequencing한 결과 2개

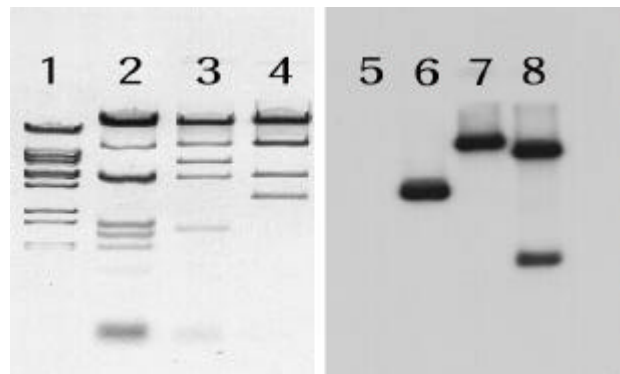


Fig. 2-6. The Southern blot analysis of 3 genomic clones.
 Left: Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested phage DNA. 1; λ BstEII size marker, 2; phage no.1, 3; phage no. 4, 4; phage no. B.
 Right: Southern blot analysis of 3 phage clones; 5: λ BstEII size marker, 6; phage no. 1, 7; phage no. 4, 8; phage phage no. B.

0.7% agarose gel에 전기 영동한 후 sesquiterpene cyclase cDNA (CASC1)를 probe으로 Southern blot 분석하고 (그림 2-6, 2-7), 이들 phage 들과 sesquiterpene cyclase 유전자간에 homology가 있는지를 확인하였다.

마. cDNA와 gDNA의 sequencing

1) Positive cDNA clones의 Sequencing

분리한 cDNA clones의 plasmid을 대량 정제한 후 (Qiagen), Sequenase v2.0 (USB)을 사용하여, T3, T7 primers을 이용하여 insert genes들의 N- or C- termini 부분을 sequencing한 결과 2개

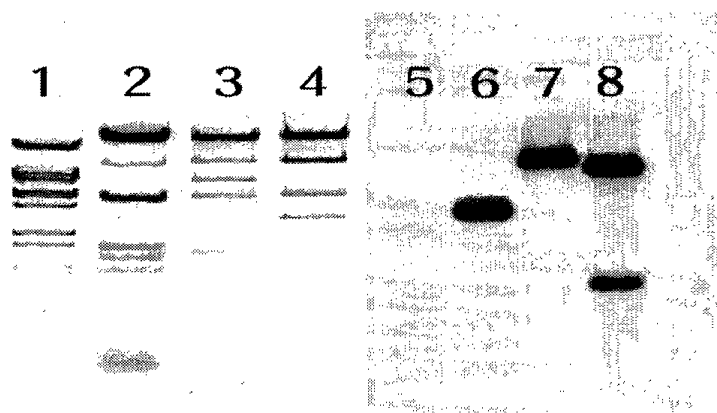


Fig. 2-6. The Southern blot analysis of 3 genomic clones.
 Left: Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested phage DNA. 1: λ BstEII size marker, 2: phage no.1, 3: phage no. 4, 4: phage no. 9.
 Right: Southern blot analysis of 3 phage clones: 5: λ BstEII size marker, 6: phage no. 1, 7: phage no. 4, 8: phage no. 9.

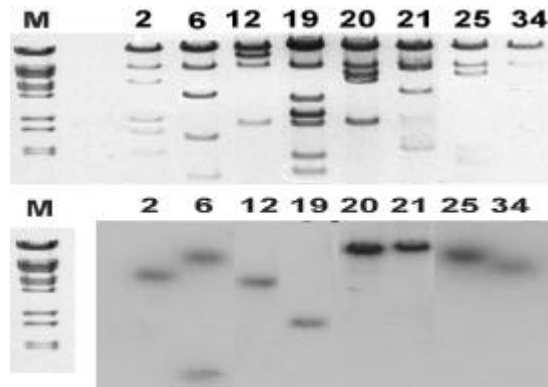


Fig. 2-7. The Southern blot analysis of B genomic clones.
 Top: Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested phage DNA.
 M; λ BstE11 size marker, 2; phage no. 2, 6; phage no. 6, 12;
 phage no. 12, 19; phage no. 19, 20; phage no. 20, 21;
 phage no. 20, 25; phage no. 25, 34; phage no. 34.
 Bottom: Southern blot analysis of B phage clones

의 서도 다른 3-UTR (3' untranslated region) sequence을 보임에 따라, 이들 16 clones 중 가장 큰 insert (= 2.0 kb)을 가진 2개의 clones (CASC1 and CASC2)을 대상으로 internal primers 작성 및 subcloning을 수행하였다.

이 sequence data을 Blast Search도 기존 보고된 genes 등과 homology search를 한 결과, 지금까지 동정된 terpene cyclases와 상당히 높은 homology을 보여 (>70%), 이 cDNA clones이 고추에 발현되는 sesquiterpene cyclase 임이 확실함을 알 수 있었다 (GenBank accession no. AF061285, AF212433).

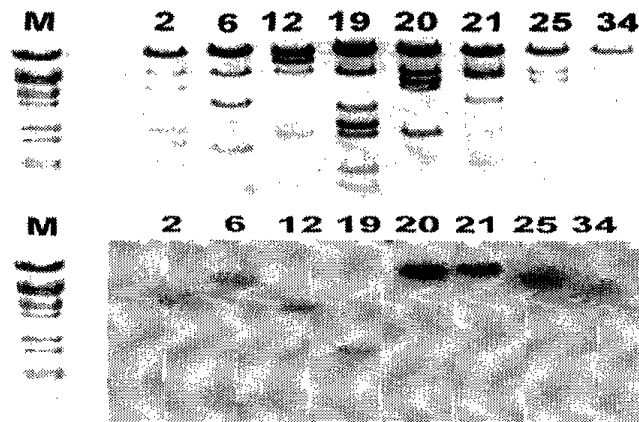


Fig. 2-7. The Southern blot analysis of 8 genomic clones.
 Top: Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested phage DNA.
 M: λ BstEII size marker, 2; phage no. 2, 6; phage no. 6, 12;
 phage no. 12, 19; phage no. 19, 20; phage no. 20, 21;
 phage no. 20, 25; phage no. 25, 34; phage no. 34.
 Bottom: Southern blot analysis of 8 phage clones

의 서로 다른 3-UTR (3' untranslated region) sequence을 보임에 따라, 이들 16 clones 중 가장 큰 insert (= 2.0 kb)을 가진 2개의 clones (CASC1 and CASC2)을 대상으로 internal primers 작성 및 subcloning을 수행하였다.

이 sequence data을 Blast Search로 기존 보고된 genes 들과 homology search를 한 결과, 지금까지 동정된 terpene cyclases와 상당히 높은 homology을 보여 (>70%), 이 cDNA clones이 고추에 발현되는 sesquiterpene cyclase 임이 확실함을 알 수 있었다 (GenBank accession no. AF061285, AF212433).

AF061285 1918 bp mRNA
***Capsicum annuum* sesquiterpene cyclase (CASC1) mRNA**

1 aacagcagta ctcttattat ctgaagcaac atggcctcag ttgcagttga aaataatgtt
61 gtgaaccata ttgcagaaga gatcattcgc cctggtgccg acttttctcc aagtctatgg
121 ggtgatcgtt tcctttcttt ctccatcgac aaccaggctc aaacaaagta tgc tcaagaa
181 attgaaccgt tgaaggaaca aacaaggagt atgttgtag catccggaag gaaattgtc
241 gagacattga atttgattga tgttattgaa cgtcttgga tagcctatca ctttgagaaa
301 gaaatcgatg agattttggg tcggatttac aatgaaaatt caaacttoga gggcgaatgc
361 tataatgaag atctatgcac ttgtcgtctc caattccgat tgcttaggca acatggatat
421 aatatctctc taaaaatttt cagcaaattc ctagatggaa atggcagact caaggagtct
481 cttgctagtg atgtcctagg attattgagc ttgtatgaag cttcacatgt aaggctctcat
541 ggtgaagaca tcttagaaga tgcaactcgt ttctccacta ctcatctaga gctcgaact
601 ccacatttgg aatatcctct taaggagcaa gtgaggcatg cccttgagca atctttgcac
661 aaaggatttc ctogaattga gattcaattc ttcatctcat cggctctacga caagcaggca
721 ataagaatg atgtgttact togatttccc aaattggatt acaacatgct ccaaatgctg
781 cacaaacaag aacttgctga agtatcacgg tggtaggaaag atttaaattt tgtgaacaca
841 cttccatag cttagatag agtagttgaa tgctactttt gggcattagg agtatattat
901 gagcctcaat attctcaagc tcgtgtcatg ctagttaaga ccatagcaat gatttcgatt
961 gtggatgaca cctacgatgc ttatggtaca gttgacgaac ttgcatata cacggatgct
1021 atacaaagat gggatattaa agaaattgat agtctgcctg attacatgaa aatcagttac
1081 aaagctcttc tagatcttta caaggactat gaaaaggaaa tglctagaga tggagatct
1141 cacgtgtttt attacgaaa agaaagactg aaagaattgg taaaaagta taatatgg
1201 gcaaatgggt ttattgaagg acatatgcct cctgcttctg aatacctgoc caatgcattt
1261 gtaactacca cttactacta tcttgccaca acatcgtatt tgggaalgaa gtatgctaag
1321 gagcagcaat ttgagtgggt gtcgaaaaat cctlaagattc ttgaaggttg tgtgacaata
1381 tgccgagtta ttgatgacat agccacatac gaggtagaga aaaatagggg acaacttca
1441 actggaattg agtgcacat gagagattat agtgcacga caaaagaggc aatggctaaa
1501 tttcaagaaa tgggtgagtc gggatgggag gatattaatg aaggaaatgct taggcccact
1561 cccataccta tggagttttt atctgcatt ctcaatcttg ctcgacttgt tgacgttaca
1621 tataaacaca atgaagatgg atacactcat cccgagaaag tcataaaacc tcacatcatt
1681 gccatggttg ttgactcgtt caaaatttaa gctccaate gttggtctta ataaaattt
1741 ttcgagaaag taatatgttt ttatcattat tattcggata aaaattcaat ggagcttcat
1801 ttgtagtgtg gcagtcatt gccaaaattt atttatttt ttcatatgt catttctcc
1861 ttgtacacct caagtcgacc atttgaagtt tctaacttag tatggttcat attgactt

AF212433 1941 bp mRNA
***Capsicum annuum* UV-induced sesquiterpene cyclase (CASC2)**
mRNA,

```
1  ggcacgagga agcaaaaaca ctcttattat ttgttgcaac aatggcctca gctatagttg
61  acaataatth tgtgaacat attgaagaag aagaagagat cattcgcccc gtcgccaact
121  tgcctccaag tctatggggc aatagtttcc ttcttttctc catcaacaat cacgttgaaa
181  caaagtatgt tcaagagatt gaagtgttga aggaacaaac aaggagtatg ttgttagata
241  ctggaaggaa attggttgag acattgaatt tgattgatgt tattgaacgt ctggcctatg
301  cctatcacta tgaanaagaa atcgatgata tcttgaaaaa aaatttctta gacaattcaa
361  actttgacga agatgacttt aatgatttat gcacctgtgc tcttcaattt cgattgctta
421  ggcaacatgg ttacaagatc tctcttaaaa ttttcagcaa attacaagat gaaaatggca
481  aactcaagga gtctcttgcg agtgatgtct taggattatt gagcttgtat gaagcttcac
541  atgtaaggac tcatggtgat gacatcttag aagacgcact tgctttctcc actactcact
601  ttgagtccgc agctccacat ttgaactctc ctcttaagga gcaagtgaca catgcccttg
661  agctttcttt gcacaagggt attcctcagc ctgagactcg attcttcact tcatcaatct
721  acgagaagca ggaacaaaag aatgatgtgc tacttcgatt tgccaaattg gatttcaact
781  tgctccagat gttgcacaaa caagaacttg ctgaagtatc aaggtaggtg aaagatttga
841  atttcatggc aacacttcca latgctagag acagagcagt tgaatgctac ttttggacat
901  taggtgtcta ttatgagcct caataticac aagctcgcct catgcttgct aagaccatag
961  ctatgatttc aattgttgat gacacctttg attcttatgg tacagtcaaa gaacttgaca
1021  cttacaccaa tgcatacaa agatgggata tcagtgaat tgatagactc cctgattata
1081  tgaanaatcag ttataaaget cttctacaac tttatgaaga ttatgaaaag gaattgtcta
1141  gcaatggaag atctcatgtc gtttatcatg caaaacaaag aatgaaagaa atagtgagga
1201  gttataatgt cgaggcaaga tggtttatca aaggacatat gccacttgtt tctgagtatc
1261  taagcaatgc attaataaact agcacttatt acttgctcac aacaacatca tatttgggca
1321  tgaagtcttc tacagaacag gattttgagt ggttgtcaaa gaatcctaaa attcttaaga
1381  ctaatgcgac tatatgtcga gttattgatg acatagccac atatgaggtc gaaaaagta
1441  ggggagaaat tgcaacagga attgagtgtc acaggagaga gtatgggtga tcaactgaag
1501  agggaatgat taantttagt gaaattcgtg aagcagcatg gaaggatatt aatgaaggaa
1561  tgctaaggcc ctcttctgta actatggagt ttttaactcc tattctcaat ctgttctgtc
1621  ttattgatgt tgtatataaa cacaatcaag atggatatac tcatcoggag aaagttttaa
1681  aacctcatat tgttgcctt ctgtggact ccatcaaaa ttgagcttcc aatagttgag
1741  aaagtacaaa atatgttgtt aaataaagtt gcacttccta actaggacct ccttaaaccc
1801  tegtgaagaa taatgtaca agcttctttt gttctttatg tcagaatgtc tggagtttct
1861  acttggatg gtcogataag tgacccact attttgaat catcagtata tgacttata
1921  taatattatg tcttctaac g
```

2) gDNA clones의 Sequencing

(1) Restriction map의 작성 : Second screening에서 선발된 phage no. 1, 2, 4, 6, 9, 12, 19, 20, 21, 25, 34를 제한효소로 절단하여 제한효소 지도를 작성하였다 (그림 2-8). 이들은 다양한 크기의 inserts를 가지고 있었으며 EcoRI으로 절단하여 Southern 분석한 결과 positive signal을 보인 fragments를 pUC18에 subcloning하여 BamHI, HindIII, PstI, XbaI의 제한효소로 절단하여 제한효소 지도를 작성하였다. 그리고 phage DNA를 EcoRI으로 full digestion 하였을 때 phage no. 2는 약 10 kb, phage no. 6은 6.5 kb, phage no. 12는 12 kb, phage no. 9는 10 kb, phage no. 20은 11 kb, phage no. 21은 13 kb, phage no. 25는 13 kb, phage no. 34는 12 kb의 insert를 가지고 있었다.

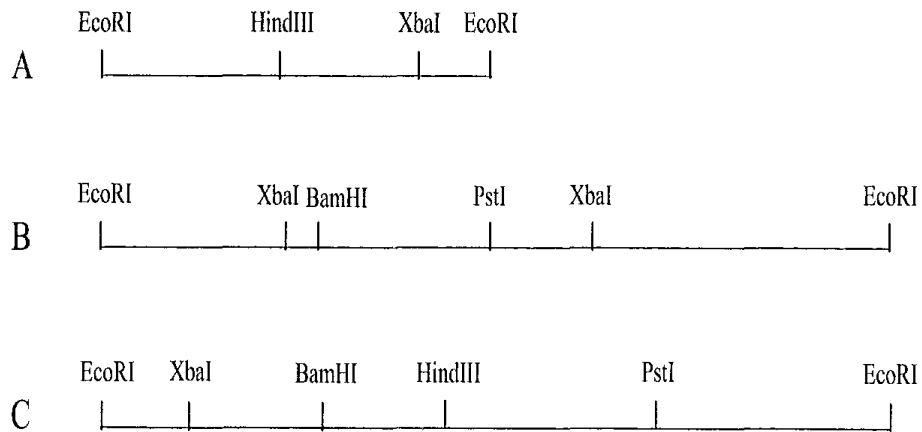


Fig. 2-8. Restriction maps for sesquiterpene cyclase genomic clones. A: Restriction map of phage no. 1, B: phage no. 4, C: phage no. 9

(2) Phage DNA의 subcloning : Second screening에서 positive signal을 보인 11개의 phage clone을 Southern blot 분석하여 sesquiterpene cyclase 유전자의 cDNA와 상동성 부위를 식별하였다. 그리고 상동성이 확인된 부위를 pUC18 EcoRI site에 subcloning하여 Southern blot 분석을 하였고, 여기에서 HindIII, KbaI, BamHI, PstI의 제한효소를 사용하여 pUC18에 subcloning한 후 이 clone을 염기서열 분석하는데 사용하였다 (그림 2-B).

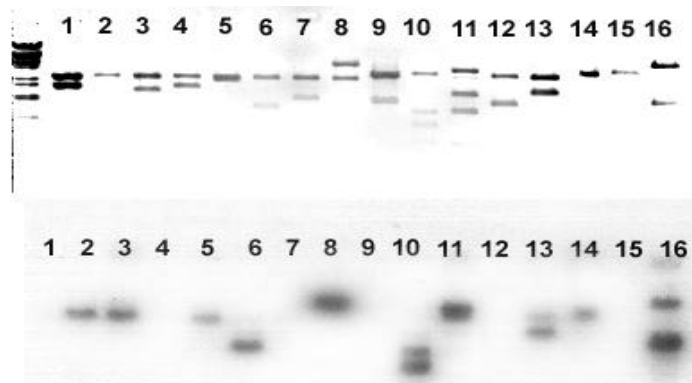


Fig. 2-B. The Southern blot analysis of phage no. 2, 6, 12, 18, 34.

Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : phage DNA was digested with EcoRI, Hind III. Lane 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 : phage DNA digested with BamHI, Hind III.

Top : Agarose gel electrophoresis of phage DNA was subcloned into pUC18. Lane 1, 2; phage no. 2, lane 3, 4; phage no. 6, lane 5; phage no. 12, lane 6, 7; phage no. 18, lane 8; phage no. 34.

Bottom : The Southern blot analysis of phage DNA subcloned into pUC18. Lane 9, 10; phage no. 2, lane 11, 12; phage no. 6, lane 13; phage no. 12, lane 14, 15; phage no. 18, lane 16; phage no 34.

(2) Phage DNA의 subcloning : Second screening에서 positive signal을 보인 11개의 phage clone을 Southern blot 분석하여 sesquiterpene cyclase 유전자의 cDNA와 상동성 부위를 식별하였다. 그리고 상동성이 확인된 부위를 pUC18 EcoRI site에 subcloning하여 Southern blot 분석을 하였고, 여기에서 HindIII, XbaI, BamHI, PstI의 제한효소를 사용하여 pUC18에 subcloning한 후 이 clone을 염기서열 분석하는데 사용하였다 (그림 2-9).

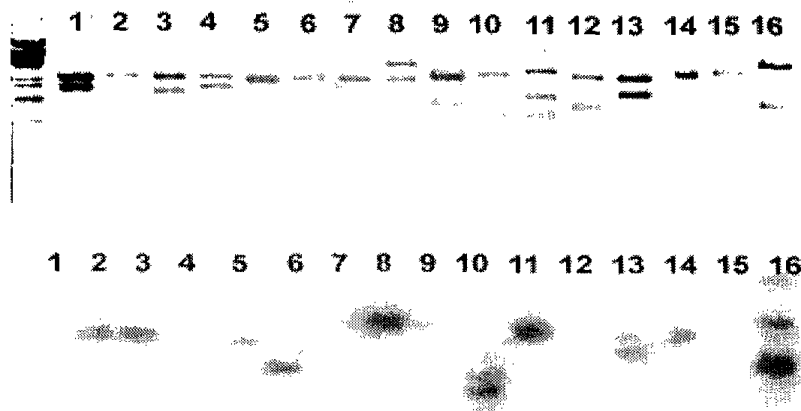


Fig. 2-9. The Southern blot analysis of phage no. 2, 6, 12, 19, 34.

Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : phage DNA was digested with EcoRI, Hind III. Lane 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 : phage DNA digested with BamHI, Hind III.

Top : Agarose gel electrophoresis of phage DNA was subcloned into pUC18. Lane 1, 2; phage no. 2, lane 3, 4; phage no. 6, lane 5; phage no. 12, lane 6, 7; phage no. 19, lane 8; phage no. 34.

Bottom : The Southern blot analysis of phage DNA subcloned into pUC18. Lane 9, 10; phage no. 2, lane 11, 12; phage no. 6, lane 13; phage no. 12, lane 14, 15; phage no. 19, lane 16; phage no 34.

(3) Sesquiterpene cyclase 유전자의 genomic clone 염기

서열 및 BLAST를 이용한 유전자의 분석 : Phage no. 2, 6, 12, 19, 20, 21, 25, 34의 structural gene 부분과 promoter 부위의 염기서열을 결정한 결과, NCBI : gb|AF061285 (*Capsicum annum* sesquiterpene cyclase mRNA)와 83 ~ 96%의 homology를 나타내었다. 결정된 염기서열을 분석한 결과 phage no. 2, 6, 12, 19, 20, 21은 대부분 coding region 이었으며 이중 phage no. 25, 34은 coding region과 약 5 kb, 4.3 kb의 promoter 부위를 포함하고 있어 이들의 염기서열을 결정하였다. Blast search 결과 promoter 부위는 기존에 clone된 유전자와 상동성이 없는 새로운 유전자인 것으로 나타났다 (그림 2-10, 그림 2-11, 그림 2-12). 그림 2-10에서는 phage no. 25의 blast search 결과, promoter 부분은 기존의 clone들과 상동성이 없으므로 homology 부분을 나타내지 않았으며, 구조부위에서는 본 연구에서 cloning된 sesquiterpene cyclase 유전자와 높은 상동성을 보여 주고 있다. 그림 2-10에서는 phage no. 34의 염기서열을 분석한 결과를 보여 주며, 역시 구조부위에서는 높은 상동성을 보이고, promoter 부위에서는 기존의 clone들과 상동성을 보이지 않았다 (그림 2-11). 선발된 genomic clones 중에서 phage no. 25는 gCASC 25, phage no. 34는 gCASC 34로 나타내었다.

본 연구에서 작성된 cDNA library는 UV가 처리된 고추의 잎에서 mRNA를 추출하였으므로 기존에 보고된 클론들과 상동성을 보이지 않는 promoter 영역은 식물의 환경 stress에 관련된 (병저항성과 깊은 관련이 있음) 새로운 유전자로 사료되며, 병원균이나 혹은 환경 stress가 식물에 작용할 때만 발현되는 promoter일 가능성이 높을 것으로 사료된다.

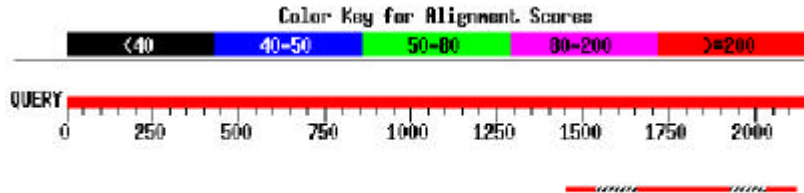


Fig. 2-10. Blast search of sesquiterpene cyclase promoter region. The DNA sequence of phage no. 25 was compared with NCBI data bank. The structural region (1400 -2000) has a highly homologous region of sesquiterpene cyclase gene however the promoter region has no homology of any other clones (1 - 1408)

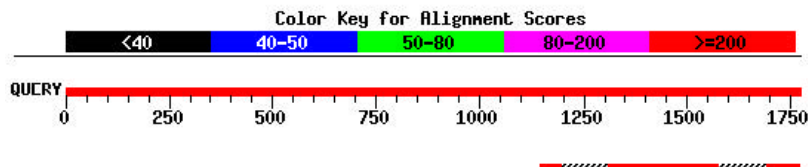


Fig 2-11. Blast search of sesquiterpene cyclase promoter region. The DNA sequence of phage no. 34 was compared with NCBI data bank. The structural region (1130 - 1750) has a highly homologous region of sesquiterpene cyclase gene however the promoter region has no homology of any other clones (1 - 1130).

2. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조 분석

가. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조

고추의 sesquiterpene cyclase 유전자의 구조를 분석한 결과 coding region의 homology가 85-85% 이상되는 isozyme이 최소한 5개

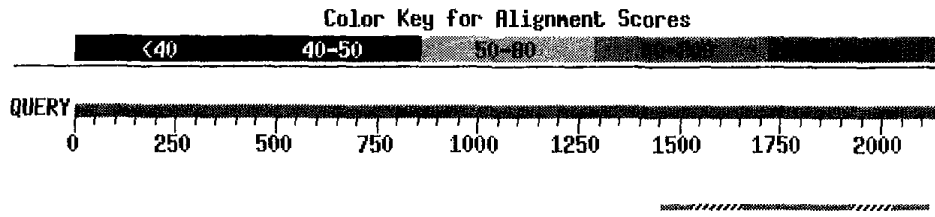


Fig. 2-10. Blast search of sesquiterpene cyclase promoter region. The DNA sequence of phage no. 25 was compared with NCBI data bank. The structural region (1400 -2000) has a highly homologous region of sesquiterpene cyclase gene however the promoter region has no homology of any other clones (1 - 1409)

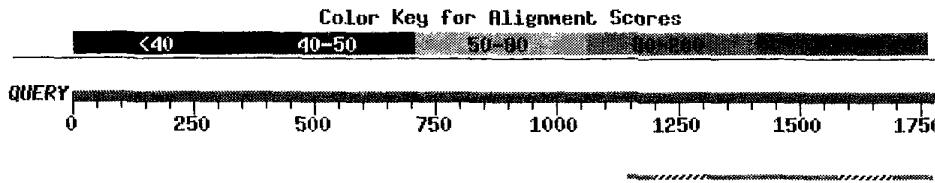


Fig 2-11. Blast search of sesquiterpene cyclase promoter region. The DNA sequence of phage no. 34 was compared with NCBI data bank. The structural region (1130 - 1750) has a highly homologous region of sesquiterpene cyclase gene however the promoter region has no homology of any other clones (1 - 1130).

2. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조 분석

가. 고추의 Sesquiterpene cyclase 유전자의 구조

고추의 sesquiterpene cyclase 유전자의 구조를 분석한 결과 coding region의 homology가 85-95% 이상되는 isozyme이 최소한 5개

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Probability P(N)	N
gb AF079169 AF079169	Nicotiana tabacum feedback-insen...	183	0.00024	1
gb U61952 CELF42A9	Caenorhabditis elegans cosmid F4...	166	0.0062	1
emb AL008637 HS833B7	Human DNA sequence from clone 83...	147	0.012	2
gb L04272 MSQNCATR	Anopheles quadrimaculatus NADH d...	161	0.016	1
emb AL031119 HS28C20	Human DNA sequence from clone 28...	157	0.034	1
gb AC005863 AC005863	Homo sapiens chromosome 17, clon...	152	0.086	1
gb AE001433 AE001433	Plasmodium falciparum chromosome...	151	0.17	2
gb AC005008.2 AC005008	Homo sapiens clone GS052G05, com...	148	0.18	1
emb AL010226 PFSCO4052	Plasmodium falciparum DNA *** SE...	148	0.18	1
gb U35791 AMU35791	Anopheles merus 12S ribosomal RN...	117	0.27	2
gb L04680 TOBSQPC	Nicotiana tabacum 5-epi-aristolo...	144	0.34	1
emb AL034560.3 PFMAL3P8	Plasmodium falciparum MAL3P8, co...	127	0.35	3
emb Z81551 CEF56A12	Caenorhabditis elegans cosmid F5...	143	0.40	1
emb AL031294 HS885E17	Human DNA sequence from clone 88...	143	0.40	1
gb U41541 CELC41A3	Caenorhabditis elegans cosmid C4...	142	0.46	1
gb AF025460 CELF53A3	Caenorhabditis elegans cosmid F53A3	141	0.52	1
emb Z98979 SPAC31G5	S.pombe chromosome I cosmid c31G5	141	0.52	1
dbj D43748 YSPAC2P	Yeast mRNA for Pac2p, complete cds	141	0.52	1
gb AC002336 ATAC002336	Arabidopsis thaliana chromosome ...	141	0.52	1
emb Z99290 HS299C21	Human DNA sequence from PAC 299C...	134	0.55	2
emb X95276 PFCOMP1RB	P. falciparum complete gene map o...	131	0.57	3
gb U06974 GSU06974	Gasteruption sp. mitochondrion l...	140	0.59	1

Fig. 2-12. Blast search result of the promoter sequence of gCASC 34.

이상 존재 할 것으로 사료된다. 이런 이유로는 coding region의 homology search 결과, 11개의 phage clone 중 phage 6번, 9번은 같은 clone으로 사료되지만 그 외는 모두 coding region에서 유전자의 염기서열이 상이함을 보였다. Phage no. 34를 분석한 결과, 그림 2-13에서 나타낸 바와 같이 6개의 exon과 5개의 intron이 존재하

는 것으로 나타났다. 그리고 phage no. 20, 21을 분석한 결과 phage no. 34와 매우 유사한 genome 구조를 가지고 있으나 phage no. 20, 34와 phage no. 20의 두 번째 intron이 117 base, 107 base로 차이가 있었으며, 4번째 exon에서 phage no. 34가 219 base 였으나 phage no. 20, 21에는 exon 4가 356 base로 크게 차이가 있었으며, 4번째 intron에서 121, 134로 차이가 있었다. 5번째 exon 역시 392 base, 256 base으로 두 개의 isozyme 중에서 가장 상이한 부분으로 나타났다. 그리고 phage no. 34, 20, 21에서 3번째 intron이 74 base 였으나 phage no. 2에서는 134 base로서 phage no. 20, 21의 4 번째 exon과 같은 크기를 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 고추의 sesquiterpene cyclase 유전자는 최소한 3개 이상의 상이한 genome 구조를 가지고 있으며, 이들은 또한 5', 3' UTR region이 상이할 것으로 사료된다. 그리고 이 유전자들의 promoter 부분 역시 매우 상이할 것으로 생각되어 고추의 sesquiterpene cyclase가 expression 될 때 시간적, 공간적으로 조절되어 병저항성을 나타내는 것으로 추정된다. 본 연구에서는 지금까지 11개의 genomic clone을 sequencing하여 유전자의 구조가 상이함을 밝혔다.

EXON1	INTRON1	EXON2	INTRON 2	EXON3	INTRON3	EXON4	INTRON4	EXON5	INTRON5	EXON6
165	111	285	117	376	74	219	121	392	115	500

Fig. 2-13. Genome structures of *C. annuum* sesquiterpene cyclase gene, gCASC 34.

나. 병원균 특이 Promoter의 분석

1) Promoter 부위의 염기서열 분석

gCASC 25와 gCASC 34의 염기서열을 분석한 결과 개시코돈 부위로부터 상위 각각 1409 bp와 상위 1062 bp의 sequence를 얻었다 (그림 2-14, 그림 2-15). 이들 promoter 부위가 식물의 stress 혹은 pathogenesis related 유전자의 조절부위의 특이한 motif를 가지고 있는지 알기 위하여 PAL (Lois et al. 1989), CHS (Harrison et al 1991), IFR (Oommen et al. 1994), PR I (Uknes et al. 1993), Ethylene-responsive (Ohme and Shinshi et al. 1995) 등의 motif들과 비교 분석하였다. gCASC 25와 gCASC 34는 GLB (AGCCGCC), ethylene-responsive, dehydration-responsive element (TACCAACATC-GG), G-box (CACGTG), C-box (ACGAGCAGCACC), pathogenesis-related protein의 sequence motif들을 가지고 있지 않았으나, 유사한 PAL motif (CTCCAACAAACCCCTTC)와 H-box (CCTACC), IFR motif (GGATTT-TGTTTTTCAGTTGCCA), PRI (TAAGAGCCGCC), ASF (Haresnape, 1989), myb-box, mybst 1 (Baranowskij et al., 1994), TCA motif 등을 가지고 있는 것으로 나타났다 (그림 2-14, 그림 2-15). 따라서 본 연구에서 cloning된 sesquiterpene cyclase의 promoter 영역은 stress에 관련된 motif들을 많이 포함하고 있었으며 이로 미루어 볼 때 식물의 환경 stress나 병원균에 감염되었을 때만 발현하는 특이적인 promoter일 가능성이 큰 것으로 사료되었다.

2) Promoter sequence 간의 Homology 비교 분석

Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter 영역은 gCASC 25에서 1,049 bp, gCASC 34에서 1,162 bp를 얻어 이들의 상동성을 비교하였

다. Translational start site부터 gCASC 25 sequence의 -139, gCASC 34 sequence의 -135 base에 TATA box가 존재하였고 -285 base 까지는 두 clone 간에 높은 상동성을 나타내었다. 이 부분의 promoter 영역을 region A라 정하였는데, 이들이 UV 혹은 stress에 직접적으로 반응하는 motif를 포함하고 있는 것으로 사료된다 (그림 2-16). Region A에서는 -232 ~ -226 사이에 PAL motif인 CTCCTAAA를 포함하고 있었으며, -357 ~ -346 사이의 CHS motif, mybst (-378 ~ -374), PRI (-56 ~ -50) 등 stress와 관련된 motif들을 포함하고 있는데, 이는 sesquiterpene cyclase 발현에 특이적인 sequence라고 사료된다. 그리고 Region B 는 약 100 bp의 상동성이 높은 sequence를 보여 주었는데 gCASC 25에서는 -762 ~ -663 bp 위치에 존재하고 있었으며, gCASC 34에서는 -412 ~ -313 위치에 존재하고 있어 이 부위가 고추의 phytoalexin인 capsidiol 생성에 중요한 역할을 하는 sesquiterpene cyclase 발현 조절에 시간적 혹은 공간적으로 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

그리고 특히 조직부위별 유전자 발현은 일반적으로 promoter 영역 1 kb 이내에 존재하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 promoter 부위를 1 kb만 sequencing 하였다. 본 연구에서 cloning한 promoter 영역 내에서 stress에 특이적으로 발현하는 motif들이 존재함을 발견할 수 있었고, 아직 보고되지 않은 특이적 염기서열인 region A와 region B가 capsidiol의 생성에 결정적인 역할을 할 것으로 사료된다.

-1409	AAAAATG TCATCT TATAACCTATTAATACTACTCTACTTAATTACAA	-1363
-1362	AAGGTATAAGGTACCACTAAGCTAACTTTTAAAAATTTAAAAATG TCATCT	-1313
-1312	<u>TGTT</u> TATTCAGTATTGGTGCAGTCATGACCGAACACTCAGCATCTTGCA	-1262
-1262	AATATGTTTCGTGTGAATGTCAAGTGGGGCA ACTGG AAAAATATTTAAAA	-1213
-1212	ATCAATTGTCAGTTTCTTACATCTTTCAGTCTTTAATAATAGTAGATAA	-1163
-1162	ATTTTCATAAGAGGGGGTATCCTACAAATATGTTCTGTATTATAAGGTC	-1113
-1112	AAGTGAGGCA ACTGAT GGGAGAAAAGATTAATATATATATGGAGTCTCAT	-1063
-1062	TCTGTTAATCAAGCGATTTAACTTCTTTTAAAAAGTTAATATAAATATT	-1013
-1012	TCCAGCTAGGGCGATCCTAAGAAAGGTTAAGACTACGCCCTCTTTAAAGT	-963
-962	TAATAGTATAATCTAGACTGGGGTGAGGGTGGGGGAGGTAATTTGCGCC	-913
-912	TATATAACA ACTTGTAA ATCATACGAGAGAGATATATAGATTGCATTAGG	-863
-862	CAAGTTAATACGATGAGCTTATGAAAAGTGTCCCATTTCTATCGATG	-813
-812	CATGGAAAAGTCATAGATAACACAAAAACTGGGGGAACAGTAAATTAAG	-763
-762	TCCTTGATCGGCAAGCTGAAAAGTCTCGAAGAACAATAGAATGAAAAAAA	-713
-712	ATTGAACTTTTATAATGACAAATAATTTTAGTTAGAGGAATAATTTTGT	-663
-662	TTTGTAGAGTTCTAAGTTAAATTCAGTCTTAGAAACAGAACAAAGGCAA	-613
-612	GAAACAGAGAAAGTATTTGTTGAAGGAAAAAGAACAGAGAAAGTATTTG	-563
-562	TACTTGAAAGCTATTTTTTTCATTGAACTGAAATGCGCTTAAATAGAA	-513
-512	AAAATGCAACAATCAAATCCTATAATTAAGCAATTA ACTTGT ACATGATT	-463
-462	CCATGATCAGCACATCCTAAAACTGAACCATTAACACTTAAAAACAGC	-413
-412	AACTAACTAAGTTGAGAACATGACTTAAAACTGGATAATGTCGAGCAA	-363
-362	CTATTC CTACT TTTTACTGCAGAAAGTGAGGCAACAAGCAACAAGTTTCA	-313
-312	AAAACGCTGCTGCCTATAGTATGTATAGTCAAAGTAAGGCAACAATTAC	-263
-262	TTATTAGATAAATAAGGTTATATATACTCCTCCAAAATTGAAAAAGAAAA	-213
-212	TGGCTATGCTGACAGTCAACATGCATACAACCTTAAAAAAGAACAGAAAAT	-163
-162	TGGTTGTGTGCCCTTACCACACT TATA AATACTTGTCTTTGTCTCCATT	-113
-112	TATGCCATCAGTTTCAAATTAAGAAATTACATTCCTTCTCCTTCAGTTT	-63
-62	TCAAAAT TAAGAT TACATTCTTTGTCTTAAAAAGAGAAGAAATTACTA	-13
	TCATTTTTAGCA ATG GCCTCAACTGCAGTTTACAATAATAAAGTTAACC	

Fig. 2-14. DNA sequence of gCASC 25 promoter region.

A putative TATA sequence is found at -139 relative to the transcription start site and is indicated by bold letters. this sequence have similarity to the TCA motif (-1402 ~ -1387, -1318 ~ -1299), PAL (-232 ~ -226), PR I (-1155 ~ -1148, -56 ~ -50), IFR (-932 ~ -928), Heat-Shock(-739 ~ -731), CHS(-357 ~ -346), myb motif (-1233 ~ -1228, -1104 ~ -1099), mybst 1 (-378 ~ -374) recognition sequences are underlined.

-1062	GCACTCACAATGAGGATCTGAATCTCGAAGAATTATTGAAAACCCACAGT	-1013
-1012	GAAATCTTGAGATATTTTGATCTTTGGGTTGAAAAGTTCATGGTGATTTTG	-963
-962	AGAGAGAATGACCTTATTTTGGTGTTGGGGGATTTAATCCCGTGTTATG	-913
-912	CCTGAACAGGGGGTGGAAATTACCACCTTTTCCCTTAAAAATGCAAAAAC	-863
-862	AGGACCTAAAAATTGGGTGCATGCGATAGAGCGTGAGTCACACGCTAATC	-813
-812	GCGCAATGCTACTGTTTCAGTCACGAAAAATGGCCATAACTTTTGTCTCAG	-763
-762	ATATCGGATTTTGGCATAAATAGTATCGTTAGAAAGATAATTCGAAGAGA	-713
-712	TTTCATTTAATATATAGTAGGACCTCTAATTCGTTATATACAAAGAGTAA	-663
-662	TAGTCGATTCAATTTGACCCAAGTTTCGATGCTCATTCAAACTCGAATGA	-613
-612	TAGGAAAGTTTCAACTCGTCCTTGAGTTAGGGTACCTCTATTATCTCAA	-563
-562	TTCATGATCAAATAGGTTCCACACTACATGATTGATTAACATGCCAAAT	-513
-512	TTGCATAGGATTTATGGCTTTTGGATCATCTACACATAGAAATGACGGTT	-463
-462	TTCGTTCTAGCCCAGAAATGCGGGGTGTACAATAJTGATAAAGTCTTAGG	-413
-412	CTGGCAAGCTGAAAGTCTTGAAAAACAATTACTATTAAGAATAAAAATAAA	-363
-362	AATTTGAACTTGTATAATGACAAATTTTAGACAAATAATTTTGAGTA	-313
-312	GTTTTCAAATCCTCGCTGCCACTCTTGCAAGTATATAGTCAAAGTAAGG	-263
-262	CAACAATTATTATATAAGTTAATATCTTCCAAATTTGAATTAAGAAAAT	-213
-212	ATGACTATGCTCACAGTCAACTTACATACAACAAAAAATATTAGAAAAT	-163
-162	TTATTGTATGTCCTATACCACACT TATAT TATACTTGCTCTTTGTCTTCCA	-113
-112	TTTAAGTCATCAGCTCTCAACTTAAGTGTTACTTACTTGTTTCTTCCATA	-63
-62	TTTAAGTTAAGTGTTACATTCTTTATTACTTAAAATAAGAAGAAACTT	-13
-12	TCATATTTAGCAATGGCCTCAACGGCAGTT	18

Fig. 2-15. DNA sequence of gCASC 34 promoter region.

A putative TATA sequence is found at -138 relative to the transcription start site and is indicated by bold letters. Heat-Shock (-1028 ~ -1020, -621 ~ -609), TCA motif (-487 ~ -477, -106 ~ -94), IFR (-932 ~ -928, -757 ~ -750, -505 ~ -550), ASF motif(-470 ~ -466) recognition sequences are underlined.

Region A

-312	AAAAC CGCTGC TGCCTATAGTATG TATAGTCAAAGTAAGGCAAACAATTAC GTTTTCAAATCCT CGCTGC CACTCTTGCAAG TATATAGTCAAAGTAAGG	-263
-262	TTATTAGATAAATAAG GTTAT ATATACTCC TCCAAA ATTGAAAAGAAAA CAACAATTATTATAAGTTAATATCTTCCAAATTTGAATTAAGAAAAAT	-213
-212	TGGCTATGCTGACAGTCAACATGCATACAAC TTAAAA GAACAGAAAAAT ATGACTATGCTCACAGTCAAC TTACATACA CAAAAAATATTAGAAAAAT	-163
-162	TGGTTGTCTGTCCCTTACCACACTATAAA TACTTGTCTTTGCT CTCCATT TTATTGTATGTCCTATACCACACTATA TACTTGTCTTTGCT CTCCAA	-113
-112	TATGCCATCAGTTTTCAAATTAAGAA TACATTCTTTCTT CTTCAGTTT TTTAAGTCATCAGCTCTCAACTTAAGTGTAGTTACTT GTTT CTTCATA	-63
-62	TCAA ATTAAGAGTTACATTCTTT GTTC CTTAAAA GAGA AGAAATTACTTA TTTAAG TTAAGTGTACATTCTTT TACTT AAAAATAAGAAGAAATACTTT	-13
-12	TCATTTTTAGCAATGGCCTCAACTGCAGTT TCATTTTTAGCAATGGCCTCAACGCAGTT	18

Region B

-762	TCCTTGATC GGCAAGCTGAAAGTCTCGAAG AACAATAGAAT GAAAAAAA	-713
-412	CT GGCAAGCTGAAAGTCTTGAAAACAAT TACTATTA GAATAAAATAAA	-363
-712	ATTGAACTTTTATAATGACAAATAATTTTAC TTAG AGGGAATAATTTTGT	-663
-362	AATTTGAACTTGTATAATGACAAAT TATTTAG ACAAATAATTTTGAGTA	-313

Fig. 2-16. Highly homologous sequence between gCASC 25 (up strand) and gCASC 34 (down strand). The promoter regions were divided into region A and B that showed highly homologous sequence between phage no 25 and phage no 34. Identical sequences are represented as white-on-black letters.

3) Sesquiterpene cyclase promoter 분석을 위한 PCR primer 제작

Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter를 분석하기 위하여 region A와 region B를 각각 나누어 PCR primer를 제작하였다. Promoter 부위는 gCASC 25와 gCASC 34에서 6개의 deletion clone을 얻을 수 있도록 하였으며, region A를 포함하는 280 bp 크기의 clone과 region B를 포함하는 1 kb clone, specific motif를 포함하는 410 bp 크기의 clone들을 PCR로 증폭할 수 있도록 primer를 제작하였다. Promoter region의 clone들을 β -glucuronidase 유전자를 가지고 있는 plant expression vector인 pBI121 vector에 cloning 하기 위해 PCR primer forward에는 HindIII, reverse 방향에는 BamHI의 제한 효소 site를 넣어서 제작하여 PCR 반응에 사용하였다 (그림 2-17, 2-18, 2-19, 2-20).

```
KReverse 1 5' - TCg_gAT_CCT gCT AAA TAT gAA AgT AT - 3'
KForward 1 5' - TCA_AgC_TTg CAC TCA CAA TgA ggA TC - 3'
KForward 2 5' - TCA_AgC_TTA gTA ggA CCT CTA ATT Cg - 3'
KForward 3 5' - TCA_AgC_TTg gCA AgC TgA AAg TCT Tg - 3'
KForward 4 5' - TCA_AgC_TTT ATA TAg TCA AAg TAA gg - 3'
```

Fig. 2-17. Oligonucleotide of PCR primers containing two unique restriction enzyme sites (Hind III: AAGCTT, BamH I :GGATCC) for phage no 34.

```
KReverse 2 5' - TCg_gAT_CCT gCT AAA AAT gAT AgT AA - 3'
KForward 5 5' - TCA_AgC_TTA AAA ATT gAA CTT TTA TA - 3'
KForward 6 5' - TCA_AgC_TTA gTA Agg CAA ACA ATT AC - 3'
```

Fig. 2-18. Oligonucleotide of PCR primers containing two unique restriction enzyme sites (Hind III: AAGCTT, BamH I :GGATCC) for phage no 25.



Fig. 2-19. PCR primer regions in gCASC 34.

Arrows indicate the region of PCR primers used for PCR reaction.

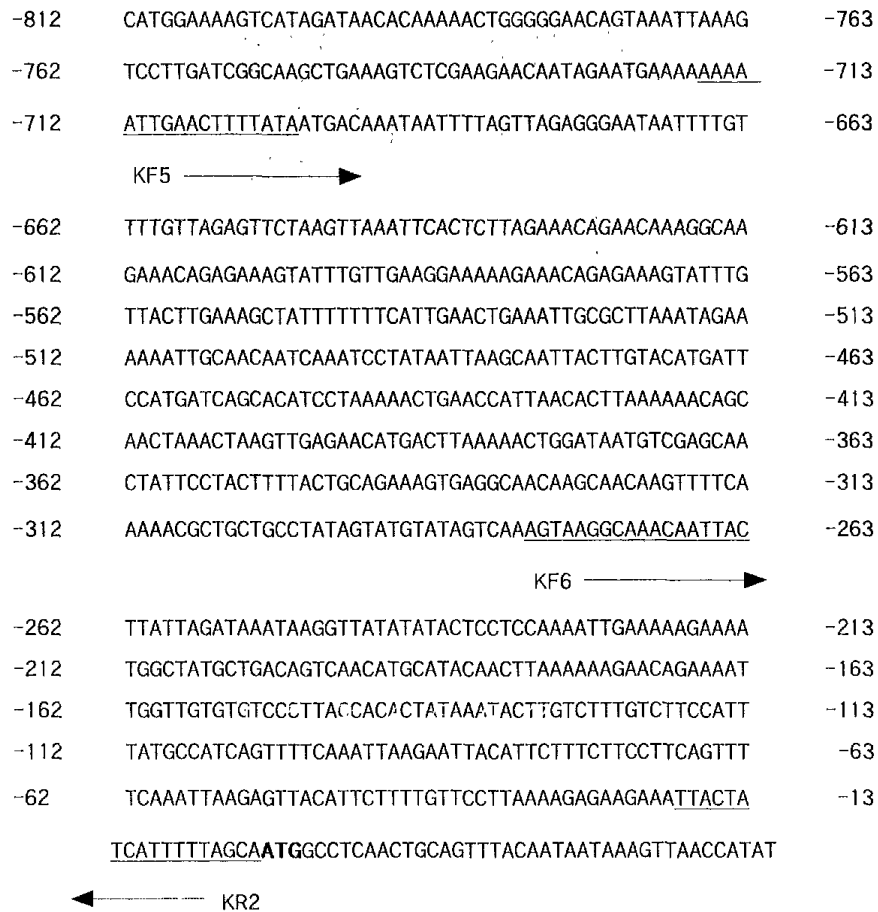


Fig. 2-20. PCR primer regions in gCASC 25.

Arrows indicate the region of PCR primers used for PCR reaction.

4) PCR 반응 및 Promoter 단편의 획득

gCASC 25와 gCASC 34에서 6개의 deletion clone을 얻을 수 있도록 PCR 반응을 시켜 그림 2-21에서와 같이 deletion clones을 얻었다.

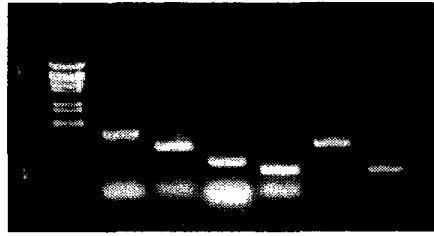


Fig. 2-21. Agarose gel electrophoresis of PCR products.
 Lane 1, λ BstEII digested size marker; Lane 2, KF1; Lane 3, KF2; Lane 4, KF3; Lane 5, KF4; Lane 6, KF5; Lane 7, KF6.

다. 형질전환을 통한 Promoter의 기능 분석

1) Plant expression vector에 Promoter 부위의 Deletion fragments의 Cloning

HindIII, BamHI site가 포함된 primer를 이용하여 만들어진 PCR 산물들을 plant expression인 pBI121 (CLONTECH, Inc) (그림 2-22)의 HindIII, BamHI site에 cloning하였다. pBI121 vector는 T-DNA 부분에 kanamycin 저항성 유전자인 NPTII와 GUS 유전자를 가지고 있으므로 GUS 유전자의 CaMV 35S promoter 부분을 HindIII, BamHI으로 잘라내고 본 연구에서 clone된 (그림 2-23) 6개의 promoter deletion fragments을 cloning 하였다. 그리고 이들을 Agrobacterium host인 LBA4404를 이용하여 담배에 형질전환 시켰다. 만약 이들 promoter들이 정상적으로 작동하게 되면 UV와 환경 stress에 의하여 GUS의 발현량이 많아 질 것으로 기대된다. 그리고 6개의 promoter 부위에 elicitor 유전자를 연결하였으며, 고추에 형질전환 효율을 높이기 위하여 selective marker를 kanamycin과 hygromycin을 동시에 사용하였다.

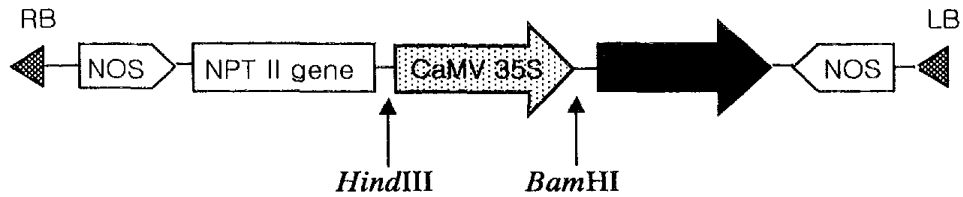


Fig. 2-22. The GUS cassette with CaMV 35S promoter in pBI121.

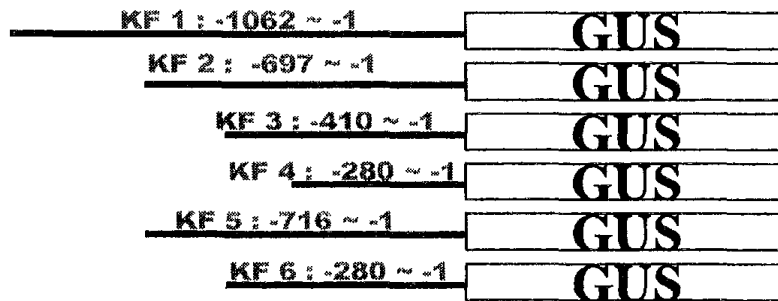


Fig. 2-23. Vector construction for promoter analysis

2) 담배의 형질전환과 형질전환체의 분석

Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter 부분을 deletion fragment로 만들어 담배에 형질전환 시킨 후 이들이 식물체 내에서 promoter의 역할을 하는지 구명하기 위하여 담배 형질전환 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 담배의 형질전환체를 분석하여 6개 clone들이 UV에 의해 발현되는지를 측정하고 이들 data를 분석하여 고추형질전환에 필요한 가장 적당한 promoter를 선택하고자 하였다.

(1) Agrobacterium 내도 Plant expression vector의 도입 :
 pBI121 vector의 CaMV 35S promoter 부위를 HindIII, BamHI로 잘라
 내고 본 연구에서 분석하고자 하는 6개의 예외 promoters를 GUS
 gene 앞에 cloning 하여 각 promoter별 GUS의 발현량을 조사하고자
 Freeze-thaw method를 이용하여 Agrobacteria strain LBA4404에 도
 입하였다. 그리고 Promega사의 plasmid prep kit (Wizard SV
 Plasmid prep kit)를 사용하여 DNA를 분리하였으며 PCR과 agarose
 gel에 전기영동하여 transformant를 확인하였다 (그림 2-24).

(2) 형질전환된 담배의 DNA 분리와 PCR 분석 : 담배 형질전
 환 식물은 그림 2-25에서 나타낸 바와 같이 여러 단계를 거쳐 만든
 후 형질전환된 식물체의 잎을 채취하여 CTAB 방법으로도 genomic DNA
 를 분리하고 PCR과 Southern blot 분석으로도 형질전환체를 확인하고
 하였다. pBI121-KF1 ~ KF6 까지 여러 가지의 promoter 부위를
 포함한 10 개 이상의 putative transformants를 확보하였으며, 이들
 식물체에서 CTAB 방법으로도 DNA를 분리하여 PCR 방법으로도 형질전환체
 를 확인하였다 (그림 2-26).

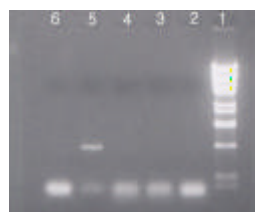


Fig. 2-24. Agarose gel electrophoresis of PCR products of pBI121-KF2.

(1) Agrobacterium 내로 Plant expression vector의 도입 : pBI121 vector의 CaMV 35S promoter 부위를 HindIII, BamHI로 잘라내고 본 연구에서 분석하고자 하는 6개의 예비 promoters를 GUS gene 앞에 cloning 하여 각 promoter별 GUS의 발현량을 조사하고자 Freeze-thaw method를 이용하여 Agrobacteria strain LBA4404에 도입하였다. 그리고 Promega사의 plasmid prep kit (Wizard SV Plasmid prep kit)를 사용하여 DNA를 분리하였으며 PCR과 agarose gel에 전기영동하여 transformant를 확인하였다 (그림 2-24).

(2) 형질전환된 담배의 DNA 분리와 PCR 분석 : 담배 형질전환 식물은 그림 2-25에서 나타낸 바와 같이 여러 단계를 거쳐 만든 후 형질전환된 식물체의 잎을 채취하여 CTAB 방법으로 genomic DNA를 분리하고 PCR과 Southern blot 분석으로 형질전환체를 확인하고자 하였다. pBI121-KF1 ~ KF6 까지 여러 가지의 promoter 부위를 포함한 10 개 이상의 putative transformants를 확보하였으며, 이들 식물체에서 CTAB 방법으로 DNA를 분리하여 PCR 방법으로 형질전환체를 확인하였다 (그림 2-26).

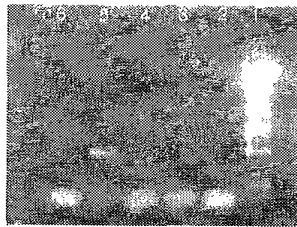


Fig. 2-24. Agarose gel electrophoresis of PCR products of pBI121-KF2.

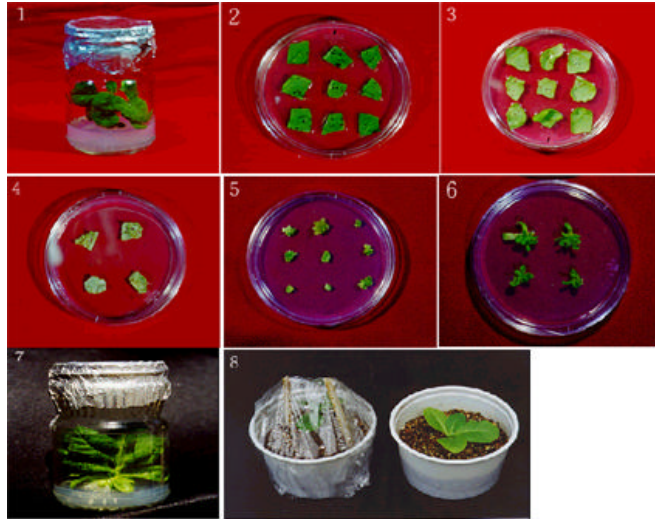


Fig. 2-25. Development of transgenic tobacco plants.

1. Explant grown on MS medium, 2. Explants before cocultivating with *Agrobacterium*, 3. Explants after cocultivating with *Agrobacterium* on CIM, 4. Callus grown on CIM containing kanamycin, 5. Bud grown on SIM, 6. Shoot grown on shoot elongation medium, 7. Maturing transgenic plants on root inducing medium B. Transgenic plants growing in pot.

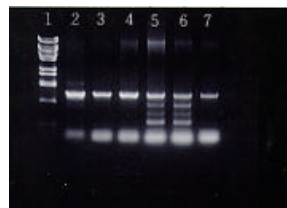


Fig. 2-26. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

Lane1: λ BstE11 digested size marker Lane 2~7: putative transgenic plant of pB1121-KF1. Detection of pB1121-KF1 gene from the total DNAs of regenerated tobacco plant. PCR product was separated on a 1.2 % agarose gel.

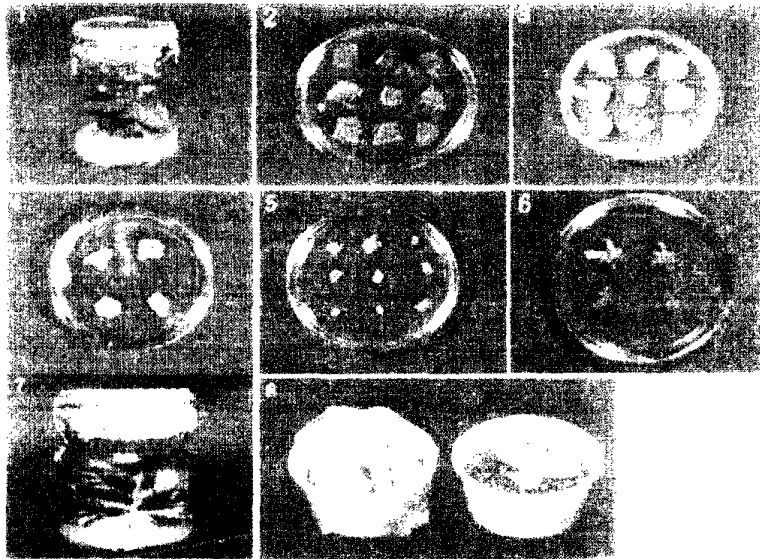


Fig. 2-25. Development of transgenic tobacco plants.

1. Explant grown on MS medium, 2. Explants before cocultivating with *Agrobacterium*, 3. Explants after cocultivating with *Agrobacterium* on CIM, 4. Callus grown on CIM containing kanamycin, 5. Bud grown on SIM, 6. Shoot grown on shoot elongation medium, 7. Maturing transgenic plants on root inducing medium 8. Transgenic plants growing in pot.

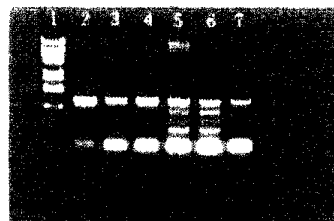


Fig. 2-26. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

Lane1: λ BstEII digested size marker Lane 2~7: putative transgenic plant of pBI121-KF1. Detection of pBI121-KF1 gene from the total DNAs of regenerated tobacco plant. PCR product was separated on a 1.2 % agarose gel.

(3) 형질전환된 담배에서 GUS 유전자 발현의 조직학적 분석

: pBI121-KF1 ~ pBI121-KF6으로 형질전환된 담배의 잎을 채취하여 GUS staining 용액에서 반응시킨 후, X-gluc로 염색된 부분을 실체 현미경으로 관찰하였다 (그림 2-27). pBI121-KF1 부터 pBI121-KF6 까지 GUS로 staining된 부분을 관찰하였을 때 pBI121-KF3과 pBI121-KF6으로 형질전환된 담배의 잎에서 staining이 가장 진하게 되었고, pBI121-KF1, pBI121-KF2, pBI121-KF4, pBI121-KF5은 연하게 staining 되었다 (그림 2-27). 이 결과로 미루어 보아 본 연구에서 cloning된 promoter 부분은 그 길이에 따라 GUS의 발현 정도가 다르게 나타났다. 즉 promoter에 포함된 어떤 염기서열이 cis element로 작용하는 것으로 사료되며, promoter의 길이에 따라 환경 stress 또는 병저항성에 관여하는 부분이 존재할 것으로 사료되고, promoter 부위에 따라 환경 stress 등에 민감하게 반응하는 부분과, 반응을 억제하는 부분이 존재함을 알 수 있었다. 그리고 분석에 사용된 잎에서도 형질전환시에 많은 hormone과 과도한 습기, 위치의 이동 등으로 많은 stress가 가해졌을 것으로 생각되고 이에 반응하여 GUS 유전자들이 발현한 것으로 사료된다.

(4) GUS 유전자 발현의 형광발색의 분석 : 조직학적 분석에서는 GUS의 발현이 양적으로 측정되기 어렵기 때문에 GUS의 발색반응으로 확인한 발현 정도를 형광발색 반응을 이용하여 양적으로 GUS 유전자의 발현을 측정하였다. 그리고 본 연구에서 cloning된 promoter 부분이 실제로 stress 혹은 병원균 등에 의하여 발현되는지를 알고자 형질전환된 담배의 잎을 UV 처리하여 GUS 유전자의 발현정도를 양적으로 측정하였다. pBI121-KF1으로 형질전환된 담배의

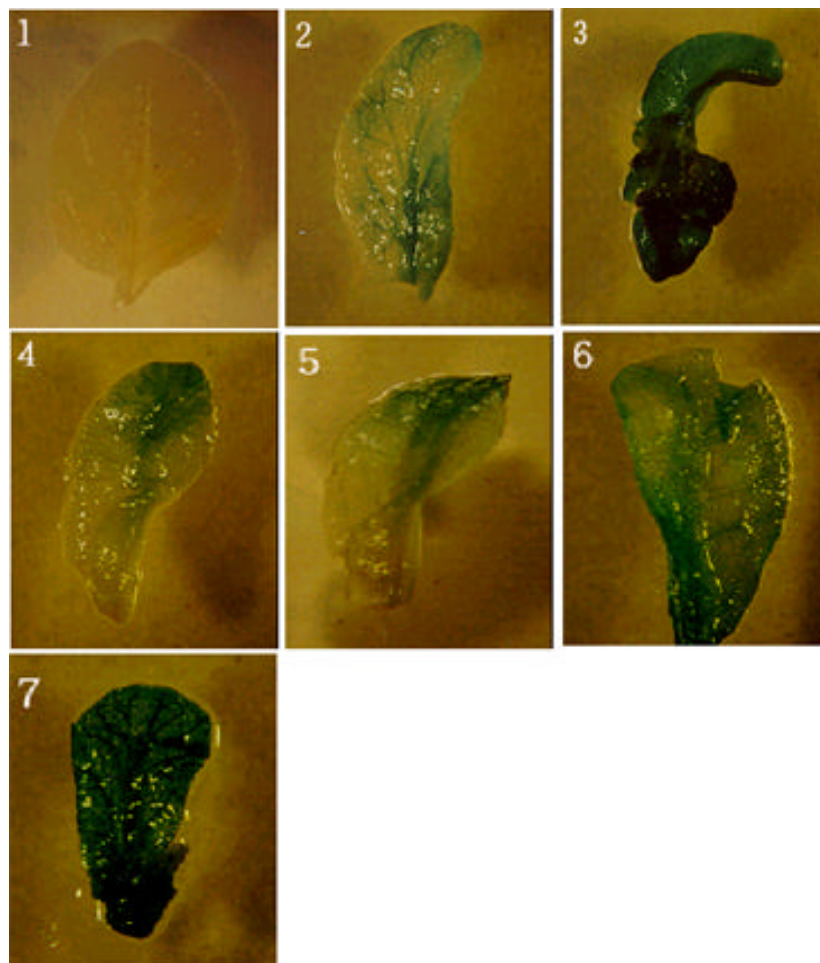


Fig. 27. Histochemical staining of transgenic tobacco leaves. GUS activities were compared to each transgenic tobacco plants. 1: Non-transgenic plant, 2: Transgenic plant with pB1121-KF1, 3: pB1121-KF2, 4: pB1121-KF3, 5: pB1121-KF4, 6: pB1121-KF5, 7: pB1121-KF6.



Fig. 27. Histochemical staining of transgenic tobacco leaves. GUS activities were compared to each transgenic tobacco plants. 1: Non-transgenic plant, 2: Transgenic plant with pBI121-KF1, 3: pBI121-KF2, 4: pBI121-KF3, 5: pBI121-KF4, 6: pBI121-KF5, 7: pBI121-KF6.

잎과 control 담배의 잎을 MS 배지에 올려놓고 UV를 15분간 조사하고 24시간 후에 GUS activity를 조사하였다. Non transgenic 담배에서는 UV와 같은 외부 환경의 stress를 가하였을 때 GUS 발현 양에 수치의 변화가 없었지만 pBI121-KF1으로 형질전환된 담배 잎의 경우, UV를 처리하지 않았을 때 GUS activity가 31 pmol MU/min/mg total protein 이었지만 UV를 처리한 잎에서는 2.45 배 정도인 76 pmol MU/min/mg total protein의 GUS activity를 나타내었다. pBI121-KF2, pBI121-KF3, pBI121-KF4, pBI121-KF5로 형질전환된 담배는 UV에 의해 발현되는 GUS 유전자의 발현 양이 거의 같거나 2배 정도 인데 비하여 pBI121-KF6에서는 UV에 의해 발현되는 GUS 유전자의 발현 양은 UV를 처리하지 않았을 경우의 21 pmol MU/min/mg total protein에 비해 75 pmol MU로 높았다 (표 2-2).

Table 2-2. GUS gene expression responding to UV treatment of 6 different CASC promoter in transgenic tobacco leaves.

Transgenic plants	Control (pmole/MU/min/mg protein)	UV treatment (pmole/MU/min/mg protein)	Induction (fold)
Non-transgenic plant	2	2	1
pBI121-KF1	31	76	2.45
pBI121-KF2	37.4	35	1
pBI121-KF3	50	63	1.3
pBI121-KF4	55	76	1.4
pBI121-KF5	49.5	93.6	1.88
pBI121-KF6	21	75	3.57

(5) 고추의 Sesquiterpene cyclase promoter의 분석 : 고추의 sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter 부분을 비교적 형질전환이 쉬운 담배에 발현시킴으로써 본 연구에서 얻은 여러 가지 promoter가 식물체에서 어떻게 발현되는지를 조사하였다. 본 연구의 목적은 고추에서 병 또는 환경 stress에 의해 발현되는 promoter 부분을 얻는 것이므로 형질전환이 용이한 담배를 이용하여 유전자의 발현 조사가 쉬운 GUS 유전자로 chimeric gene을 만들어 본 연구에 적합한 promoter 부분을 선발하고자 하였다. 유전자 발현에 관련된 부분은 크게 trans-factor와 cis-element로 나눌 수 있으며, 병저항성에 관련된 trans factor들은 이미 고추의 세포 내에 존재할 것으로 기대하고 cis element를 조작하고자 하였다. 표 2-2와 그림 2-27에서 나타난 결과들을 종합하여 보면, 본 연구에서 cloning한 promoter 부분이 UV에 의해 유도됨을 알 수 있다. 그리고 병 혹은 환경 stress에 관여하는 promoter 부분은 1070 bp 내에 존재하여 이 부분에서는 유전자 발현을 유도하고, 억제하는 부분이 모두 포함되어 있으리라 사료되며, 280 bp 크기의 KF6 promoter가 UV를 처리하였을 때와 UV를 처리하지 않았을 때 유전자 발현의 차이를 가장 많이 보여 이 부분이 HR을 유도하는데 사용하는 것이 적당하리라 사료된다.

3. *in vitro* mutagenesis에 의한 elicitin mutant 개발과 생물검정

가. *in vitro* mutagenesis elicitin

Phytophthora에서 생산되어 담배를 포함한 가지과 식물에 괴사(necrosis)를 유도하는 elicitin 단백질 (98 amino acids)을 coding하는 gene을 알려진 sequence에 따라 primers을 만들어

Phytophthora gDNA를 Template로 사용하여 PCR 기법으로 native gene을 확보, sequencing한 결과 보고된 elicitin gene 과 동일하였으며, 또한 300 bp 되는 이 gene을 합성 oligo을 이용, 식물체에서 흔히 사용되는 codon usage을 이용 native elicitin gene의 amino acid를 변화시키지 않고 nucleotide만 변화시켜 합성 elicitin gene을 만들었다. 합성 elicitin gene은 2개의 elicitin form으로 만들었다. β -elicitin은 13번 amino acid 위치에 lysine을, α -elicitin은 valine으로 치환하여 합성하였다.

나. Elicitin mutants로부터 Elicitin의 정제

Elicitin 처리에 의한 식물체 조직의 괴사 활성을 검정하기 위하여 Back 등의 연구방법에 따라 PCR 기법을 이용하여 elicitin gene의 카복실 말단에 6 histidine amino acid를 추가하여 periplasmic vector (pET22b)에서 발현시켜 6 histidine을 함유한 elicitin protein을 periplasmic 층에서 추출하여 Ni^{+2} column을 통하여 recombinant elicitin을 정제하였다.

Synthetic elicitin protein

β -elicitin	α -elicitin
M [*] ACTTTQQTAA Y KALVSILS	13번 위치에 Lysine이 Valine으로 치환됨
DTSFNQCSRDSGYMLTATS	
LPTTEQYKLMCASTACKTMI	
NKLVTLNPPDCELTVPSTGL	
VLNVFTYANGFSSTCASLE	

* Methionine은 mature elicitin에는 없으나 식물체나 E. coli 내에서 합성 elicitin gene을 발현시키기 위해 추가하였음.

다. 정제 Elicitin 처리에 의한 식물잎의 괴사활성 검정

상기 방법에 따라 정제된 elicitin 단백질의 괴사활성을 검정하기 위하여 고추 (수비초) 잎과 담배 잎을 따서 정제 elicitin을 10, 100, 500, 1000, 5000 nM의 농도도 20 μ l 물에 녹여 infiltration 시킨 후 언병이 물에 잠기게 하여 실온에서 3일간 배양한 후 잎의 괴사 정도를 조사하였다.

담배 잎의 경우 그림 2-28에서 보는 바와 같이 elicitin의 농도가 100 nM까지는 물의 경우와 같이 반응 증상이 없었으나 500 nM 이상에서 잎 조직의 괴사 현상을 관찰할 수 있었다. 그러나 고추 잎의 경우 담배와 같이 뚜렷한 반응을 보이지 않았다. 일반적으로 elicitins는 식물 조직의 방어 반응에 관여하는데 조직의 괴사 현상 유무는 종과 품종에 따라 다르게 나타난다고 보고되고 있다.

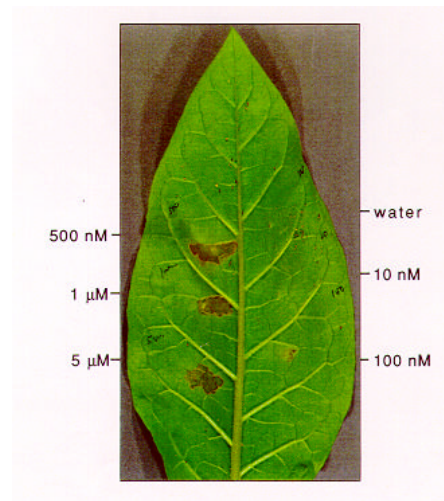


Fig. 2-28. Response of tobacco leaf to elicitin at different concentrations.

다. 정제 Elicitin 처리에 의한 식물잎의 괴사활성 검정

상기 방법에 따라 정제된 elicitin 단백질의 괴사활성을 검정하기 위하여 고추 (수비초) 잎과 담배 잎을 따서 정제 elicitin을 10, 100, 500, 1000, 5000 nM의 농도로 20 μ l 물에 녹여 infiltration 시킨 후 엽병이 물에 잠기게 하여 실온에서 3일간 배양한 후 잎의 괴사 정도를 조사하였다.

담배 잎의 경우 그림 2-28에서 보는 바와 같이 elicitin의 농도가 100 nM까지는 물의 경우와 같이 반응 증상이 없었으나 500 nM 이상에서 잎 조직의 괴사 현상을 관찰할 수 있었다. 그러나 고추 잎의 경우 담배와 같이 뚜렷한 반응을 보이지 않았다. 일반적으로 elicitins은 식물 조직의 방어 반응에 관여하는데 조직의 괴사 현상 유무는 종과 품종에 따라 다르게 나타난다고 보고되고 있다.

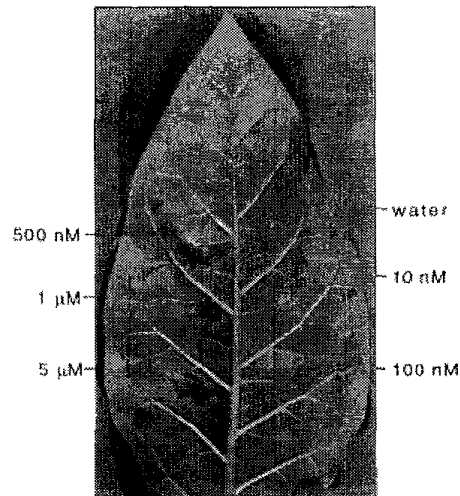


Fig. 2-28. Response of tobacco leaf to elicitin at different concentrations.

4. 5-EAS specific promoter + Elicitin gene construct 작성

가. Necrosis 관련 elicitin의 선발과 클로닝

식물잎에 대한 necrotic activity가 검정된 recombinant parasiticein (par1) gene의 activity를 높이기 위하여 *Phytophthora parasitica*에서 분리된 parasiticein gene의 아미노산 서열 13번 alanine을 valine으로, 68번 proline을 alanine으로 바꾸는 등의 *in vitro* mutagenesis에 의해 point mutation 시킨 elicitin을 선발하였다 (그림 2-29).

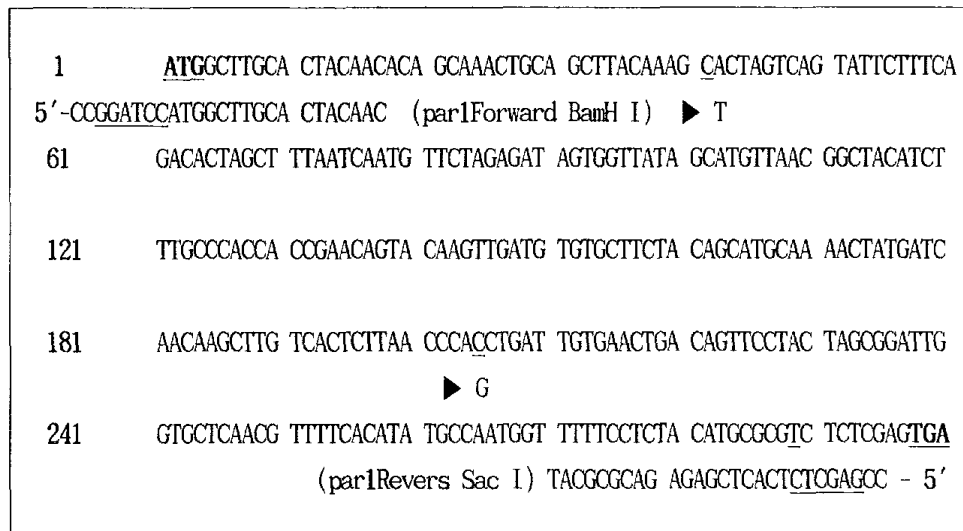


Fig. 2-29. The DNA sequence of parasiticein. Arrow represent the site of point mutation. Forward and reverse primers harboring BamH I, Sac I digestion sites, respectively at the 5'-end.

Elicitin mutant DNA를 temperate로 하여 forward primer (5'-CCG GAT CCA TGG CTT GCA CTA CAA C-3')와 reverse primer (5'-CCG AGC TCT CAC TCG GAG AGA CGC GCA T-3')을 이용한 PCR에서

얻어진 약 300 bp의 fragment (그림 2-30)를 pGEN-T easy vector에 클로닝하여 X-gal과 IPTG를 첨가한 배지에서 JM109에 형질전환하여 얻어진 white colony를 배양하여 Promega사의 plasmid prep kit를 사용하여 plasmid DNA를 분리하여 BamH I과 Sac I으로 절단하여 elicitin fragment를 얻었다 (그림 2-31).



Fig. 2-30. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane1, λ BstEII digested size marker; Lane 2 and 3, par1.



Fig. 2-31. Gel electrophoresis of pGEN-T easy-elicitin vector digested with BamH I and Sac I. Lane 1: λ BstE II, lane 2, 3: pGEN-T easy self ligated vector, lane 5, 6: pGEN-T easy-elicitin.

얻어진 약 300 bp의 fragment (그림 2-30)를 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 X-gal과 IPTG를 첨가한 배지에서 JM109에 형질전환하여 얻어진 white colony를 배양하여 Promega사의 plasmid prep kit를 사용하여 plasmid DNA를 분리하여 BamH I과 Sac I으로 절단하여 elicitin fragment를 얻었다 (그림 2-31).

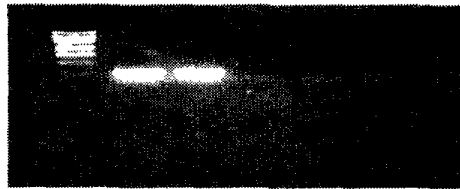


Fig. 2-30. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane 1, λ BstEII digested size marker; Lane 2 and 3, par1.



Fig. 2-31. Gel electrophoresis of pGEM-T easy-elicitin vector digested with BamH I and Sac I. Lane 1: λ BstE II, lane 2, 3: pGEM-T easy self ligated vector, lane 5, 6: pGEM-T easy-elicitin.

Elicitin gene을 고추에 도입함으로써 고추 역병균 (*Phytophthora capsici*)의 감염에 대해 초기에 Hypersensitive response (HR) 반응을 유도하여 병원균의 확산을 방제하기 위하여, cloning된 specific promoter에 elicitin gene를 fusion하여 chimeric construct를 제작하였다.

나. Specific promoter + elicitin gene의 construct 작성

병원균과 UV 조사 등의 환경 스트레스에 의해 작동하는 specific promoter와 necrosis를 유도할 수 있는 물질인 elicitin을 제조함으로써 먼저 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 plant expression vector인 pBI121에 cloning 하여 고추의 형질전환에 이용하였다.

Elicitin gene은 Dutch elm disease을 일으키는 병원균인 *Ceratocystis ulmi*에 의해 생성되어지는 cerato-ulmin toxin과 높은 아미노산 서열의 유사성을 가지고 있다. 본 연구에서 plant expression vector에 직접 elicitin gene을 cloning 할 수 없어 agarose gel에 의해 분리되어진 elicitin fragment를 Bio101사의 gene clean kit III를 사용하여 DNA elution을 한 후 specific promoter (KF1, KF6)가 cloning 되어 있는 pBI121 plant expression vector (그림 2-32)에 cloning하여 JM109에 형질전환하였다. Kanamycin 저항성 colony를 배양한 후 plasmid DNA를 BamH I과 Sac I으로 절단하여서 0.7% agarose gel에서 확인하였으나 plasmid DNA의 양이 적어 확인할 수 없었다. 위에서 얻은 pBI121 specific promoter-elicitin을 확인하기 위하여 parasiticein primer를 사용하여 PCR하여 size를 확인하고, pGEM-T easy parasiticein vector를 BamH I, Sac I으로 절단한 후 elution한 parasiticein을 α -P³² dCTP

도 labeling한 후 probe도 사용하여 PCR product를 Southern blot analysis를 하였다 (그림 2-33).



Fig. 2-32. The elicitor cassette with specific promoters (KF1, KF5) in pB1121

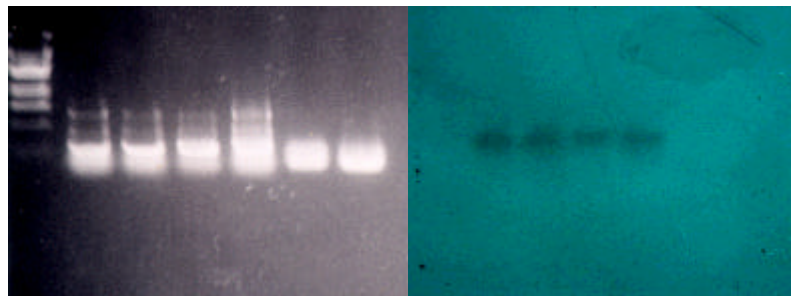


Fig. 2-33. Southern blot analysis of pB1121 vector containing chimeric gene. Left; Lane 1: λ BstE 11 size marker, lane 2-3: KF5::elicitin, lane 4: KF1::elicitin, lane 5: CaMV35S::elicitin, lane 6-7: PCR product of KF5 promoter. Southern blot was represented right.

로 labeling한 후 probe로 사용하여 PCR product를 Southern blot analysis를 하였다 (그림 2-33).

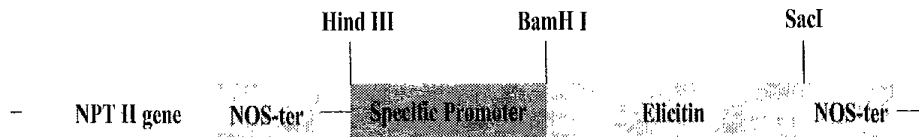


Fig. 2-32. The elicitin cassette with specific promoters (KF1, KF6) in pBI121

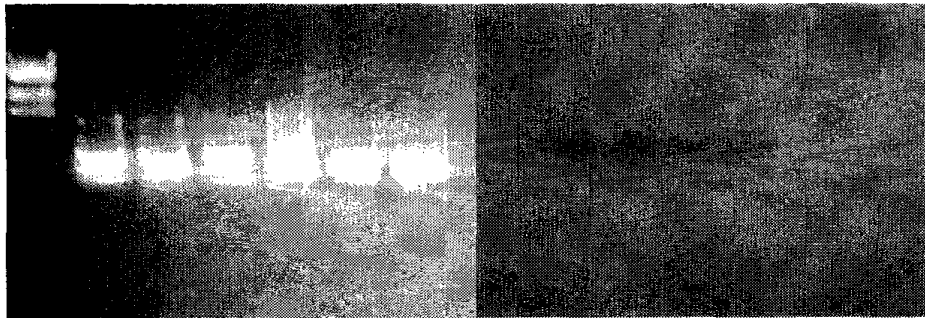


Fig. 2-33. Southern blot analysis of pBI121 vector containing chimeric gene. Left: Lane 1: λ BstE II size marker, lane 2-3: KF6::elicitin, lane 4: KF1::elicitin, lane 5: CaMV35S::elicitin, lane 6-7: PCR product of KF6 promoter. Southern blot was represented right.

제4절 적 요

본 연구는 고추의 역병저항성 관련 유전자의 탐색을 통하여 고추의 phytoalexin인 capsidiol의 생성에 관련된 sesquiterpene cyclase gene을 분리하고 genomic clone을 얻어 이 유전자를 분석함으로써 역병균의 감염시에 유도되는 특이성 promoter를 분리·동정하고 강력한 elicitor gene을 선발하여 특이성 promoter + elicitor gene construct를 제작하기 위하여 수행하였다.

UV를 처리한 고추의 잎으로부터 cDNA library를 작성하였고 담배의 5-epi aristolochene synthase (TEAS)를 probe로 사용하여 두 개의 cDNA clone (CASC1과 CASC2)을 선발하여 분석하였는데, CASC1은 1,918 bp로서 30 bp의 5'-UTR region, 1,680 bp의 ORF, 268 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 65,095 Da의 분자량을 가진 559-deduced amino acid polypeptide는 TEAS와 77%의 identity를 보였다 (GenBank accession number AF061285). CASC2는 1,941 bp로서 41 bp의 5'-UTR region, 1,683 bp의 ORF, 217 bp의 3'-UTR region을 가지고 있었고 64,907 Da의 분자량을 가진 560-deduced amino acid polypeptide는 CASC1과 77%, TEAS와 74%, vetispiradiene과 71%의 identity를 보였다 (GenBank accession number AF212433). 고추의 sesquiterpene cyclase는 다른 terpenoid synthases와 같이 substrate binding site로 알려진 DDXXD motif를 가지고 있었다.

고추에서 분리한 sesquiterpene cyclase cDNA를 probe으로 사용하여 수비초 genomic library를 screening 하여 약 20 만개의 phage plaque 중에서 11개의 positive signal을 보이는 plaque를 선발하였고 이들을 pUC18 vector에 subcloning하여 염기서열을 분석하였다.

이중 gCASC 25와 gCASC 34는 coding region과 약 5 kb, 4.3 kb의 promoter 부위를 포함하고 있어 이들의 염기서열을 결정하였다.

Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter 영역은 gCASC 25에서 1,049 bp, gCASC 34에서 1,162 bp를 얻어 이들의 상동성을 비교하였다. Translational start site부터 gCASC 25 sequence의 -139, gCASC 34 sequence의 -135 base에 TATA box가 존재하였고 -285 base 까지는 두 clone 간에 높은 상동성을 나타내었다. 특이성 promoter를 분리하기 위하여 gCASC 25와 gCASC 34에서 6개의 deletion clone을 만들었다.

형질전환을 통해 Sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter를 분석하기 위하여 pBI121 vector에 6개의 promoter deletion fragments을 cloning 하였다. 그리고 이들을 *Agrobacterium* host인 LBA4404를 이용하여 담배에 형질전환 시켰다. pBI121-KF1 부터 pBI121-KF6 까지 GUS로 staining된 부분을 관찰하였을 때 pBI121-KF3과 pBI121-KF6으로 형질전환된 담배의 잎에서 staining이 가장 진하게 되어 cloning된 promoter 부분은 그 길이에 따라 GUS의 발현 정도가 다르게 나타났다. Promoter 부분이 UV 처리에 의해 유도되는지를 알고자 형질전환된 담배의 잎을 UV 처리하여 GUS 유전자의 발현정도를 양적으로 측정한 결과 pBI121-KF6에서 무처리에 비해 3.5배 정도 증가하였다.

식물잎에 대한 necrotic activity가 검정된 recombinant parasiticein (par1) gene의 activity를 높이기 위하여 *Phytophthora parasitica*에서 분리된 parasiticein gene의 아미노산 서열 13번 alanine을 valine으로, 68번 proline을 alanine으로 바꾸는 등의 *in vitro* mutagenesis에 의해 point mutation 시킨

elicitin을 선발하였다. 고추 형질전환을 위하여 specific promoter 와 선발된 elicitin을 재조합 하여 plant expression vector인 pBI121에 cloning 하였다.

제5절 참고문헌

- Back K., He S., Kim K. U. and Shin D. H. 1988. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. Plant Cell Physiol. 39(9):899-904.
- Barannowskij J., Froberg C., Part S. and Willmitzer L. 1994. A novel DNA binding protein with homology to myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. EMBO J. 13:5383-5392
- Darvill A. G., McNeil M., Fry S. C. and Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Annu Rev Biochem. 53:625-63.
- Ebel J., Bonhoff A., Loyal R., Feller K. and Grisebach H. 1986. Further investigations of race:cultivar-specific induction of enzymes related to phytoalexin biosynthesis in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Biol Chem Hoppe Seyler. 367(8):797-802.
- Facchini P. J. and Chappell J. 1992. Gene family for an

- elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. Proc Natl Acad Sci USA. 89(22):11088-92.
- Guilloteau J. P., Nespoulous C., Huet J. C., Beauvais F., Pernollet J. C. and Brunie S. 1993. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of beta-cryptogein, a toxic elicitor secreted by the phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. J. Mol Biol. 229(2):564-5.
- Hain R., Reif H. J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H. and Stocker R. H. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361(6408):153-6.
- Haresnape J. M. and Wilkinson P. J. 1989. A study of African swine fever virus infected ticks (*Ornithodoros moubata*) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic pigs. Epidemiol Infect. 102(3):507-22.
- Harrison M. J., Choudhary A. D., Duberv I., Lamb c. J. and Dixon R. A. 1991. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.): cis-elements and trans-acting factors for the quantitative expression of a bean chalcone synthase gene promoter in electroported alfalfa protoplasts. Plant Mol Biol. 16:877-890
- Huet J. C. and Pernollet J. C. 1989. Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitor family, and its

comparison to cryptogein and capsicein. FEBS Lett. 257(2):302-6.

Huet J. C. and Pernollet J. C. 1993. Sequences of acidic and basic elicitor isoforms secreted by *Phytophthora megasperma*. Phytochemistry 33(4):797-805.

Huet J. C., Salle-Tourne M. and Pernollet J. C. 1994. Amino acid sequence and toxicity of the alpha elicitor secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. Mol Plant Microbe Interact. 7(2):302-4.

Johnson, M. and Croteau, R. 1987. Biochemistry of conifer resistance to bark beetles and their fungal symbionts. In Ecology and Metabolism of Plant Lipids. ACS Symposium Series 325. Edited by Fuller, G. and Nes, W. D. pp. 76-91. American Chemical Society, Washington, DC.

Kamoun S., Klucher K. M., Coffey M.D. and Tyler B.M. 1993. A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. Mol Plant Microbe Interact. 6(5):573-81.

Keller H., Galiana E., Bonnet P., Conrod S., Panabieres F., Ponchet M., Poupet A. and Ricci P. 1997. RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. Plant Physiol. 115(4):1557-67.

Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Umemura K., Kikuchi M. and Ogasawara N. 1988. Cerebrosides A and C,

- sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem.* 273(48):31985-91.
- Lois R., dietrich A., Hahlbrock K. and Schulz W. 1989. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO.* 8:1641-1648
- Loyal R., Ebel J. and Schmidt W. E. 1984. Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch Biochem Biophys.* 232(1):240-8.
- Marby T. J. and Gill J. E. 1979. Sesquiterpene lactones and other terpenoids. *In* *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites.* Edited by Rogenthal, G. and Janzen, D. H. Academic Press, New York.
- Marthis J. R., Back K., Starks C., Noel J., Poulter C. D. and Chappell J. 1997. Pre-steady-state study of recombinant sesquiterpene cyclases. *Biochemistry* 36: 8340-8348.
- Nebeker T. E., Hodges J. D. and Blance C. A. 1993. Host response to bark beetle and pathogen colonization. *In* *Beetle-Pathogen Interaction in Conifer Forests.* Edited by Schowalter T. D. and Filip G. M. pp. 158-173. Academic Press, London.
- Nespoulous C., Huet J. C. and Pernollet J. C. 1992. Structures

- of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*.
Phytochemistry 31(5):1471-6.
- Oommen A., Dixon R. A. and Paiva N. L. 1994. The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. Plant cell 6:1789-1803
- Pontier D., Tronchet M., Rogowsky P., Lam E. and Roby D. 1998. Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. Mol Plant Microbe Interact. 11(6):544-54.
- Ricci P., Mouton-Perronnet F., Bruneteau M., Denoroy L., Bouliteau P., Bonnet P. and Michel G. 1995. Elicitin produced by an isolate of *Phytophthora parasitica* pathogenic to tobacco. Phytochemistry 38(1):41-4.
- Stoessl A., Unwin C. H. and Ward E. W. B. 1972. Post-infectional inhibitors from plants. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. Phytopath. Z. 74: 141-152.
- Stoessl A., Stothers J. B. and Ward E. W. B. 1976. Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. Phytochemistry 15: 855-872.
- Uknes S., Dincher S., Friedrich L., negrotto D., Williams S., Thompson-Taylor H., Potter S., Ward E. and Ryals J. 1993.

- regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant cell* 5:159-169
- Vogeli U. and Chappell J. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(10):4088-94. Review.
- Ward, E. W. B. 1976. Capsidiol production in incompatible interactions with fungal. *Phytopathology* 66:175-176.
- Yin S., Mei L., Newman J., Back K. and Chappell J. 1997. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiology* 115(2):437-51.
- Yu L. M. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(10):4088-94. Review.

여 백

제 3 장 고추 Phytoalexin의 생합성과 역병저항성 메카니즘

제1절 서 설

고추의 역병균에 대한 저항성의 차이는 고추가 병균에 감염되었을 때 식물체내에서 생성·축적되는 항균성물질인 phytoalexins에 기인한다는 보고가 많이 있다 (Ebel et al., 1986; Back et al., 1998). 이와 같은 현상은 고추뿐만 아니라 담배 및 벼 등에서도 일어난다고 보고되어있다. (Hain et al., 1993; Yu, 1995). 최근에는 phytoalexin의 생합성 기작이 밝혀지고 있으며 합성과정에 관련된 효소 및 유전자가 분리됨으로써 각종 작물에서 내병성품종의 육성에 많은 관심과 연구가 이루어지고 있다.

포장상태에서 고추는 생육후기 역병균에 의한 감염이 심하게 일어나기 때문에 age-related resistance가 저항성품종의 육성에 중요하다. 이러한 저항성 형질의 발현에 phytoalexin인 capsidiol이 중요한 역할을 할 것으로 사료되며 (Back et al., 1997), 고추의 생육과정과 재배조건에 따른 capsidiol phytoalexins의 생성 및 축적에 관한 연구와 이 과정에 관여하는 각종 효소 및 관련유전자의 탐색 및 분리·동정과 형질전환기법에 의해서 고추의 병원균의 침입에 대한 자기방어능력을 지닌 차세대 신기능 품종의 육성이 가능해질 것이다.

고추의 역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 저항성 메카니즘의

하나로 phytoalexin의 생성이 저항성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 (Stoessl., 1972; Nespouous et al., 1992; Huet et al., 1994). 현재까지 식물의 phytoalexin 생성에 관련된 요인들은 많이 밝혀졌으며 고추의 경우 sesquiterpene cyclase에 의해 capsidiol이 생합성 된다 (Facchini et al., 1992; Vogeli et al., 1995; Yin et al., 1997).

온실 및 포장상태에서는 역병균의 감염에 의해 효소활성이 유도되어 capsidiol이 생성되지만 역병균의 인위적인 감염은 시간과 노력이 많이 소모될 뿐만 아니라 생물학적, 환경적 영향을 받기 쉬워 실험 결과를 재현하는데 상당한 어려움이 따른다. 또한 고추의 phytoalexin의 생성에 관련된 환경요인과 여러 가지 물질을 밝힘으로써 저항성 메카니즘과 식물체 육성에 기초적인 자료로 사용될 수 있기 때문에 실내에서 쉽게 균일하게 식물방어기작을 유도하는 방법의 개발이 필요하다.

이를 위해 식물생체방어기작을 유도하는 abiotic elicitor로 알려진 wounding, UV-C(>260 nm)을 비롯해 HgCl₂, CuCl₂, NaCl, EGTA 등을 이용하여 생체방어기작에 관련되는 효소의 활성을 조사하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 고추의 Sesquiterpene cyclase 효소 활성화에 영향을 미치는 요인과 효소활성 검정

가. Sesquiterpene cyclase 효소 활성 측정

Wounding, UV-C(>260 nm)을 비롯해 HgCl₂, CuCl₂, NaCl, EGTA 등

의 스트레스를 고추에 가하고 고추 잎을 액체질소에 간 후, 추출용액 (8 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 20 % (w/v) glycerol, 10 mM sodium metabisulfate, 10 mM sodium ascorbate, 15 mM MgCl₂, 5 mM β-mercapthoethanol)을 첨가하여 4℃에서 20,000×g으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 고추 추출액의 상층액 5 μl를 200 mM Tris/HCl (pH 7.5), 25 mM MgCl₂, 36 μM [1-3H]FPP (108 μCi)와 전체 50 μl로 혼합하여 35℃에서 30 분간 반응하였다. 반응 후, 125 μl의 n-hexane을 첨가하고 10 초간 원심분리하여 hexane 층을 분리하고, 100 μl의 hexane 층 반응액을 10 - 20 mg의 실리카 분말 (230 - 400 mesh)과 혼합하여 phosphatase 활성화에 의해 생성된 farnesol과 FPP와 반응된 다른 물질들을 제거하였다. 실리카 분말과 반응액을 20,000×g에서 1분간 원심분리하여 얻어진 최종액을 LSC (liquid scintillation counter, Beckman)를 이용하여 방사능량을 측정하였다. 모든 단백질 추출액은 Bio-Rad사의 protein assay 용액으로 단백질 함량을 측정하여 사용하였고, 측정된 sesquiterpene cyclase의 효소활성은 nmol의 sesquiterpene 산물 (mg protein)/1h/1로 나타내었다.

나. UV-C 처리 후 시간별 Sesquiterpene cyclase 효소활성 측정

UV 처리는 파종하여 40일간 키운 고추 잎을 따서 Hitachi germicidal lamp (15 W)의 20 cm 아래에서 15 분간 조사한 후 petri dish에 엽병이 물에 잠기도록 하여 생장실 두었다. UV 조사 후 4, 8, 12, 18, 26, 32, 38, 44, 48 시간에 시료를 채취하여 상기 방법과 같이 sesquiterpene cyclase 효소 활성을 측정하였다.

다. HgCl₂, CuCl₂, NaCl 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

파종 후 40일 된 고추 잎을 따서 HgCl₂, CuCl₂, NaCl을 처리한 다음 12, 24, 48 시간 동안 성장실에 두었다가 시료를 채취하여, 상기 방법과 같이 sesquiterpene cyclase 효소 활성을 조사하였다.

라. Chilling, heat shock, drought 및 wounding 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

파종 후 40일 된 고추 잎을 따서 여러 가지 스트레스를 처리한 다음 12, 24, 48 시간 동안 성장실에 두었다가 시료를 채취하여, 상기 방법과 같이 sesquiterpene cyclase 효소 활성을 조사하였다. 저온과 고온에 의한 chilling과 heat shock 처리를 하였고 drought 처리는 고추를 뿌리채 뽑은 후 성장실에 그대로 방치하였으며 wounding은 바늘로 잎에 상처를 내어 처리하였다.

마. EGTA 농도별 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

파종 후 40일 된 고추 잎을 따서 EGTA [ethylene glycol bis (b-aminoethylether) tetraacetic acid] 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM을 처리한 다음 12, 24, 48 시간 동안 성장실 두었다가 시료를 채취하여 상기 방법과 같이 sesquiterpene cyclase 효소 활성을 조사하였다.

2. 각종 Stress에 의한 고추의 Sesquiterpene cyclase gene의 유도

가. RNA isolation

Elicitor를 처리한 고추잎 2 g을 채취하고 Tri-reagent (Molecular Research Center Inc.)를 사용하여 total RNA를 분리하

였다. RNA 분리 방법은 시료를 액체질소로 마쇄하여 1 ml의 tri-reagent 용액을 첨가 후, 5 분간 상온에서 보관하였다. RNA 추출은 0.2 ml의 chloroform을 첨가하여 심하게 교반한 후, $12,000 \times g$, 4°C 에서 15 분간 원심분리하였다. RNA 침전 반응은 원심분리 후, 상층액을 새로운 E-tube로 옮기고 여기에 0.5 ml의 isopropanol을 넣어서 상온에서 10 분간 보관하였다. 1 ml의 100 % ethanol, 75 % ethanol로 각각 1 회씩 RNA wash를 하여 $7,500 \times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. RNA pellet을 10 분간 풍건시킨 후, 50 μl 의 DEPC 처리 증류수로 녹여서 사용하였다. RNA를 정량하기 위해서 spectrophotometer를 이용하였다.

나. Northern Blot Analysis

Formaldehyde와 Formamide로 denaturing 한 1.0 %의 agarose gel에서 각 well 당 10 μg 의 total RNA를 loading하여 50 V에서 2 시간동안 전기영동하였다. 분리된 RNA sample들은 capillary 법에 의해 nylon membrane (Amersham)에 transfer하여 UV stratalinker에서 25 초간 crosslink하였다. 혼성화 반응은 QuickHybrid solution (Stratagene)을 이용하여, 68°C 에서 1시간 동안 실시하였으며, full length의 sesquiterpene cyclase 유전자를 random priming 하여 probe로 사용하였다.

혼성화 된 membrane은 $2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS에서 15 분간 2회 wash하였고, $0.2 \times \text{SSC}$, 0.01 % SDS에서 15 분간 2회 wash 후, phosphorimager (Molecular Dynamics)와 X-ray 필름에서 노출하여 분석하였다.

3. 면역반응을 이용한 Sesquiterpene cyclase 단백질의 유도

pattern 조사

Sesquiterpene cyclase의 full-length cDNA를 주형가닥으로 forward primer (5'-GGCGAATTCCATGGCCTCAGGT-3') (밑줄은 EcoRI 제한효소 부위)와 reverse primer (5'-GAGGGATCCTTAAATTTGAACGA-3') (밑줄은 BamHI 제한효소 부위)를 이용하여 PCR한 결과 1,699-bp의 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물을 EcoRI과 BamHI으로 절단 후, 겔에서 정제하여 같은 제한부위를 가지는 Bacterial expression vector인 pGBT-T19 (Gold Biotechnology)에 ligation하였다. Ligation 된 vector를 *E. coli* (TBI strain, Stratagene)에 CaCl₂법을 이용하여 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli*를 OD₆₀₀의 값이 약 0.5 까지 배양 후, IPTG를 첨가하여 단백질을 합성을 유도하였다.

IPTG 첨가 후, 각 시간별로 100 μ l의 배양액을 채취하고 박테리아 세포를 ultrasonication을 하여 위와 동일한 방법으로 sesquiterpene cyclase 활성과 단백질량을 측정하였다. 같은 양의 단백질 샘플을 추출한 후, SDS-PAGE를 하여 membrane에 transfer하고 sesquiterpene cyclase antibody를 이용하여 Western blot analysis를 하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 고추의 Sesquiterpene cyclase 효소활성에 영향을 미치는 요인과 효소활성 검정

가. UV-C 처리 후 시간별 Sesquiterpene cyclase 효소활성 측정

고추잎(수비초 및 CM334 품종)으로부터 UV-C을 처리 후

sesquiterpene cyclase 효소활성을 측정한 결과, UV에 의해 효소활성이 유도됨을 볼 수 있었다. 최대 활성은 처리 후 38 ~ 48 h에서 나타났고 품종간의 활성 차이는 실험간 상당한 차이를 보였으나, 전반적으로 억병저항성 품종인 CM334 계통이 감수성인 수비초에 비해 효소활성이 빨리 유도될 뿐만 아니라 활성정도가 감수성 품종에 비해 훨씬 높은 현상을 보여주었다 (그림 3-1). 이와 같은 결과는 UV 처리에 의해 유도된 sesquiterpene cyclase의 작용으로 phytoalexin이 생합성될 것으로 생각되어 UV 처리구에서 고추의 capsidol 함량이 증가할 것으로 예측된다.

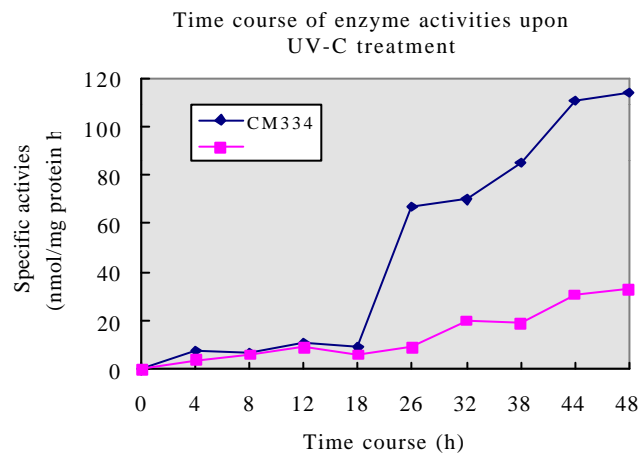


Fig. 3-1. Time course of sesquiterpene cyclase enzyme activities upon UV-C treatment.

나. HgCl₂, CuCl₂, NaCl 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

sesquiterpene cyclase 효소활성을 측정한 결과, UV에 의해 효소활성이 유도됨을 볼 수 있었다. 최대 활성은 처리 후 38 ~ 48 h에서 나타났고 품종간의 활성 차이는 실험간 상당한 차이를 보였으나, 전반적으로 역병저항성 품종인 CM334 계통이 감수성인 수비초에 비해 효소활성이 빨리 유도될 뿐만 아니라 활성정도가 감수성 품종에 비해 훨씬 높은 현상을 보여주었다 (그림 3-1). 이와 같은 결과는 UV 처리에 의해 유도된 sesquiterpene cyclase의 작용으로 phytoalexin이 생합성될 것으로 생각되어 UV 처리구에서 고추의 capsidiol 함량이 증가할 것으로 예측된다.

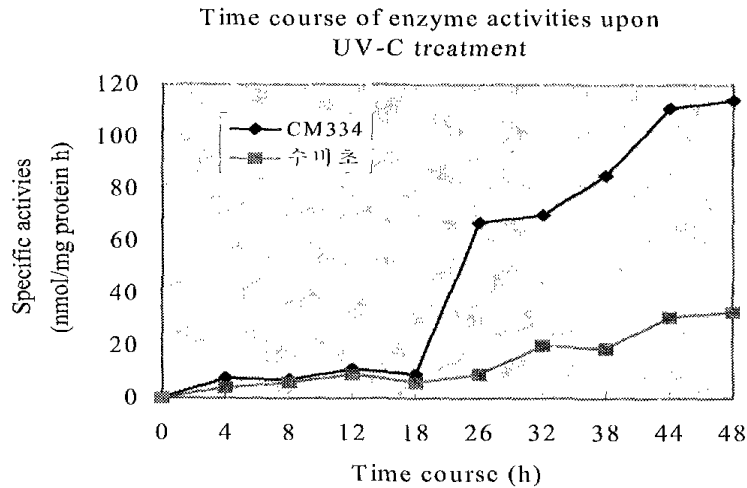


Fig. 3-1. Time course of sesquiterpene cyclase enzyme activities upon UV-C treatment.

나. HgCl₂, CuCl₂, NaCl 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

여러 가지 무기성분의 처리에 의한 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성 유도는 처리물질간에 현저한 차이를 보여주었는데, HgCl₂, CuCl₂의 경우 처리 후 12 시간 내에 효소의 활성이 나타났고 36 시간 이후에 최고 수준에 달하였다. 반면에 NaCl 처리에서는 48 시간까지는 효소의 활성이 나타나지 않았고 그 이후에도 매우 낮은 수준으로 조사되었다 (표 3-1).

Table 3-1. The enzyme activities of sesquiterpene cyclase in red pepper as affected by various inorganic compounds.

Treatment	Time after treatment (h)		
	12	24	48
	(nmol/mg prot/h)		
CuCl ₂	5.39	25.02	31.03
HgCl ₂	3.91	12.33	36.13
NaCl	0.00	0.65	7.12
Control	0.00	0.00	0.00

다. Chilling, heat shock, drought 및 wounding 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

Chilling, heat shock, drought 및 wounding 등도 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성을 유도하였으나 그 수준이 매우 낮게 나타났다 (표 3-2).

Table 3-2. The enzyme activities of sesquiterpene cyclase in red pepper as affected by various environmental stresses.

Treatment	Time after treatment(h)		
	12	24	48
	(nmol/mg prot/h)		
Chilling	0.00	0.87	1.19
Heat shock	0.00	0.31	1.00
Drought	0.00	1.02	0.76
Wounding	0.00	1.40	2.64

라. EGTA 농도별 처리에 의한 Sesquiterpene cyclase 효소활성

EGTA 처리는 농도에 따라 sesquiterpene cyclase 효소 활성화에 미치는 영향이 다르게 나타났다. EGTA 2 mM 처리시 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성이 크게 증가하였으며, 여러 가지 스트레스의 혼합처리에서 HgCl₂, CuCl₂ 및 UV의 sesquiterpene cyclase 효소활성을 증가시키는 작용도 하는 것으로 나타났다 (표 3-3).

2. 각종 Stress에 의한 고추의 Sesquiterpene cyclase gene의 유도

고추의 phytoalexin 생성에 관련된 sesquiterpene cyclase 효소의 활성화는 여러 가지 환경 stress와 무기성분에 의해 유도되었고, 이 효소의 유전자는 이미 cloning 되어 보고된 바 있다 (본 연구팀,

Table 3-3. The enzyme activities of sesquiterpene cyclase in red pepper as affected by EGTA.

Concentrations of EGTA	Activity(nmol/mg prot/h)
0.25 mM	1.24
0.50 mM	9.96
1.00 mM	5.38
2.00 mM	27.05
Control	0.00

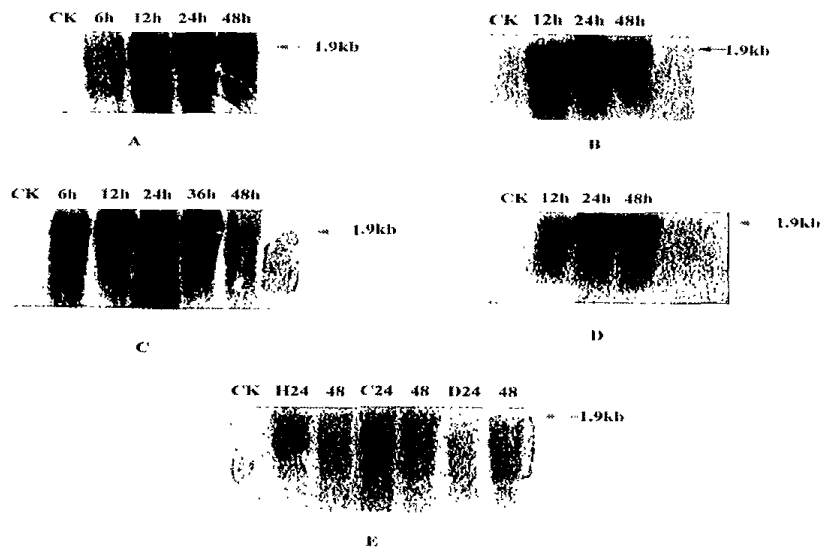


Fig. 3-2. Changes in the level of the CASC transcript in the leaf of *Subicho* as affected by various stresses. A: CuCl₂, B: HgCl₂, C: UV, D: NaCl, EH: Heat shock, EC: Chilling, ED: drought.

GenBank accession number AF061285). 본 실험에서는 각종 stress에 의해서 고추의 sesquiterpene cyclase gene의 유도를 Northern blot analysis를 통해 분석하였다. 이 실험에 사용된 probe는 고추 CASC1 cDNA의 XbaI fragment를 이용하였다. CuCl₂, HgCl₂, UV 및 NaCl 처리에 의한 sesquiterpene cyclase mRNA의 수준은 모든 처리에서 강하게 나타났으며, NaCl 처리에서는 그 수준이 상대적으로 다소 낮게 나타났다 (그림 3-2).

3. 면역반응을 이용한 Sesquiterpene cyclase 단백질의 유도 pattern 조사

UV-C을 처리한 고추잎으로부터 단백질을 추출하여 12% SDS-PAGE에서 분리한 다음 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 담배의 sesquiterpene cyclase에서 획득한 monoclonal antibodies을 이용하여 cross activity을 관찰한 결과 UV-C을 처리한 고추잎으로부터 cross activity 가진 단백질이 UV-C에 의해 생성됨을 관찰하였으며 단백질 크기도 담배의 sesquiterpene cyclase와 유사하게 62-63 kd 정도임을 알 수 있었다 (그림 3-3). 이 결과는 고추 와 담배의 sesquiterpene cyclases 간의 3차 구조에 상당한 homology가 있음을 암시하여 준다.

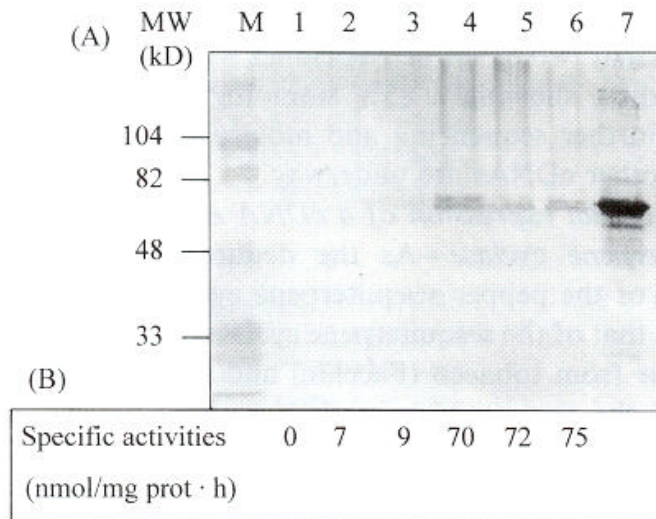


Fig. 3-3. Time course of the immunoblot (A) and sesquiterpene cyclase enzyme activity (B). Soluble protein extracts (50 μ g) were prepared at 0, 8, 18, 32, 38 and 44 h (as indicated above the lanes) from UV treated pepper leaves. M, molecular weight standards; lane 7, 1 μ g of purified tobacco 5-*epi* aristolochene protein (Mathis et al. 1997).

제4절 적 요

고추의 phytoalexin의 생성에 관련된 환경요인과 여러 가지 물질을 밝힘으로써 저항성 메커니즘과 식물체 육성에 기초적인 자료도 사용될 수 있도록 하기 위하여 식물생체방어기작을 유도하는 abiotic elicitor도 알려진 wounding, UV-C (>260 nm)을 비롯해 HgCl₂, CuCl₂, NaCl, BGTA 등을 이용하여 관련 효소의 활성을 조사하였다.

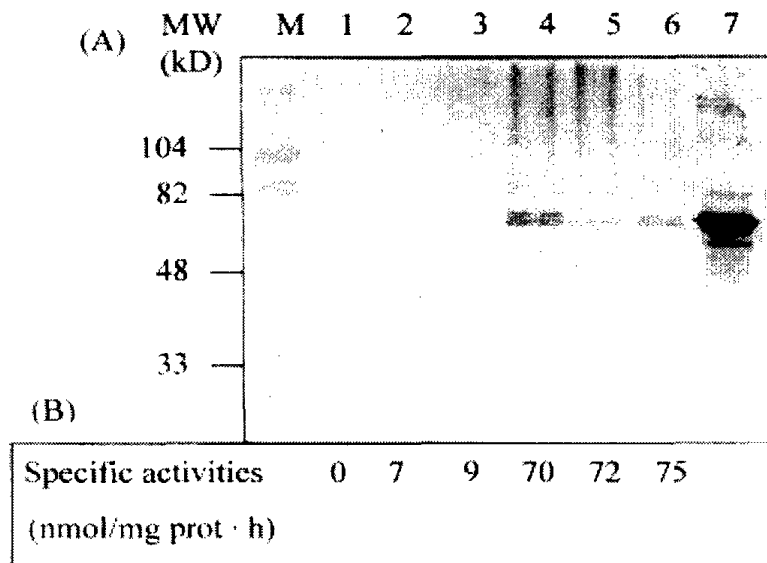


Fig. 3-3. Time course of the immunoblot (A) and sesquiterpene cyclase enzyme activity (B). Soluble protein extracts (50 μ g) were prepared at 0, 8, 18, 32, 38 and 44 h (as indicated above the lanes) from UV treated pepper leaves. M, molecular weight standards; lane 7, 1 μ g of purified tobacco 5-epi aristolochene protein (Mathis et al. 1997).

제4절 적 요

고추의 phytoalexin의 생성에 관련된 환경요인과 여러 가지 물질을 밝힘으로써 저항성 메카니즘과 식물체 육성에 기초적인 자료로 사용될 수 있도록 하기 위하여 식물생체방어기작을 유도하는 abiotic elicitor로 알려진 wounding, UV-C (>260 nm)을 비롯해 HgCl₂, CuCl₂, NaCl, EGTA 등을 이용하여 관련 효소의 활성을 조사하였다.

고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성은 UV 처리에 의해 유도되었으며 최대 활성은 처리 후 38 h - 48 h에서 나타났고 역병저항성 품종인 CM334 계통이 감수성인 수비초에 비해 효소활성이 빨리 유도될 뿐만 아니라 활성정도가 감수성 품종에 비해 훨씬 높은 현상을 보여주었다. 또한 여러 가지 무기성분의 처리에 의한 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성 유도는 처리물질간에 현저한 차이를 보여주었는데, HgCl₂, CuCl₂의 경우 처리 후 12 시간 내에 효소의 활성이 나타났고 36 시간 이후에 최고 수준에 달하였다. EGTA 2 mM 처리시 고추의 sesquiterpene cyclase 효소활성의 유도가 크게 증가하였다.

Sesquiterpene cyclase gene의 유도를 Northern blot analysis를 통해 분석한 결과, CuCl₂, HgCl₂, UV 처리에서 강하게 나타났다. UV-C를 처리한 고추잎으로부터 단백질을 추출하여 담배의 sesquiterpene cyclase에서 획득한 monoclonal antibodies를 이용하여 cross activity를 관찰한 결과 cross activity 가진 단백질이 생성됨을 관찰하였다.

제5절 참고문헌

- Back K., He S., Kim K. U. and Shin D. H. 1988. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. Plant Cell Physiol. 39(9):899-904.

- Dilday R. H., P. Nastashi, J. Lin. and R. J. Jr. Smith. 1991. Allelopathic activity in rice (*Oryza sativa* L.) against ducksalad (*Heteranthera limosa* (Sw.) Willd.). pp. 193-201 in J. D. Hanson, M. J. Shaffer, D. A. Ball, and C. A. Cole, ed. Proceedings of the Symposium for Sustainable Agriculture for the Great Plains. U.S. Department of Agriculture.
- Duke S. O. 1985. Weed Physiology. Vol II, CRC Press, Boca Raton. pp. 159-189.
- Ebel J., Bonhoff A., Loyal R., Feller K. and Grisebach H. 1986. Further investigations of race:cultivar-specific induction of enzymes related to phytoalexin biosynthesis in soybean roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Biol Chem Hoppe Seyler. 367(8):797-802.
- Facchini P. J. and Chappell J. 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(22):11088-92.
- Hain R., Reif H. J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H. and Stocker R. H. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361(6408):153-6.
- Huet J. C., Salle-Tourne M. and Pernollet J. C. 1994. Amino acid sequence and toxicity of the alpha elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. Mol Plant Microbe Interact. 7(2):302-4.

- Nespoulous C., Huet J. C. and Pernollet J. C. 1992. Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry* 31(5):1471-6.
- Stoessl A., Unwin C. H. and Ward E. W. B. 1972. Post-infectious inhibitors from plants. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopath. Z.* 74: 141-152.
- Vogeli U. and Chappell J. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(10):4088-94. Review.
- Yin S., Mei L., Newman J., Back K. and Chappell J. 1997. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiology* 115(2):437-51.
- Yu L. M. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(10):4088-94. Review.

여 백

제 4 장 고추의 생체방어물질인 Phytoalexin의 탐색

제1절 서설

우리나라에서 고추의 역병이 다발하는 원인은 여러 가지 환경조건과도 관련이 있으나 고도의 저항성을 지닌 품종이 없는 것이 가장 큰 원인으로 생각되며, 고추재배의 가장 큰 장애요인은 고추역병으로 꼽히고 있다. 고추의 역병은 *Phytophthora capsici*에 의해 토양 전염되는 심각한 병이며 (Barksdale 등 1984, Leonian 1922, Weber 1932), 살균제에 의해서 효과적인 방제가 어렵기 때문에 저항성품종의 개발이나 윤환재배 등의 종합적인 방제대책이 필요하다.

우리나라에서도 고추역병의 저항성 메카니즘과 발현에 대한 연구가 심도 있게 진행되고 있다 (Back et al., 1998). 고추의 저항성은 우성유전자에 의해 지배되거나 병원균의 감염기간이 길어지거나 농도가 높아지면 감수성을 나타내는 경우가 있기 때문에 안정되고 지속적인 저항성이 요구된다고 한다. 고추의 age-related resistance의 발현과 이와 관련된 phytoalexins의 생성에 대한 연구에서 *P. capsici*에 감염된 고추의 줄기와 뿌리의 capsidiol 농도는 저항성의 정도와 상관관계가 있다고 하였으며, 또한 저항성품종은 metalaxyl 처리에 의해서 capsidiol의 축적이 감수성품종에 비해 많은 것으로 나타났다고 보고하였다 (Lee et al., 1999).

이와 같은 연구결과는 본 연구과제의 수행에 기초적이고 중요한

정보뿐만 아니라 병원균의 감염에 대한 고추의 생체방어기작에 관련된 phytoalexin capsidiol의 유도방법 등을 제공하여 주고 있다.

식물세포는 병원균이나 병원균에서 유래한 elicitors에 반응하여 항균성 phytoalexins을 생산하며 (Darvill et al., 1984; Ebel, 1986), 이와 같은 반응은 식물의 자기방어반응을 나타내는 것이기 때문에 지난 20여년간 연구자들의 상당한 관심을 끌고 있다. 식물에 의해 생성되는 phytoalexins의 종류는 식물의 과에 따라 다른데, 예를 들면 콩과식물에 의해서는 phenylpropanoid 유도체 (Loyal, 1984); 가지과 식물로부터는 terpene phytoalexins (Koga, 1988); 화본과인 벼로부터는 diterpene이 생성된다. 고추에서 capsidiol은 FPP (farnesyl pyrophosphate)로부터 5-epi-aristolochene synthase에 의해서 생성된다.

고추의 역병원균에 대한 저항성의 차이는 고추가 이 병원균에 감염되었을 때 식물체내에서 생성·축적되는 항균성물질인 phytoalexins에 기인한다는 보고가 많이 있다 (Back et al., 1998; Ebel, 1986). 이와 같은 현상은 고추뿐만 아니라 담배 및 벼 등에서도 일어난다 (Hain, 1993; Yu, 1995). 최근에는 phytoalexin의 생합성기작이 밝혀지고 있으며 합성과정에 관련된 효소 및 유전자가 분리됨으로써 각종 작물에서의 내병성품종의 육성에 많은 관심과 연구가 이루어지고 있다 (Back et al., 2000).

Stoss1 등(1972)이 최초로 고추과육이 여러 가지의 병원성 및 비병원성균의 감염에 의하여 항균성 phytoalexin인 capsidiol을 생성한다고 보고하였고, 다른 균과 세균도 역시 capsidiol의 축적을 유도한다고 알려졌다 (Stoss1 et al., 1972; Ward et al., 1973). 이와 같은 연구보고가 있는 이후 많은 연구자들이 casidiol 생성·축

적과 고추의 병저항성과의 관계를 구명하는 연구를 수행하게 되었다.

포장상태에서 고추는 생육후기에 역병균에 의한 감염이 심하게 일어나기 때문에 age-related resistance가 저항성품종의 육성에 중요하며 이 저항성의 발현에 phytoalexin인 capsidiol이 중요한 역할을 할 것으로 사료된다 (Back et al., 1988). 따라서 고추의 생육과정과 재배환경조건에 따른 capsidiol phytoalexins의 생성 및 축적에 대한 연구는 고추역병 저항성 품종 육성 연구의 기초가 될 것으로 사료된다.

제2절 재료 및 방법

1. 고추 현탁배양세포 및 식물체에서 Phytoalexin 생성요인 검정

가. 현탁배양세포의 Capsidiol 동정을 위한 TLC

Capsidiol 물질의 분리와 동정을 위하여 담배 및 고추 현탁배양세포를 추출 여과한 후, 냉동보관중인 시료를 분획 funnel에서 chloroform으로 분리하여 lower phases를 4-5회 수집하여 rotary evaporate로 진공농축시켜 chloroform 200 μ l에 녹인 후 이를 nitrogen gas로 농축하여 150 μ l chloroform으로 희석하여, TLC plate에서 cyclohexane:acetone (1:1)이 포함된 TLC chamber에서 전개 후 발색시약 (1.4 g vanillin, 40 ml methanol, 250 μ l conc. H₂SO₄)으로 발색시켰다.

나. 현탁배양세포에서의 Capsidiol 생성요인 검정

고추의 배양세포로부터 capsidiol의 생성을 유도하기 위하여 수

비초의 배양세포 (callus)를 sucrose 40 g/L, casein hydrosate 0.1%, 2,4-D 1 ppm, BA 0.01 ppm을 첨가한 MS 배지에 현탁배양시켜, 15일 간격으로 계대배양한 후, 계대배양 6-well plate에 well당 5 ml 배지와 약 0.5 g의 고추 현탁배양세포가 든 well에 cellulase와 ethanol에 녹인 jasmonic acid의 최종 농도가 100 μ M이 되도록 첨가하여 배양한 후 capsidiol을 분리 및 동정하였다.

다. 식물체에서의 Phytoalexin 생성요인 검정

1) 처리조건 및 시료채취

역병 감수성 품종인 수비초와, 저항성품종인 CM331를 1999년 2월 15일 온실에 파종, 4월 2일 가식하여 8매엽 시기에 여러 가지 요인을 처리한 후 Phytoalexin 물질을 분리, 동정하였다. 역병균 (*P. capsici*) 접종은 Metalaxyl 처리 전후에 토양에 접종하였다. 접종 처리구는 토양에 motile zoospores (1×10^{15} /ml) 현탁액 20 ml을 처리하고 상대습도 95%, 28 $^{\circ}$ C 조건의 생장실에서 6일간 생장시켰으며, 시료채취는 처리 후 발병 부위를 제외한 부위에서 4 cm를 채취하여, 이를 2 mm로 잘게 썰어서 40% Ethanol에 추출 여과 후 냉동 저장하여 분석시료로 사용하였다.

UV (Fotodyne) 처리는 10, 20, 40, 60분간 조사하여 이를 생장실에 옮겨 0, 12, 24, 48시간 경과 후 시료를 채취하여 분석시료로 사용하였다. Metalaxyl 약제처리는 식물체 8매엽 시기에 약제농도별로 역병균 접종 전후에 0, 1, 10 μ g/ml으로 토양에 관주하였다. 생물 약제인 키토산은 100, 300, 500배로 희석하여 처리하였다.

2) Capsidiol 물질 분리 및 동정

고추종자를 온실에서 파종 재배하여 8 매엽 시기에 metalaxyl을 처리하여 처리 1일 후 토양 및 줄기 부위에 역병 motile zoospores ($1 \times 10^{15}/\text{ml}$) 20 ml 현탁액을 토양에 접종 후, 시료를 채취하여 아래와 같은 방법으로 capsidiol을 추출 및 정제하여 GC/MS로 분리 동정하였다 (그림 4-1).

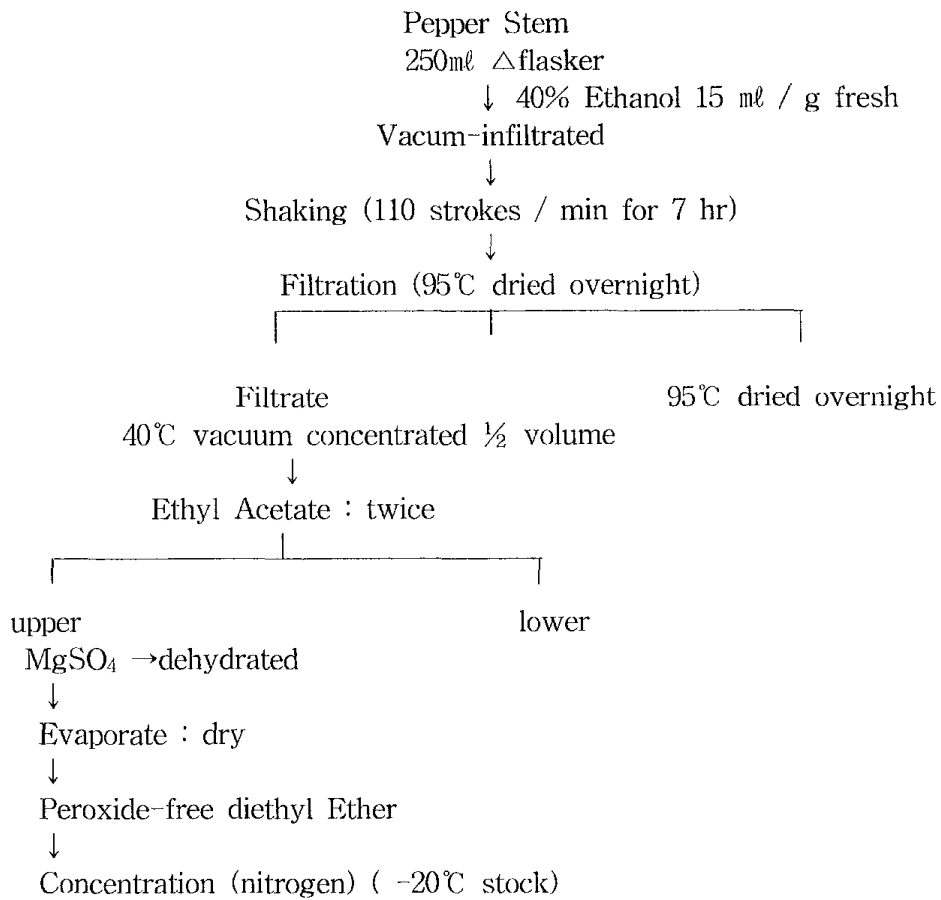


Fig. 4-1. Isolation of capsidiol from stems and roots of red pepper.

(GC/MS의 capsidiol 분석조건)

- GC model : Hewlett-Packard 6890
- GC/MS model : G1723A
- Column : supelcowax10 fused silica capillary (0.25 mmID x 30 m, Supelco)
- Flow rate :
 - carrier: N2 1.0 ml/min.
- Detector : MSD
- Temperature
 - injector : 120°C
 - detector : 230°C
- Injection size : 1.0 ul

3) 고추 품종간 Phytoalexin 물질 생성 비교

역병감수성 품종으로 보고된 수비초와 저항성품종 계통인 YP61063, YCM334, 61098, 61199, 61209 및 61211에 metalaxyl과 고추 역병균 (*P. capsici*)을 상기와 같은 방법으로 처리하여 phytoalexin의 생성을 조사하였다.

2. 각종 elicitor 처리에 의한 Capsidiol 생성과 메카니즘

고추 현탁배양세포에 pectinase, jasmonic acid, cellulase, chitioligosaccharide 등의 elicitor를 0.25 mg/ml의 농도로 처리하여 phytoalexin 생성여부를 조사하였다.

3. 스트레스에 의한 항산화효소 활성 및 동위효소패턴의 변화

가. 조효소액의 추출

식물체를 1 g씩 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.8) 1 ml과 함께 마쇄한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

나. POD 활성측정

POD활성은 pyrogallol (Sigma, Co# P-0381)을 기질로 사용하고, 100 μ l 조효소액에 2.9 ml assay buffer를 첨가하여 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하였다.

다. SOD 활성측정

SOD 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 xanthine/xanthine oxidase system을 superoxide radicals ($O_2\cdot$)의 공급원으로 이용하여 superoxide radicals에 의한 cytochrome c의 환원속도를 550nm에서의 흡광도변화를 측정하였다. SOD활성 1 unit는 25°C에서 반응을 시작하여 150초간 550 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 xanthine oxidase 활성이 50% 억제되는 것으로 정의하였다. 단백질정량은 Bradford (1976) 방법에 준해서 실시하였다.

라. POD, SOD의 isozyme pattern 확인

POD, SOD의 isozyme pattern은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 방법에 준해서 수행하였는데, POD의 경우는 12% acrylamide gel에서 15mV에서 15분, 25mV에서 45분간 전기영동한후 POD 단백질의 발색반응은 benzidine solution과 3% H_2O_2 를 1:1로 혼합해서 사용하였다.

SOD의 경우는 13% acrylamide gel에서 215 V에서 40분간 전기영동한 후 gel의 염색은 negative staining solution에서 30분간 암상태로 shaking시켜 발색반응을 보았다.

제3절 결과 및 고찰

1. 고추 현탁배양세포 및 식물체에서 Phytoalexin 생성요인 검정

가. 현탁배양세포에서의 Phytoalexin 생성요인 검정

고추의 capsidiol을 분리 및 동정코자 담배 현탁 배양세포에 cellulase 처리와 무처리간 추출물의 TLC Spot를 비교한 결과 처리시에는 Rf 0.32에서 청색 spot이 나타났으나 무처리에서는 나타나지 않았다 (그림 4-2). 이는 본 연구팀의 공동연구자가 미국에서 수행한 capsidiol 분석 실험시와 동일한 Rf치에서 동정되었다. 또한 Rf 0.32 부분을 추출 여과하여 methyl myristate (4 mM)를 내부표준물질로 하여 GC/MS로 비교 동정해 본 결과, retention time 17.53 에서 cellulase 무처리시에는 peak가 나타나지 않았으나, 처리시는 나타났다. 처리시는 Wibberley 등이 GC/MS하에서 standard capsidiol로 확인한 m/z인 236 (M^+), 221, 203, 175, 163, 157, 147, 135, 107, 93과 일치하는 것으로 나타났다 (그림 4-3).

고추의 배양세포로부터 capsidiol의 생성을 유도하기 위하여 수비초의 배양세포 (callus)를 담배와 동일한 방법으로 cellulase를 처리하여 capsidiol을 분리 동정하였으나 cellulase 처리에 의한 고추 배양세포의 capsidiol 생성은 확인되지 않았다.

고추 배양세포의 capsidiol 생성을 유도하는 elicitor를 선발하

기 위하여 Jasmonic acid의 최종 농도가 100 μ M이 되도록 첨가하여 배양한 후 capsidiol을 분리 및 동정해 본 결과, Jasmonic acid 처리구는 Rf 0.32에서 청색의 spot이 나타났으나 무처리구는 나타나지 않았다. 이는 담배현탁배양 세포에 cellulase 처리시와 동일한 Rf치에서 나타났다. Jasmonic acid를 처리 후 정제하여 methyl nyristate (4 mM) 용액으로 녹여 SPB-1 column을 이용하여 GC/MS로 비교동정해 본 결과, retention time, 17.53에서 무처리구에서는 peak가 나타나지 않았으나 처리구에서는 나타났고, 이는 Mass Spec상으로도 capsidiol도 동정되었다.

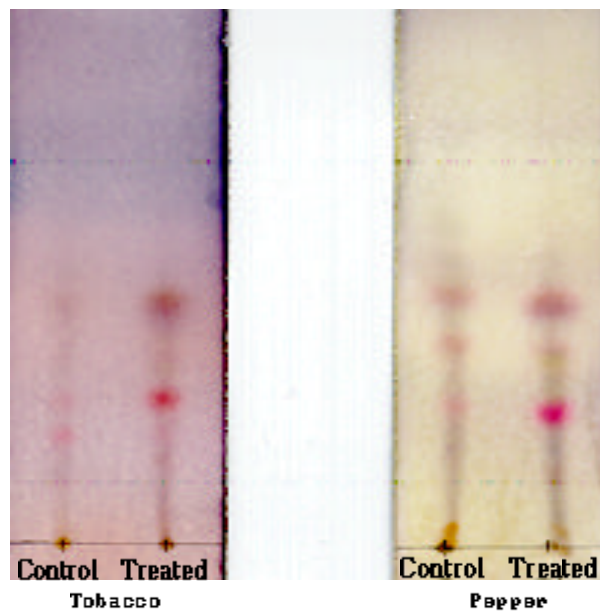


Fig. 4-2. Capsidiol identification from tobacco and pepper cell suspension treated by Jasmonic acid on a TLC.

기 위하여 jasmonic acid의 최종 농도가 100 μ M이 되도록 첨가하여 배양한 후 capsidiol을 분리 및 동정해 본 결과, jasmonic acid 처리구는 Rf 0.32에서 청색의 spot이 나타났으나 무처리구는 나타나지 않았다. 이는 담배현탁배양 세포에 cellulase 처리시와 동일한 Rf치에서 나타났다. Jasmonic acid를 처리 후 정제하여 methyl myristate (4 mM) 용액으로 녹여 SPB-1 column을 이용하여 GC/MS로 비교동정해 본 결과, retention time, 17.53에서 무처리구에서는 peak가 나타나지 않았으나 처리구에서는 나타났고, 이는 Mass Spec상으로 capsidiol로 동정되었다.

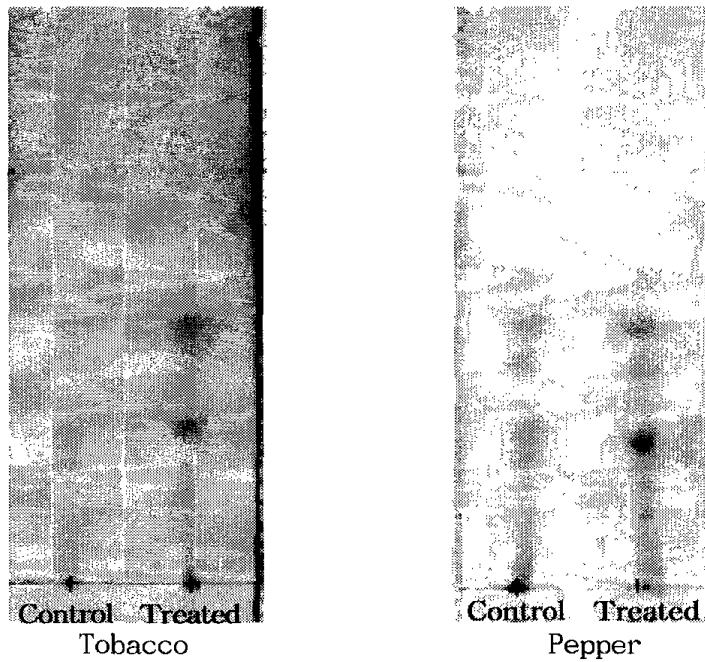


Fig. 4-2. Capsidiol identification from tobacco and pepper cell suspension treated by jasmonic acid on a TLC.

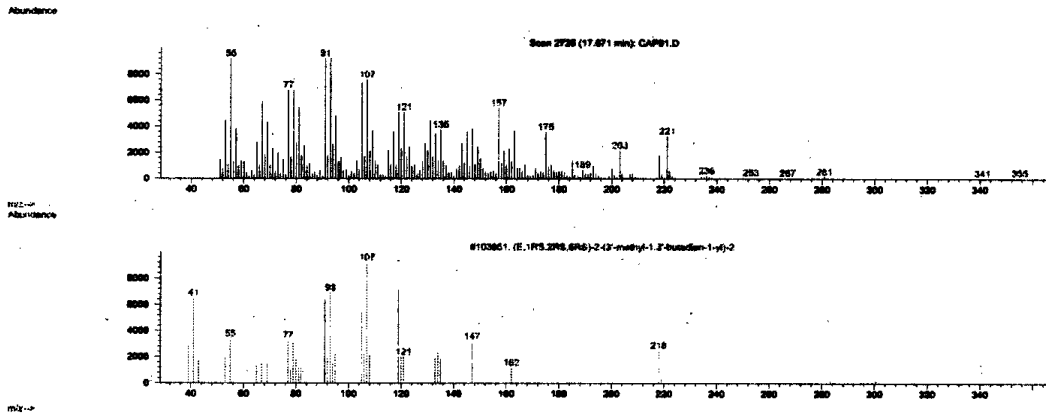


Fig. 4-3. Mass spectrum of capsidiol identified from red pepper cell suspension.

나. 식물체에서의 Phytoalexin 생성요인 검정

1) 처리조건별 Phytoalexin 물질 생성 검정

수비초는 역병균을 토양에 접종 후 3일에 발병이 시작되었으나, 저항성 품종인 CM331은 역병균 접종 6일후에도 발병이 되지 않았다 (표 4-1, 그림 4-4). 역병균접종 후 Metalaxyl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 역병감수성 품종인 수비초의 경우는 3일 후부터는 약제농도와 발병 정도간에는 큰 차이가 없었으나 저항성품종 CM331은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시는 역병균 접종 후 9일이 경과 시 발병되지 않았으나 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시에는 발병이 되었다. 생물약제인 키토산의 농도별 처리시는 희석배수가 증가할수록 수비초의 역병 발병정도가 심하였다. 이는 역병균 접종 후 metalaxyl 처리와 비슷한 발병 억제효과를 나타내었으며, 저항성인 CM331 품종에서도 비슷한 경향을 나타내어, 키토산이 metalaxyl 약제와 비슷한 방제효과를 나타내었다.

Table 4-1. Resistance of red pepper cultivars to *P. capsici* as affected by metalaxyl and chitosan.

Treatment	Lesion length (cm)				
	Subicho			CN331	
	3DAT ¹	5DAT	9DAT	5DAT	9DAT
<i>P. capsici</i>	2.5	3.0	5.0	0	1.2
<i>P. capsici</i> +Metalaxyl 1 ug/ml	0.8	1.8	4.3	0	0.4
<i>P. capsici</i> +Metalaxyl 10 ug/ml	0	1.8	3.3	0	0
<i>P. capsici</i> +Chitosan(100 times dil)	0	0.8	1.0	0	0
<i>P. capsici</i> +Chitosan(300 times dil)	1.0	2.0	2.0	0	0.6
<i>P. capsici</i> +Chitosan(500 times dil)	2.0	2.0	2.5	0	0.8

¹DAT : days after treatment



Subicho

CN331

Fig. 4-4. Comparison in susceptibility to *P. capsici* between Subicho and YCN331. Plants were inoculated at the eight-leaf stage with zoospore suspensions of *P. capsici* in the soil.

Table 4-1. Resistance of red pepper cultivars to *P. capsici* as affected by metalaxyl and chitosan.

Treatment	Lesion length (cm)				
	Subicho			CM331	
	3DAT*	6DAT	9DAT	6DAT	9DAT
<i>P. capsici</i>	2.5	3.0	5.0	0	1.2
<i>P. capsici</i> +Metalaxyl 1 ug/ml	0.8	1.8	4.3	0	0.4
<i>P. capsici</i> +Metalaxyl 10 ug/ml	0	1.8	3.3	0	0
<i>P. capsici</i> +Chitosan(100 times dil)	0	0.8	1.0	0	0
<i>P. capsici</i> +Chitosan(300 times dil)	1.0	2.0	2.0	0	0.6
<i>P. capsici</i> +Chitosan(500 times dil)	2.0	2.0	2.5	0	0.9

*DAT : days after treatment



Subicho

CM331

Fig. 4-4. Comparison in susceptibility to *P. capsici* between Subicho and YCM331. Plants were inoculated at the eight-leaf stage with zoospore suspensions of *P. capsici* in the soil.

2) 고추품종간 Capsidiol의 생성과 역병저항성

고추 역병균 (*P. capsici*) 접종 1일전에 metalaxyl을 품종별로 동일한 농도로 처리 해 본 결과, 고추역병감수성 품종으로 보고된 수비초가 저항성품종 계통인 YP61063, YCM334, 61098, 61199, 61209 및 61211에 비하여 고추줄기 내의 capsidiol 함량이 높았다 (표 4-2). Metalaxyl을 처리하지 않고 고추역병균만 토양에 접종시에는 capsidiol이 고추 줄기 내에서 생성되었으나 metalaxyl 처리 후 고추역병균을 접종하지 않은 고추 줄기 내에는 capsidiol이 생성되지 않았다.

품종간에는 metalaxyl 처리 1일후 역병균 접종시에는 저항성품종 계통인 YP계통들이 감수성품종인 수비초에 비하여 capsidiol 함량이 높았고, 특히 공시고추계통 중 역병저항성이 가장 높은 것으로 보고 되어진 YCM334에 metalaxyl 처리후 역병균 접종시에 capsidiol생성이 가장 높게 나타났다. Metalaxyl을 처리하지 않고 역병균만 접종 시에도 저항성 품종계통인 YCM 334가 공시된 고추품종 중에서 줄기 내의 capsidiol 함량이 가장 높았고, 감수성 품종인 수비초가 가장 낮았다. 한편 감수성 품종과 저항성 품종에 역병균을 접종처리 시에는 감수성품종인 수비초가 저항성품종보다 capsidiol 생성 증가율면에서는 높은 것으로 나타났다.

역병균 접종시 발병된 병반의 길이는 저항성계통들인 YP 계통들이 metalaxyl 처리시에는 1.5~3 cm로 품종간 차이를 나타내었고, metalaxyl 무처리에서는 저항성계통들은 3~4.5 cm, 감수성품종인 수비초는 5.7 ± 1.0 cm로 나타났다. Metalaxyl을 처리하고 역병균을 접종시에는 고추줄기에 발병된 병반의 길이와 capsidiol 생성 함량과는 부의 관계를 나타내고 있었다.

Table 4-2 . Capsidiol levels in the leaves of different red pepper cultivars as affected by metalaxyl and *P. capsici* inoculation.

Cultivar	Treatment	Capsidiol (peak area/ISTD peak area)	Lesion length (cm)
(Subicho) YP0003	MA*	0.213	3.1 ± 0.8
	A**	0.073	5.7 ± 1.0
YP61063	MA	0.258	2.9 ± 1.0
	A	0.220	3.5 ± 1.0
YP61064	MA	0.597	1.5 ± 0.5
	A	0.265	3.0 ± 0.8
YP61198	MA	0.505	1.7 ± 0.8
	A	0.310	3.5 ± 0.6
YP61199	MA	0.331	1.8 ± 0.7
	A	0.203	3.7 ± 0.9
YP61209	MA	0.111	3.0 ± 0.9
	A	0.108	5.1 ± 1.0
YP61211	MA	0.130	3.5 ± 0.8
	A	0.105	4.8 ± 1.0

* MA: metalaxyl + *P. capsici*

**A : *P. capsici*

이러한 결과들은 고추역병 방제를 위한 metalaxyl 처리는 fungi에 감염된 고추 줄기 내에서 capsidiol 생성과 밀접한 관련이 있으며, 역병균을 접종하지 않고 metalaxyl 단독으로 처리시 capsidiol이 생성되지 않은 결과로 미루어 보아 metalaxyl 처리는 고추 줄기 내에

서 capsidiol 생성을 유도하지는 않지만 역병균에 의한 감염으로 capsidiol 합성하는 능력을 증가시킨다는 연구보고와 관련이 있는 것으로 생각된다.

3) 품종간 Phytoalexin 물질 생성 비교

(1) 고추 부위별 Phytoalexin 생성 : 고추 역병 감수성 품종인 수비초와 저항성품종인 CM331 식물체내에서의 8 매엽시기에 부위별로 성분을 분리 동정 해 본 결과 (표 4-3, 그림 4-5, 4-6), 분리 확인된 70개의 성분중 수비초와 CM 331과 차이가 있는 성분들은 30개였다. 수비초와 CM331 간에 특이한 성분 함량의 차이를 나타내는 것은 앞에서 2-pentyl-furan, heptanoic acid, 1-propanethiol, α -D-xylofuranoside, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, tetradecanoic acid, 1,2-benzendicarboxylic acid, phytol, ethyl linoleolate, 9-octadecenoic acid, octadecenoic acid, 1,2-epoxy-1- vinylcyclododecane 등, 줄기에서 2-pentyl-furan, trans-2,4-decadienal, α -D-xylofuranoside, pentanoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid, heptanoic acid, 1,2-benzendicarboxylic acid, 4-ethoxy-2,5-dimethoxybenz aldehyde, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, 10-methoxybezo(j)fluran, 9,12-octadecadienoic acid, linoleic acid, ethyl linoleolate, octadecenoic acid, naphtalene 등, 뿌리에서 2-pentyl-furan, heptanoic acid, butanoic acid, pentanoic acid, benzoic acid, 1,2-benzendicarboxylic acid, 4-ethoxy-2,5 -dimethoxybenzaldehyde, tetradecanioc acid, hexadecanoic acid, 10-methoxybezo(j)fluran, 9,12-octadecadienoic acid, linoleic acid, ethyl linoleolate, octadecenoic acid, naphtalene 등의 성분이었다.

Table 4-3. Comparison of the compounds between cultivars in red pepper

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No.	Compounds	Subicho			CM331		
		Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root
1	2-pentyl-Furan	0.392	0.056	0	0.469	0.820	2.044
2	Heptanoic acid	t	0	0	0.021	0	0.011
3	1-Propanethiol	0.086	0	0	0.117	0	0
4	Butanoic acid	0	0	0.137	0	0	0.297
5	trans-2,4-Decadienal	0.015	0.259	0.514	0.079	0.555	2.763
6	α -D-Xylofuranoside	0	0	0.044	0.058	0.107	0
7	Pentanoic acid	0	0	0	0	1.728	6.543
8	Benzoic acid	t	t	0.343	0	0.018	0.535
9	4-hydroxy-3-methoxy-Benzoic acid	0	0	0	0.193	0	0
10	Heptanoic acid	0.142	0	0.080	0.128	0.508	0
11	Phenol	0.151	0.237	t	0.110	0.232	t
13	Metalaxyl	0	0	0	0	0	0
14	Capsidiol	0	0	0	0	0	0
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	0.068	0.060	0.053	0.853	0.647	0.086
16	4-Ethoxy-2,5-Dimethoxybenzaldehyde	1.179	0.084	0	0.327	0.480	0.074
18	Hexadecanoic acid	0.711	0.037	0.036	0.328	1.513	0.143
19	Ethyl tridecanate	4.892	3.120	6.611	3.267	2.441	2.676
20	10,13-Octadecadienoic acid	0.248	0	0	0	0.129	0
21	10-Methoxybezo(j)fluran	0.106	0.051	0	0	0.503	0.650
22	Phytol	0	0.360	0.040	2.005	1.213	0
23	9,12-Octadecadienoic acid	0	0	0	0	1.101	0.154
24	Linoleic acid	0	0	0.857	0	1.351	1.213
25	Ethyl linoleolate	1.513	5.407	0.187	5.347	19.582	7.568
26	9-Octadecenoic acid	5.342	3.062	0.389	10.891	1.190	1.160
27	Octadecenoic acid	0.118	0.498	0.412	0.557	3.439	1.652
28	Naphtalene	0.341	0.256	1.014	0.249	2.770	3.936
29	6-Nitro-cylohexadecane-1,3-dione	0.010	0.195	1.628	0.099	1.654	1.387
30	1,2-Epoxy-1-vinylcyclododecane	0	0.852	0	0.101	0.279	0

특히 고추의 전 부위에서 함량이 높았던 것은 2-pentyl-furan, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl linoleolate, octadecenoic acid 등의 성분이었다.

따라서 저항성 품종인 CM331과 감수성 품종인 수비초 간에 조사된 성분들의 함량의 큰 차이를 보여 고추의 역병 저항성과 이들 물질 함량 수준과는 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각되었다.

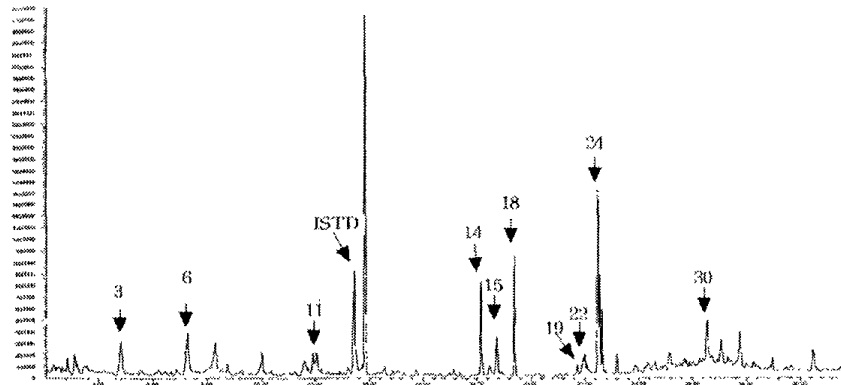
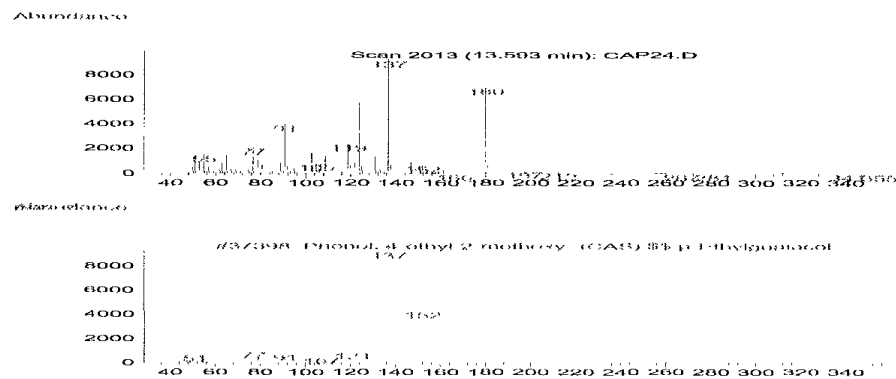
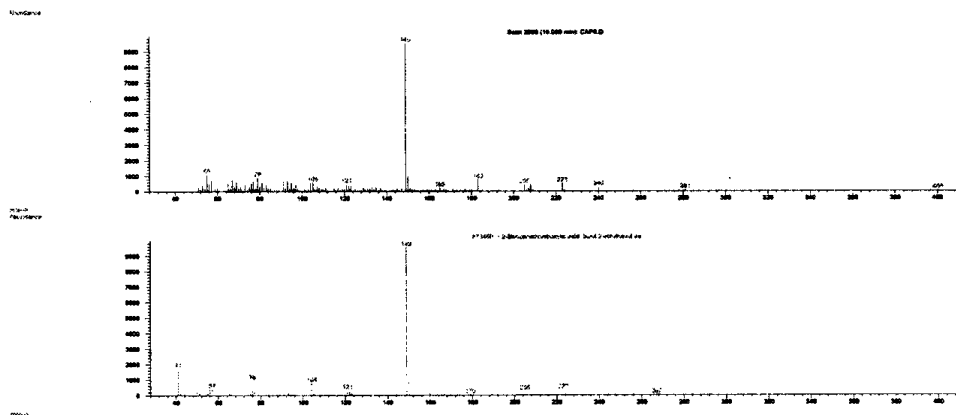


Fig. 4-5. Gas chromatogram of the compounds from the stem in red pepper.

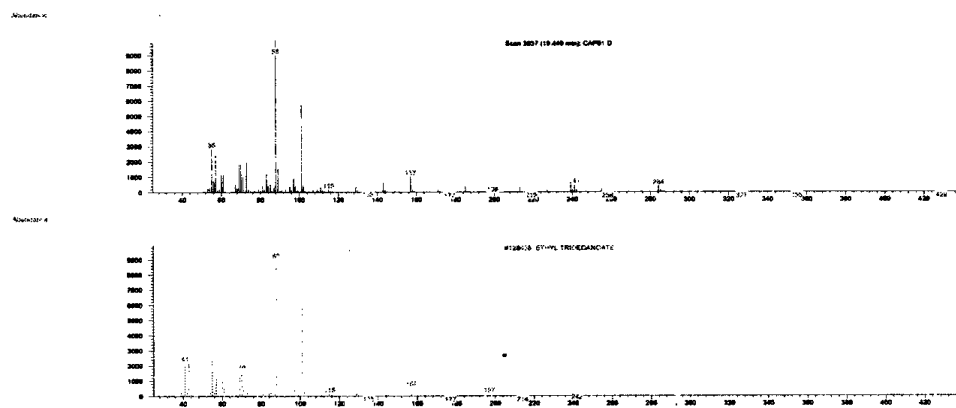
Phenol



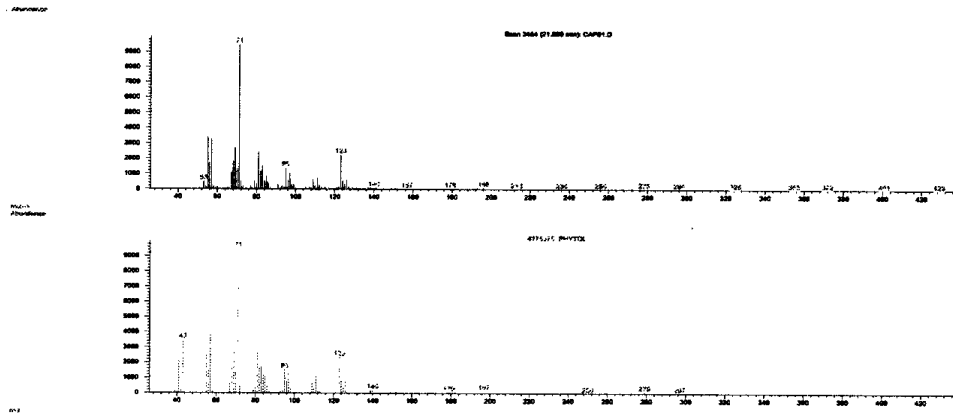
1,2-Benzendicarboxylic acid



Ethyl tridecanate



Phytol



Linoleic acid

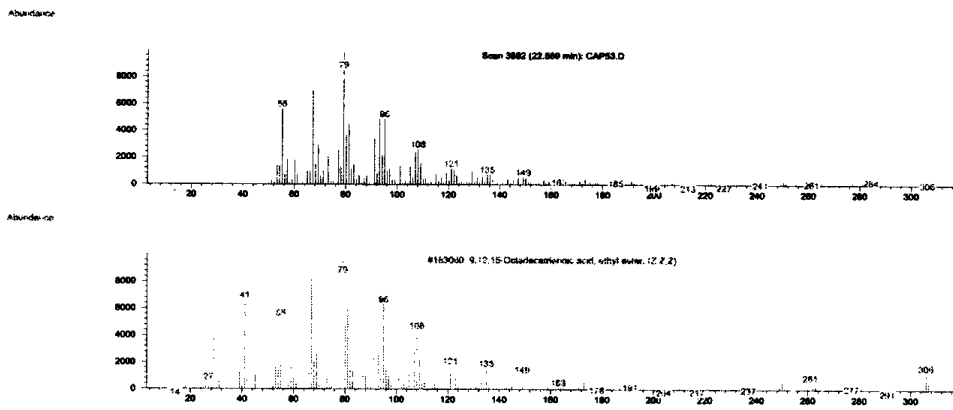


Fig. 4-6. Mass spectrum of phytoalexins identified from red pepper.

(2) 고추 역병 발병 정도별 phytoalexin 생성 : 발병정도가 심할수록 잎에서는 hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등의 지방산 성분들이 감소하였고, 줄기에서는 phenol, ethyl tridecanate, phytol 등이 증가하였으나, 1,2-benzendicarboxylic acid, linoleic acid 등의 성분은 감소하였다. 뿌리에서는 α -D-xylofuranoside, phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등이 감소하였다. 발병의 정도별로는 병징의 크기가 0.5-1.5 cm의 경우 줄기 및 뿌리에서 capsidiol 생성이 가장 높았고, 0.5 cm 이하 및 3 cm 이상에서는 capsidiol의 생성이 낮은 것으로 나타났다 (표 4-4).

(3) Metalaxyl 처리시기 및 농도에 따른 Phytoalexin 생성 : 역병균 접종전 Metalaxyl 처리가 접종 후 처리에 비하여 잎에서 1-propanethiol의 성분이 매우 높았고, 줄기에서 1-propanethiol, α -D-xylofuranoside, phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl tridecanate, phytol 등의 성분이 높았다. 약제 농도 간에는 처리별로 뚜렷한 경향을 나타내지 않았으며, 품종간에는 역병저항성 품종인 CM331의 줄기에서 감수성 품종인 수비초의 줄기에 비하여 hexadecanoic acid 함량이 높았다. Metalaxyl 처리 시기별로는 역병균 접종전 Metalaxyl 처리에 비하여 접종후 처리가 수비초 및 CM331 두 품종 공히 capsidiol 함량이 높게 나타났고, 처리 후 경과 일수별로는 수비초 및 CM331에서는 Metalaxyl 1 μ g/ml 농도 처리시는 6일이, 10 μ g/ml 처리시는 10일이 경과 되었을 때가 가장 높게 나타났다. 부위별로는 두 품종 공히 약제농도와 처리시기 및 경과일수에 관계없이 줄기, 뿌리, 잎 순으로 함량이 높았다 (표 4-5, 4-6).

Table 4-4. Phytoalexin production in the various plant parts with different disease affection.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No.	Compounds	Plant parts	Lesion length (cm)			
			0~0.5	0.5~1.5	1.5~3	3 이상
3	1-Propanethiol	Leaf	0.401	0.173	0.064	0.179
		Stem	0.003	t	t	0.076
		Root	t	t	0.008	t
6	α -D-Xylofuranoside	Leaf	t	t	0.304	t
		Stem	0.048	0.036	0.140	0.559
		Root	0.173	t	t	t
11	Phenol	Leaf	t	t	t	t
		Stem	t	t	0.368	1.030
		Root	1.952	0.371	0.077	t
14	Capsidiol	Leaf	t	0.014	0.023	t
		Stem	0.120	0.476	0.299	0.171
		Root	0.739	0.270	0.054	t
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	Leaf	t	t	t	t
		Stem	1.006	0.985	0.732	0.542
		Root	0.165	t	0.038	t
18	Hexadecanoic acid	Leaf	1.562	0.470	0.425	t
		Stem	0.003	t	t	0.145
		Root	t	0.029	t	t
19	Ethyl tridecanate	Leaf	9.129	4.939	4.152	0.807
		Stem	0.299	0.204	1.624	5.160
		Root	9.250	0.208	0.051	t
22	Phytol	Leaf	t	t	t	t
		Stem	0.014	t	t	1.036
		Root	t	t	0.010	t
24	Linoleic acid	Leaf	2.515	t	t	t
		Stem	2.213	2.765	1.747	0.053
		Root	0.978	0.101	0.056	t

Table 4-5-1. Combinational effects of metaxyl treatment and *P. capsici* inoculation on phytoalexin production in the stems of red pepper.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No	Compound	Plant parts	Subicho											
			Metalaxyl application days before inoculation (1µg/ml)			Metalaxyl application days before inoculation (10µg/ml)			Metalaxyl application days after inoculation (1µg/ml)			Metalaxyl application days after inoculation (10µg/ml)		
			3D*	6D	10D	3D	6D	10D	3D	6D	10D	3D	6D	10D
3	1-Propanethiol	Leaf	0.632	0.126	0.041	0.335	0.119	0.061	0.462	0.140	0.017	0.281	0.052	t
		Stem	0.030	0.043	0.056	0.010	0.108	0.228	0.005	0.001	0.153	0.005	t	0.171
		Root	0.141	0.101	0.012	0.080	t	0.129	0.006	0.052	0.297	0.011	t	t
6	α-D-Xylofuranoside	Leaf	t	t	1.883	t	t	0.514	0.123	0.146	0.036	t	0.054	0.544
		Stem	0.261	0.839	0.094	0.197	1.527	0.066	0.015	0.304	0.038	0.132	0.475	t
		Root	0.024	0.031	t	t	1.165	t	0.083	0.006	t	0.149	t	0.018
11	Phenol	Leaf	t	t	0.062	t	t	t	0.009	0.002	0.016	0.074	t	t
		Stem	0.338	0.709	0.023	0.326	0.273	t	0.277	0.619	t	0.145	0.781	0.006
		Root	1.517	0.561	0.014	2.575	0.100	0.050	0.823	0.061	0.157	1.155	0.015	0.072
13	Metalaxyl	Leaf	0.162	t	t	t	t	t	0.217	t	t	t	t	t
		Stem	0.019	0.178	t	0.029	t	t	0.033	t	t	t	t	t
		Root	t	0.241	t	t	0.154	0.058	t	t	0.070	0.475	t	0.130
15	1,2-Benzdicarboxylic acid	Leaf	0.203	0.105	0.041	t	t	t	0.088	0.017	0.015	t	0.043	t
		Stem	0.046	0.008	0.315	0.027	0.120	0.152	0.015	0.045	t	0.015	0.037	0.158
		Root	0.067	0.061	0.035	0.002	0.122	0.032	0.100	0.039	t	0.139	0.182	0.103
18	Hexadecanoic acid	Leaf	1.104	0.426	0.080	0.883	0.401	0.209	1.920	0.215	0.134	0.725	0.133	0.186
		Stem	0.025	0.172	t	0.015	t	t	0.023	t	t	0.008	0.035	t
		Root	0.039	t	t	t	0.028	0.019	t	0.019	t	t	0.012	0.009

*D: days after inoculation

Table 4-5-2. Combinational effects of metaxyl treatment and *P. capsici* inoculation on phytoalexin production in the stems of red pepper.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No	Compound	Plant parts	CM331					
			Metalaxyl application days before inoculation (1µg/ml)			Metalaxyl application days after inoculation (1µg/ml)		
			3D*	6D	10D	3D	6D	10D
3	1-Propanethiol	Leaf	t	0.054	0.025	0.172	0.059	0.050
		Stem	0.117	t	t	0.044	t	0.156
		Root	t	0.394	1.328	t	0.463	0.064
6	α -D-Xylofuranoside	Leaf	0.044	t	t	t	0.150	t
		Stem	0.058	t	1.916	0.745	t	0.640
		Root	t	t	t	t	t	0.107
11	Phenol	Leaf	1.364	1.849	0.069	0.051	1.123	0.088
		Stem	t	t	t	0.043	t	0.076
		Root	2.603	8.095	3.566	0.344	9.502	0.403
13	Metalaxyl	Leaf	t	0.267	t	t	0.271	t
		Stem	t	t	t	t	t	t
		Root	t	t	t	t	t	t
15	1,2-Benzothiazylcarboxylic acid	Leaf	t	0.093	0.144	0.070	0.075	0.092
		Stem	t	t	t	0.027	t	t
		Root	0.086	0.755	15.501	4.910	0.886	0.090
18	Hexadecanoic acid	Leaf	0.036	t	t	t	t	0.023
		Stem	0.328	0.357	0.422	0.077	0.352	0.192
		Root	0.143	0.253	t	0.206	0.296	t
19	Ethyl tridecanate	Leaf	6.611	5.584	0.077	0.040	3.699	0.119
		Stem	3.267	t	11.217	0.630	t	2.166
		Root	13676	31857	89.476	0.687	37.397	0.878
22	Phytol	Leaf	0.040	0.070	0.021	0.036	0.035	0.044
		Stem	2.005	t	2.353	0.566	t	2.155
		Root	t	t	t	0.355	t	0.074
24	Linoleic acid	Leaf	0.857	0.443	0.115	0.070	0.173	0.267
		Stem	t	t	t	2.564	t	t
		Root	t	t	t	t	t	t

*D: days after inoculation

Table 4-6-1. Combinational effects of metaxyl treatment and *P. capsici* inoculation on capsidiol production in the stems of red pepper.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Cultivar	Plant parts	Metalaxyl application days before inoculation (1 μ g/ml)			Metalaxyl application days before inoculation (10 μ g/ml)		
		3DAT*	6DAT	10DAT	3DAT	6DAT	10DAT
Subicho	Leaf	t	0.046	0.032	t	t	t
	Stem	0.022	2.114	1.022	t	0.101	0.215
	Root	t	1.570	1.031	0	0.886	0.029
CM331	Leaf	t	0.035	0.124	t	t	t
	Stem	0.024	2.293	1.210	t	t	t
	Root	0.193	1.171	1.051	t	t	t

*DAT: days after inoculation

Table 4-6-2. Combinational effects of metaxyl treatment and *P. capsici* inoculation on capsidiol production in the stems of red pepper.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Cultivar	Plant parts	Metalaxyl application days after inoculation (1 μ g/ml)			Metalaxyl application days after inoculation (10 μ g/ml)		
		3DAT	6DAT	10DAT	3DAT	6DAT	10DAT
Subicho	Leaf	t	0.091	0.087	t	0.019	0.056
	Stem	0.024	2.113	1.033	t	1.103	1.152
	Root	1.170	1.352	1.036	0.780	0.997	1.101
CM331	Leaf	t	0.096	0.932	t	t	t
	Stem	0.101	2.513	1.318	t	t	0.011
	Root	0.134	1.815	1.095	t	t	t

*DAT: days after inoculation

품종간에는 Metalaxyl 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 수비초에 비하여 CM331에서 높았으나, Metalaxyl 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리시는 수비초에서 높았다. 이는 capsidiol이 생성은 역병발병정도와 밀접한 관련이 있는 것으로 조사되어진 Table 1, 3의 결과와 같이 Metalaxyl 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 CM331에 처리시는 역병발병을 거의 억제시켜 capsidiol을 생성시키지 않는 것으로 사료된다.

(4) Chitosan 농도에 따른 Phytoalexin 생성 : 역병균 접종 후 키토산 처리시, 품종간에는 CM331이 수비초에 비하여 앞에서 α -D-xylofuranoside, hexadecanoic acid, 줄기에서는 1,2-benzendicarboxylic acid, linoleic acid, 뿌리에서 phenol, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, phytol 등의 성분이 증가하였다 (표 4-7, 4-8).

키토산의 농도별 처리시는 수비초의 앞에서 농도가 높을수록 hexadecanoic acid 함량이 증가하였고, chitosan 300배 희석 처리시는 6일 경과시가 3일과 10일 경과시보다 ethyl tridecanate, phytol 등의 성분 함량이 높았으나, 그 밖의 성분들의 함량은 처리농도간에 일정한 경향을 나타내지 않았다.

역병균 접종후 chitosan 농도가 높은 처리에서 capsidiol이 많이 생성되었고, 처리 후 경과일수 별로는 뚜렷한 경향은 없었다. 특히 희석배수가 100배일 경우는 10일, 300배와 500배에서는 6일에서 높게 나타났다. 이는 고농도의 chitosan을 식물체에 처리시 초기에는 역병 발병을 억제시켜서 capsidiol 생성이 되지 않으나 시간이 경과되어 역병이 발현되었을 시 capsidiol이 생성되는 점과 관련이 있는 것으로 생각된다. 부위별로는 줄기, 잎, 뿌리 순으로 capsidiol 생성이 많았다.

Table 4-7-1. Phytoalexin production in the various parts of red pepper applied by chitosan after inoculation of *P. capsici*.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No	Compound	Plant parts	Subicho							
			100 times dillution			300 times dillution			500 times dillution	
			3D	6D	10D	3D	6D	10D	3D	6D
3	1-Propanethiol	Leaf	0.297	0.114	0.018	0.152	0.112	0.011	0.211	0.052
		Stem	t	0.013	t	t	0.689	t	t	0.103
		Root	0.054	0.025	0.172	0.059	0.050	0.038	0.013	0.145
6	α -D Xylofuranoside	Leaf	t	t	0.046	t	t	0.278	t	0.101
		Stem	0.237	0.705	t	0.754	5.947	0.127	0.672	0.850
		Root	t	t	t	0.150	t	t	0.030	0.772
11	Phenol	Leaf	t	t	t	t	t	t	0.159	t
		Stem	0.558	0.821	t	1.346	0.324	t	0.974	1.364
		Root	1.849	0.069	0.051	1.123	0.088	0.103	0.594	0.231
15	12-Hydroxybutyric acid	Leaf	t	0.156	0.031	t	t	t	t	t
		Stem	t	t	t	0.157	0.101	0.008	0.080	0.138
		Root	0.093	0.144	0.070	0.075	0.092	0.098	0.073	0.035
18	Hexadecanoic acid	Leaf	0.225	0.159	0.096	t	0.278	0.026	0.073	0.243
		Stem	0.531	0.031	t	t	0.376	0.213	t	0.055
		Root	t	t	t	t	0.023	t	t	0.026
19	Ethyl tridecanate	Leaf	0.353	3.821	0.541	t	3.847	0.393	5.488	3.196
		Stem	3.281	5.634	1.583	4.352	9.345	2.761	2.817	2.444
		Root	5.584	0.077	0.040	3.699	0.119	0.206	2.080	0.195
22	Phytol	Leaf	t	t	t	t	t	t	t	t
		Stem	0.157	0.100	t	0.221	0.675	0.144	0.145	0.282
		Root	0.070	0.021	0.036	0.035	0.044	0.056	0.042	t
24	Linoleic acid	Leaf	t	t	t	t	t	t	t	t
		Stem	t	1.405	t	1.013	8.365	2.153	t	t
		Root	0.443	0.115	0.070	0.173	0.267	0.071	0.089	0.542

*D: days after treatment

Table 4-7-2. Phytoalexin production in the various parts of red pepper applied by chitosan after inoculation of *P. capsici*.

(Peak area/I. S. T. D peak area)

Peak No	Compound	Plant parts	CM331		
			100 times dillution		
			3DAT	6DAT	10DAT
3	1-Propanethiol	Leaf	0.117	t	t
		Stem	0.115	t	t
		Root	0.028	t	t
6	α -D-Xylofuranoside	Leaf	0.058	0.539	0.298
		Stem	t	t	t
		Root	t	0.882	0.119
11	Phenol	Leaf	t	t	0.032
		Stem	t	t	t
		Root	0.312	0.479	0.425
15	12-Hydroxystearic acid	Leaf	t	0.056	0.047
		Stem	0.151	0.169	0.193
		Root	0.085	0.242	2.679
18	Hexadecanoic acid	Leaf	0.328	0.287	0.187
		Stem	t	t	t
		Root	t	0.065	0.183
19	Ethyl tridecanate	Leaf	3.267	1.490	1.132
		Stem	t	2.654	1.660
		Root	2.235	0.242	0.465
22	Phytol	Leaf	2.005	0.406	2.854
		Stem	t	t	t
		Root	t	0.049	0.406
24	Linoleic acid	Leaf	t	t	t
		Stem	1.513	10.414	8.325
		Root	t	0.426	t

*DAT: days after treatment

Table 4-8. Capsidiol production in the various parts of red pepper applied by chitosan after inoculation of *P. capsici*.

(Peak area/I, S, T, D peak area)

Cultivar	Plant parts	100 times dillution			300 times dillution			500 times dillution		
		3DAT*	6DAT	10DAT	3DAT	6DAT	10DAT	3DAT	6DAT	10DAT
Subicho	Leaf	t	t	0.027	t	t	0.012	t	t	0.012
	Stem	0.120	2.596	2.140	0.105	2.375	0.985	0.175	0.248	0.198
	Root	t	0.734	1.126	0.986	1.010	0.334	0.492	0.580	0.345
CM331	Leaf	t	t	0.123	t	0.021	0.123	t	t	t
	Stem	0.134	1.683	3.119	1.215	3.457	2.083	0.345	0.969	0.876
	Root	0.015	1.213	2.153	1.056	1.688	1.012	0.213	0.745	0.564

*DAT: days after treatment

(5) UV 조사에 따른 Phytoalexin 생성 : UV조사 시간 및 조사 후 경과 시간별 phytoalexin 물질 함량을 조사 해 본 결과 (표 4-9, 4-10), 품종별로는 CM331이 수비초에 비하여 앞에서 1-propanethiol, phenol, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, phytol 등의 성분이 증가하였고, 줄기에서 ethyl tridecanate phytol 이 증가한 반면 1,2-benzendicarboxylic acid는 감소하였다. 뿌리에서는 Phenol, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate 등의 성분이 증가하였다. UV 조사 시간별로는 일정한 경향을 나타나지 않았으나, 조사 후 경과 일수가 길어질수록 앞에서 hexadecanoic acid의 함량이 감소하였고, 줄기와 뿌리에서는 1,2-benzendicarboxylic acid 함량이 높아졌다.

Table 4-9-1. Phytoalexin production of red pepper exposed by UV at different times.

(Peak area/I, S, T, D peak area)

Peak No.	Compound	Plant parts	Subicho					
			Times of UV irradiation					
			10 min			20 min		
			3 h ^a	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h
3	1-Propanethiol	Leaf	t	0.208	t	t	0.350	0.097
		Stem	0.116	0.289	0.082	t	0.359	t
		Root	2.415	1.374	0.798	t	t	0.285
6	α -D-Xylofuranoside	Leaf	0.135	0.148	t	0.182	0.084	t
		Stem	t	0.053	t	t	t	t
		Root	t	t	t	t	t	t
11	Phenol	Leaf	0.135	0.179	t	0.163	0.113	0.182
		Stem	t	0.106	0.110	0.141	0.350	0
		Root	2.301	6.830	2.954	0.973	t	1.345
13	Metalaxyl	Leaf	t	t	t	t	t	t
		Stem	t	t	t	t	t	t
		Root	t	t	t	t	t	t
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	Leaf	t	0.096	t	0.126	0.041	0.046
		Stem	t	0.070	0.089	0.034	0.052	0.162
		Root	0.206	t	0.326	t	t	0.197
18	Hexadecanoic acid	Leaf	1.107	0.404	t	1.621	0.552	0.215
		Stem	t	0.093	t	t	t	t
		Root	t	t	t	t	t	t
19	Ethyl tridecanate	Leaf	4.100	3.092	t	7.034	3.017	1.863
		Stem	6.786	6.961	2.274	11.979	6.957	2.247
		Root	35.226	37.097	17.303	28.082	t	17.197
22	Phytol	Leaf	7.837	t	r	t	1.191	1.010
		Stem	t	t	t	t	t	t
		Root	0.224	t	0.127	t	r	t
24	Linoleic acid	Leaf	t	t	r	t	t	t
		Stem	t	t	4.509	t	t	t
		Root	t	t	t	t	r	t

^a Times after UV irradiation

Table 4-9-2. Phytoalexin production of red pepper exposed by UV at different times.

(Peak area/I.S.T.D peak area)

Peak No.	Compound	Plant parts	Subicho						CM331	
			Times of UV irradiation							
			40 min			60 min			20 min	
			3 h*	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h	48 h	
3	1-Propanethiol	Leaf	t	0.220	0.126	t	0.226	0.103	0.246	
		Stem	t	0.151	0.025	t	t	0.372	t	
		Root	t	0.538	0.300	1.279	t	0.218	t	
6	α -D-Xylofuranoside	Leaf	0.120	0.260	0.071	0.059	0.196	0.208	0.045	
		Stem	t	0.054	t	t	t	t	0.082	
		Root	t	t	t	t	t	t	0.165	
11	Phenol	Leaf	0.150	0.287	0.113	t	0.166	0.137	0.367	
		Stem	0.101	0.110	0.517	0.122	0.122	0.104	t	
		Root	0.799	3.285	2.758	1.319	2.114	0.581	2.768	
13	Metalaxyl	Leaf	t	t	t	t	t	t	t	
		Stem	t	t	t	t	t	t	t	
		Root	t	t	t	t	t	t	t	
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	Leaf	t	0.063	0.041	0.063	t	0.049	t	
		Stem	0.339	0.478	0.750	t	t	0.065	0.072	
		Root	0.040	0.082	0.189	t	0.353	0.334	0.136	
18	Hexadecanoic acid	Leaf	0.645	0.532	0.129	0.623	0.370	0.062	0.355	
		Stem	t	0.056	0.038	t	t	t	t	
		Root	t	t	t	t	t	t	0.174	
19	Ethyl tridecanate	Leaf	3.652	3.116	0.653	4.383	3.476	0.351	2.039	
		Stem	9.673	5.537	2.068	15.337	12.381	4.308	3.551	
		Root	6.772	15.950	27.855	17.129	30.430	12.967	26.712	
22	Phytol	Leaf	3.710	2.139	0.561	t	1.720	0.484	1.749	
		Stem	0.145	t	t	t	t	t	0.052	
		Root	t	t	t	t	0.154	0.226	t	
24	Linoleic acid	Leaf	t	t	t	t	t	t	t	
		Stem	t	t	3.143	t	t	t	t	
		Root	t	t	t	t	t	t	t	

* Times after UV irradiation

Table 4-10. Capsidiol production of red pepper exposed by UV at different times.

(Peak area/I. S. T. D peak area)

Cultivar	Plant parts	Times of UV irradiation											
		10 min			20 min			40 min			60 min		
		3 h*	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h	3 h	24 h	48 h
Subicho	Leaf	0	0.075	0	0	0.142	0	0.085	0.130	0.128	0	0.098	0.093
	Stem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Root	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM331	Leaf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Root	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Times after UV irradiation

UV를 식물체에 10, 20, 40, 60분 조사시 수비초의 잎에서는 capsidiol이 생성되었으나, CM331의 전 부위 및 수비초의 뿌리와 줄기에서는 생성되지 않았다. 경과 시간별로는 UV 조사후 3시간 이내의 잎에서는 capsidiol이 생성되지 않았으나, 10분과 20분간의 UV조사후 24시간 경과시는 생성되었다. 그리고 40분과 60분간의 UV조사후 48시간 경과 시에도 capsidiol이 생성되었으며 그 이후에도 함량이 그대로 유지되는 것으로 나타났다.

2. 각종 Elicitor 처리에 의한 Capsidiol 생성과 메카니즘

고추 현탁배양세포에 4종의 elicitor를 처리하여 phytoalexin 생성여부를 조사 한 결과 (표 4-11, 그림 4-7), 수비초 및 CM331의 현

타배양세포에 pectinase 처리시는 무처리에 비하여 phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, phytol 등이 많이 생성되었고, jasmonic acid 처리시는 capsidiol, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl tridecanate, phytol 등의 성분, cellulase 처리시는 phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid 성분, chitioligosaccharide 처리시는 phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, phytol 등의 성분이 많이 생성되었다. 특히 1,2-benzendicarboxylic acid 성분은 공시한 전 elicitor 처리에서 CM331이 수비초에 비하여 많이 생성되었다. Capsidiol 성분은 수비초에 jasmonic acid 처리시에만 발현되었다. 추후 타 elicitor에 대하여 capsidiol 생성을 위한 농도 및 배양조건을 구명할 예정이다.

고추 현탁 배양세포에 공시된 elicitor를 처리한 후 무처리와 차이를 나타내는 Rf 0.17, 0.32, 0.51 부위를 MeOH로 추출하여 GC/MS를 동정해본 결과 (표 4-12), Rf 0.17 부위에는 1-propanethiol이, Rf 0.32에서는 capsidiol과 phytol이, Rf 0.5부위에서는 phenol, 2-benzendicarboxylic acid, hexadecanoic acid, ethyl tridecanate 등의 성분이 모든 처리에서 동정되었으며, 성분별로는 capsidiol은 jasmonic acid 처리시 Rf 0.32 부위에서 동정되었으나 타 elicitor 처리에서는 분리 동정되지 않았다. Phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid 성분들은 무처리에 비하여 공시한 전 elicitor에서 높은 함량을 나타내었다.

Table 4-11-1. Phytoalexin production of red pepper suspension cells treated by various elicitors.

(Peak area/I.S.T,D peak area)

Peak No	Compound	Subicho				
		Control	Pectinase	Jasmonic acid	Cellulase	Chitioligo-saccharide
3	1-Propanethiol	0.103	t	0.039	0.725	0.368
11	Phenol	0.104	0.283	0.096	3.925	7.548
14	Capsidiol	t	t	0.311	t	t
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	0.798	0.805	2.204	2.320	1.637
18	Hexadecanoic acid	0.115	0.154	0.083	0.336	0.142
19	Ethyl tridecanate	t	1.777	0.075	0.077	4.065
22	Phytol	t	0.317	0.115	0.227	t

Table 4-11-2. Phytoalexin production of red pepper suspension cells treated by various elicitors.

(Peak area/I.S.T,D peak area)

Peak No	Compound	CM331				
		Control	Pectinase	Jasmonic acid	Cellulase	Chitioligo-saccharide
3	1-Propanethiol	t	0.032	t	0.023	t
11	Phenol	0.061	0.092	0.157	0.082	0.156
14	Capsidiol	t	t	t	t	t
15	1,2-Benzendicarboxylic acid	0.021	0.424	4.058	2.542	0.196
18	Hexadecanoic acid	0.082	0.086	0.042	0.014	0.085
19	Ethyl tridecanate	t	t	t	0.122	0.274
22	Phytol	0.048	0.019	0.064	t	0.045

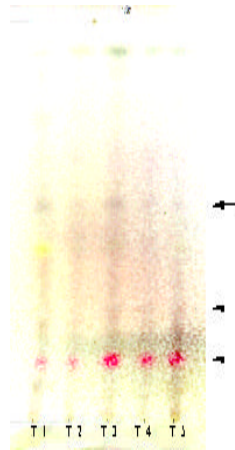


Fig. 4-7. Phytoalexin identification from red pepper suspension cells treated by elicitors on a TLC. T1: Control, T2: Pectinase, T3: Jasmonic acid, T4: Cellulase, T5: Chitinoligosaccharides

Table 4-12. Phytoalexins in red pepper suspension cells treated by various elicitors on a TLC.

(Peak area/1.S.T.D peak area)

Peak No	Compound	Subicho															
		Control			Pectinase			Jasmonic acid			Cellulase			Chitinoligosaccharides			
		Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	
3	1-Propanethiol	0.009			t			0.005			t					t	
11	Phenol			0.008			0.020				0.025			0.032			0.040
14	Capsidiol								0.007								
15	12-Benzoinic acid			0.024			0.654			0.047				0.151			0.241
18	Hexadecanoic acid			0.002			t			0.052				0.032			0.100
19	Ethyl tridecanate			0.071			t			0.039				0.011			0.080
22	Phytol		t			t			0.005				0.002			0.002	

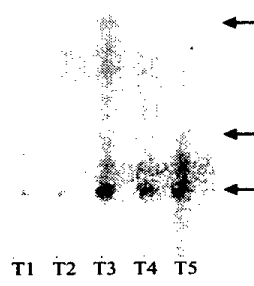


Fig. 4-7. Phytoalexin identification from red pepper suspension cells treated by elicitors on a TLC. T1: Control, T2: Pectinase, T3: Jasmonic acid, T4: Cellulase, T5: Chitioligosaccharides

Table 4-12. Phytoalexins in red pepper suspension cells treated by various elicitors on a TLC.
(Peak area/I, S, T, D peak area)

Peak No	Compound	Subicho														
		Control			Petinase			Jasmonic acid			Cellulase			chitioligo-saccharides		
		Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5	Rf 0.1	Rf 0.3	Rf 0.5
3	1-Propancthiol	0.009			t			0.005			t			t		
11	Phenol			0.003			0.020			0.026			0.035			0.040
14	Capsidiol							0.007								
15	1,2-Hexadecarboxylic acid			0.024			0.655			0.047			0.157			0.241
18	Hexadecanoic acid			0.008			t			0.052			0.005			0.100
19	Ethyl tridecanate			0.071			t			0.039			0.011			0.090
22	Phytol		t			t			0.006			0.005			0.005	

3. 스트레스에 의한 항산화효소 활성 및 동위효소패턴의 변화

환경스트레스인 역병균 접종, UV-B 조사 등에 따른 감수성품종과 저항성품종의 POD와 SOD 활성을 조사 해 본 결과(Table 4-13, 4-14), 역병 감수성 및 저항성 품종 공히 무처리에 비하여 역병균 및 UV-B 처리시에 POD 활성이 식물체의 전 부위에서 증가하였다. 품종간에는 전 부위에서 수비초가 금탑에 비하여 높았으며, 특히 역병균 처리시 수비초 줄기에서의 POD 활성이 금탑에 비하여 활성증가율이 높았다. SOD 활성은 무처리에 비하여 잎에서는 감소하였으나, 줄기와 뿌리에서는 증가하는 경향이였다. 특히 역병균 접종시 무처리에 비하여 수비초의 줄기에서 9.5배, 뿌리에서는 39.7배의 활성이 증가하였다.

이러한 경향은 역병저항성품종인 금탑에 비하여 감수성품종인 수비초에서 현저히 나타내고 있어 감수성품종은 환경스트레스에 의하여 항산화효소 활성의 변화가 큰 것으로 나타났다. 무처리시는 저항

Table 4-13. Peroxidase activity of red pepper inoculated by *P. capsici* and exposed by UV.

(unit/mg protein)

Plant parts	Untreated control		Inoculation of <i>P. capsici</i>		UV irradiation (20min)	
	Subicho	Kumtap	Subicho	Kumtap	Subicho	Kumtap
Leaf	0.016	0.009	0.31	0.26	0.33	0.22
Stem	0.044	0.026	2.46	0.64	0.48	0.22
Root	0.071	0.073	16.90	1.21	0.69	0.58

Table 4-14. Superoxide dismutase activity of red pepper inoculated by *P. capsici* and exposed by UV.

(unit/mg protein)

Plant parts	Untreated control		Inoculation of <i>P. capsici</i>		UV irradiation (20min)	
	Subicho	Kumtap	Subicho	Kumtap	Subicho	Kumtap
Leaf	57.5	37.0	37.6	70.0	49.3	17.5
Stem	17.7	30.3	168.9	42.8	21.8	131.4
Root	11.8	100.0	468.5	106.7	17.7	84.0

성품종인 금탑의 줄기와 뿌리에서 POD 활성이 감수성품종인 수비초에 비하여 높게 나타났으나, 역병균접종, UV-B 처리 등에 의하여 오히려 수비초가 SOD 활성이 높게 나타나고 있다.

수비초의 처리조건에 따른 POD, SOD isoenzyme 패턴을 분석한 결과, 잎의 POD isoenzyme 패턴은 무처리의 경우 2개, 역병균처리시에서 5개, UV조사시는 3개의 isoenzyme이 나타났다. 줄기의 경우에는 무처리와 UV처리시는 2개의 isoenzyme이 동일하게 나타났고 역병균처리시는 6개의 패턴이 존재하였다. 뿌리는 무처리와 UV조사시 3개의 isoenzyme이 존재하고 역병균 접종시는 7개의 isoenzyme이 나타났다. SOD isoenzyme 패턴은 무처리의 경우 전부위에서 패턴이 나타나지 않았고 역병균처리시는 뿌리에서 3개의 isoenzyme이 존재하고 잎, 줄기의 경우 패턴이 나타나지 않았다.

금탑의 POD isoenzyme 패턴을 분석한 결과, 잎은 무처리시 1개, 역병균처리시 6개, UV 처리시에는 4개의 isoenzyme이 나타났다. 줄

기는 무처리의 경우 2개, UV조사시는 3개의 isoenzyme이 존재하였다. 뿌리의 경우는 3개 처리에서 모두 9개의 isoenzyme 패턴이 존재하였고, 역병균처리시 isoenzyme 패턴이 강하게 나타났다. SOD isoenzyme 패턴은 무처리의 경우 앞은 2개, 뿌리에서 1개의 isoenzyme이 나타났고, 줄기는 패턴이 없었다. 역병균처리시와 UV 조사시에는 잎과 줄기의 경우 모두 isoenzyme이 나타나지 않았고 뿌리에서는 2개의 isoenzyme이 존재하였다.

제4절 적 요

고추의 생육과정과 재배환경조건에 따라 고추의 역병 저항성 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 phytoalexin인 capsidiol의 생성 및 축적과 역병저항성과의 관련성을 조사한 결과는 다음과 같다.

역병균의 접종에 의하여 수비초는 접종 후 3일째에 발병되었으나 저항성인 CM331은 6일 후에도 발병되지 않았으며 metalaxyl과 키토산 처리는 역병의 발병을 지연시키는 효과가 있었다.

역병균의 접종에 의해 저항성 품종계통인 YCM331가 공시된 고추품종 중에서 줄기 내의 capsidiol 함량이 가장 높았고, 감수성 품종인 수비초가 가장 낮았다. Metalaxyl 단독 처리는 capsidiol 생성을 유도하지 못하였으나 metalaxyl 처리 후 역병균 접종시에 YCM334의 capsidiol 생성이 가장 높게 나타났다.

고추 역병 감수성 품종인 수비초와 저항성품종인 CM331 식물체의 부위별로 성분을 분리 동정 해 본 결과, 총 70개의 성분 중에서 두

품종간에 차이를 보이는 성분은 30개였다. 고추의 역병 발병정도가 심할수록 앞에서는 hexadecanoic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등의 지방산 성분들이 감소하였고, 줄기에서는 phenol, ethyl tridecanate, phytol 등이 증가하였으나, 1,2-benzendicarboxylic acid, linoleic acid 등의 성분은 감소하였다. 뿌리에서는 α -D-xylofuranoside, phenol, 1,2-benzendicarboxylic acid, ethyl tridecanate, linoleic acid 등이 감소하였다.

UV를 식물체에 10, 20, 40, 60분 조사시 수비초의 앞에서는 capsidiol이 생성되었으나, CM331의 전 부위 및 수비초의 뿌리와 줄기에서는 생성되지 않았다.

고추 현탁배양세포에 pectinase, jasmonic acid, cellulase, chitioligosaccharide 등의 elicitor를 처리하였을 때 무처리에 비해 생성이 많이 되는 물질이 다수 있었으나 품종간이 차이를 보였다. 그러나 1,2-benzendicarboxylic acid 성분은 공시한 전 elicitor 처리에서 CM331이 수비초에 비하여 많이 생성되었고 capsidiol 성분은 수비초에 jasmonic acid 처리 시에만 발현되었다.

역병균 및 UV-B 처리시에 POD와 SOD의 활성 변화를 보면 POD 활성은 역병 감수성 및 저항성 품종 공히 무처리에 비하여 식물체의 전 부위에서 증가하였다. 품종간에는 전 부위에서 수비초가 금탑에 비하여 높았다. SOD의 활성은 역병균 접종시 무처리에 비하여 수비초의 줄기에서 9.5배, 뿌리에서는 39.7배의 활성이 증가하였다.

제5절 참고문헌

- Back K., He S., Kim K. U. and Shin D. H. 1988. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 39(9):899-904.
- Back K., Jang S., Lee B., Strack D. and Kim K. 2001. Cloning and Characterization of a Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine N-(Hydroxycinnamoyl)Transferase Induced in Response to UV-C and Wounding from *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 42(5):475-81.
- Back K., Nah J., Lee S., Song J., Shin D. and Kim H. 2000. Cloning of a sesquiterpene cyclase and its functional expression by domain swapping strategy. *Mol Cells.* 30:10(2):220-5.
- Barksdale T., Papavizas G. and Johnston S. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora Capsici*. *Plant Dis.* 68:506-509.
- Darvill A., McNeil M., Fry S. and Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem.* 53:625-63.
- Ebel J., Bonhoff A., Loyal R., Feller K. and Grisebach H. 1986. Further investigations of race:cultivar-specific induction of enzymes related to phytoalexin biosynthesis in soybean

- roots following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Biol Chem Hoppe Seyler. 367(8):797-802.
- Hain R., Reif H. J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H. and Stocker R. H. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature 361(6408):153-6.
- Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Umemura K., Kikuchi M. and Ogasawara N. 1988. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. J Biol Chem. 273(48):31985-91.
- Lee T., Mizubuti E. and Fry W. 1999. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. Fungal Genet Biol. 26(2):118-30.
- Leonian L. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopath. 12:401-408.
- Loyal R., Ebel J. and Schmidt W. E. 1984. Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. Arch Biochem Biophys. 232(1):240-8.
- Stoessl A., Stothers J. B. and Ward E. W. B. 1976. Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. Phytochemistry 15: 855-872.

- Stoessl A., Unwin C. H. and Ward E. W. B. 1972. Post-infectional inhibitors from plants. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopath. Z.* 74: 141-152.
- Ward, E. W. B. 1976. Capsidiol production in incompatible interactions with fungal. *Phytopathology* 66:175-176.
- Weber G. 1932. Blight of peppers in florida caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopath.* 22:775-780.
- Yin S., Mei L., Newman J., Back K. and Chappell J. 1997. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiology* 115(2):437-51.
- Yu L. M. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(10):4088-94. Review.

제 5 장 고추 역병저항성 형질전환체 육성 및 저항성 검정

제1절 서 설

고추는 재배면적이 74,471 ha이며, 연간 생산량도 193천여 ton에 이르는 우리나라에서 가장 중요한 채소작물로서 탄저병, 역병, 세균성점무늬병 등의 병해에 의한 피해가 해마다 심각한 것으로 보고되고 있다 (농촌진흥청, 1995). 특히 역병은 토양전염병으로서 고추를 연작할 경우 심하게 발생하고, 수메전염을 하기 때문에 여름철 비가 많고 습한 기후 조건에서는 급격하게 발생하여 피해를 주며, 배수가 불량하면 그 피해가 더욱 심각한 병으로 전국적으로 고추 수확량을 결정하는 중요한 요인으로 작용하고 있다 (김동, 1979; 경북농촌진흥원, 1997). 역병방제를 위해 토양이나 경엽에 많은 약제를 살포하고 있으나 방제비용이 매우 높은 반면, 다른 병과 비교하면 방제효과가 상당히 낮은 편이다. 그러나 농가당 경지면적이 협소하고, 고추를 대체하여 재배할 소득작목이 없어 농가에서는 매년 연작을 하고 있어 막대한 피해를 보고 있는 실정이다.

고추의 역병은 Leonian (1922)에 의해 New Mexico의 las Cruces 부근 포장에서 발생한 것이 처음으로 분리, 동정되었다. 1960년 Kimble과 Grogan은 고추의 역병에 저항성인 계통을 처음으로 보고하였는데 PI201234가 가장 강한 것으로 보고하였다. 역병의 저항성 유전의 양식은 여러 가지 설이 있다. Smith 등 (1967)은 상가적 효과

가 없는 두 개의 우성유전자가 관여한다고 하였고, Barksdale 등 (1984)은 1개의 우성유전자에 의해 지배된다고 하였으며, Gil 등 (1991)은 3개의 유전자가 관여한다고 하였다.

앞선 많은 연구에서 PI201234 (Kimble과 Grogan, 1960), ACC2258 (Gil 등, 1990), SCM334 (Alcantara와 Bosland, 1994; Gil 등, 1991) 등 세계적으로 인정받는 역병 저항성 계통들이 선발되었다. 또한 현재까지 고추에 있어서 역병의 극복을 위한 교잡육종이 계속되어 왔다. 그러나 우리나라에서 재배하고 있는 시판 품종들은 아직까지 높은 수준의 역병저항성과 품질을 동시에 갖추지는 못하였다. 이는 우리의 건고추용 품종과 저항성 재료와의 과특성에 차이가 많아 교잡을 이용한 육종에서는 건과품질의 저하로 상업적인 품종육성에 어려움을 겪고 있기 때문이다.

교잡육종법에 의한 역병 저항성 품종 개발 연구가 많이 시도되었으나 아직 실용 가능한 결과가 나오지 않고 있고, 최근 농업의 발전 방향이 친환경 농업 쪽으로 바뀌어 가고 있어, 무공해 작물에 대한 소비자들의 욕구가 높아지고 있기 때문에 길항미생물을 이용한 생물학적인 병해 방제법, 이온수 등을 이용한 방제법 등이 많이 연구되고 있다 (홍순성, 1990; 박경석 등, 1989). 뿐만 아니라 농약의 사용을 줄일 수 있는 환경친화형 품종개발, 즉 식물의 생체방어기작을 이용한 자동면역시스템을 갖춘 식물체 개발에 대한 관심이 고조되고 있다.

최근 유전공학 분야의 급속한 발전으로 많은 작물에서 여러 가지 유전자 운반체와 표지유전자가 개발되어 유용 유전자를 식물체내로 도입하여 새로운 식물체를 육성할 수 있게 되었다 (An G, 1987; Horsch, 1985). 최근에 형질전환 기술을 이용하여 제초제 (Shah,

1986), 바이러스 (Harrison 등, 1987; Powell-Abel 등, 1986)에 대한 저항성을 도입한 농작물의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다. 고추도 국내외에서 유용유전자의 도입을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 자엽, 본엽, 배축 등을 이용하여 고추의 형질전환을 시도하고 (Arroyo와 Revilla, 1991; Diaz 등, 1988; Fari와 Czako, 1981) 있지만 고추는 형질전환 빈도가 낮으며 (Lee 등, 1993), 타작물에 비해 형질전환이 어려워 유전자 도입을 통한 새로운 신품종 개발에 장애가 되고 있다 (Arroyo와 Revilla, 1991; Phillips와 Hubstenberger, 1985).

본 연구는 고추재배에서 가장 큰 문제인 역병피해를 줄일 수 있는 저항성 품종을 육성하기 위해서 형질전환 시스템 및 유용 유전자의 도입의 체계를 확립하고 형질전환식물체를 육성하기 위하여 수행하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 고추의 조직으로부터 Callus 유도 및 식물체 재분화

고추의 형질전환을 위한 재분화 배지조건을 구명하기 위하여 경북 북부지방에서 재래종으로 재배되고 있는 수비초와 칠성초의 자엽과 본엽의 조직을 이용하였다. 종자는 70% ethanol에서 30초, 2% NaOCl에서 15분간 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 MS기본배지에 치상하였다. 치상 후 10~15에 자엽을 채취하였고, 본엽은 2~3 cm 정도 전개된 것을 이용하였다. 자엽의 callus 유도를 위해서는 MS기본배지에 Zeatin 1, 2, 3 mg/L과 NAA 0.01, 0.05, 0.1 mg/L를 각

조합으로 혼합한 배지 조성을 이용하였고, 본엽의 callus 유도를 위해서는 MS 기본배지에 zeatin 2 mg/L, BA 2, 4, 8 mg/L, NAA 0.05, 0.1 mg/L, IAA 0.1, 0.5, 1.0 mg/L을 조합하여 사용하였다.

고추의 자엽조직으로부터 direct shoot분화를 유도하기 위하여 영양지방의 재래종인 수비초와 시판종인 금탑을 사용였다. 고추 절편체는 MS배지에 종자를 파종한 후 10~12일 생육시킨 자엽을 절단하여 이용하였다. Shoot를 유도하기 위해 MS 배지에 zeatin 1, 2, 3, 4, 5 mg/L처리, BA 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L처리와 zeatin 2, 3, 4 mg/L와 NAA 0.01, 0.05, 0.1 mg/L를 조합하여 이용하였다. Root를 유기하기 위해서 MS배지에 NAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L와 IAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L를 첨가하였다. 치상엽수는 처리당 10개체 4반복으로 하였고, 배양환경은 온도 $25\pm 1^\circ\text{C}$, 16시간 명조건에서 배양하였으며, 분화율은 치상후 30일 경과 후 조사하였다.

2. 형질전환에 의한 고추 역병저항성 식물체 육성

고추의 형질전환 시스템 개발을 위하여 *Agrobacterium*을 이용하여 주관연구기관인 경북대에서 작성한 7종의 gene constructs를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 식물재료로 수비초, 금탑을 이용하여 종자는 70% ethanol에서 30초, 2% NaOCl에서 15분간 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 MS기본배지에 집기병당 20 ~ 30립을 치상하여 25°C 에서 발아시켰다. 치상 후 10 ~ 14째에 자엽을 절단하여 explants로 사용하였다. *Agrobacterium* [LBA4404/pBI101 CASC or cyc600 promoter + syn α (elicitin gene)]은 LB배지에 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 고체배지에서 colony를 증식하여, LB배지에

kanamycin 50 mg/L가 첨가된 액체배지상에서 28℃, 150 rpm의 조건에서 1일간 현탁배양하였다. 배양된 균주는 5,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 MS액체배지로 녹여 사용하였다.

고추 형질전환은 자엽을 치상하여 전배양, 공동배양, 선택배지 배양을 통해 Shoot를 유기시켰다 (그림 5-1). Shoot를 유기하기 위해 고추 재분화 시험에서 선발된 생장조절제 조합인 Zeatin 3, 4 mg/L + NAA 0.05 mg/L가 첨가된 MS배지를 사용하였다. Zeatin 4 ppm, NAA 0.05 ppm, AgNO₃ 5 ppm을 첨가한 MS배지에서 전배양 2, 3 일, 공동배양 2, 3, 4일처리를 하였다. 자엽의 엽병 유무에 따른 재분화율은 Zeatin 3, 4 ppm과 NAA 0.05 ppm을 첨가한 MS배지 수행하였다. 모든 처리는 온도 25±1℃, 16시간 명조조건에서 배양하였다. Root의 유도배지는 NAA 0.5 mg/L로 하였다.

형질전환된 식물체에 형질전환 유전자의 도입을 확인하기 위하여 PCR 방법을 이용하였다. DNA 추출은 형질전환체의 잎조직 0.5 g을 CTAB법에 의해 수행하였고, PCR 분석을 위해 반응액은 TAKARA Tag 1ul (5 U/ul), dNTP mixture (2.5 mM) 1ul, 10×PCR Buffer 5 ul, primer 2 ul, template DNA 2 ul와 H₂O 39 ul로 전체가 50 ul가 되도록 하였다. Primer는 kanamycine 저항성인 NPT II 유전자의 primer 인 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGCTA-3'와 5'-CAACAATGATATTCGGCAAG-3'을 이용하였다. PCR 반응은 Perkin Elmer사의 PCR system 2400 기종을 사용하여 95℃ 3분 그리고 94℃ 1분, 60℃ 20초, 72℃ 1분으로 해서 35 cycle 반응시킨 후 72℃에서 7분간 extension하였다. PCR 반응에 의해 536 bp의 밴드를 확인한 후 membrane에 blot하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석을 하였다.

3. 병저항성 형질발현 및 품종의 특성조사

본 연구에서 확립한 고추 형질전환 조건인 MS 배지 + zeatin 3.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L에서 획득한 elicitor gene을 이용한 고추역병 저항성 형질전환체는 영양고추시험장의 육종온실에서 화분에 재배하였다. 수비초 형질전환체 (T_0)는 S1~S5로 계통명을 부여하여 관리하였다. T_0 식물체는 온실에서 자식봉지를 이용하여 2000년 4월 ~ 5월에 후대 종자를 채종하였다. 채종된 종자는 6월 22일에 계통별로 파종하여 7월 6일 원조믹스상토가 충진된 직경 12 cm 비닐포트에 이식하였다. 고추의 생육특성은 농촌진흥청 신품종 심사를 위한 특성조사요령과 농사시험 표준조사방법에 준하여 초장은 지저부에서 최장엽단까지의 길이, 주경장은 지저부에서 제1화방까지의 길이, 경경은 지저부 줄기의 직경을 조사하였다. 과특성에 있어서 과육두께는 성숙과의 중간부위, 과장은 과탁으로부터 과정단까지의 길이, 과경은 과실의 최대 직경을 조사하였다.

T_0 식물체에서 채종한 T_1 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. 형질전환된 식물체 잎조직을 0.5 g을 채취하여 CTAB 법에 의해 DNA를 추출하였고, PCR 분석은 Bioneer사의 AccuPower PCR PreMix을 이용하여 primer 2 μ l, template DNA 1 μ l 와 초순수물로 전체 20 μ l가 되도록 양을 맞추었다. PCR 반응은 Perkin Elmer사의 PCR system 2400기종을 사용하여 94 $^{\circ}$ C 2분 그리고 94 $^{\circ}$ C 1분 30초, 50 $^{\circ}$ C 2분, 72 $^{\circ}$ C 2분간으로 해서 35 cycle 반응시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension 하였다. *Syn α* 와 같은 유전자인지를 확인하기 위하여 *syn α* gene을 probe로 이용하여 Southern blot analysis를 하였다.

4. 고추 역병저항성 식물체의 병검정과 포장시험

형질전환체의 종자를 2001년 2월 5일에 베노람수화제 200배액에서 1시간 소독 후 침종하여 2월 6일 전열선이 설치된 온실에 파종하였다 (표 5-1). 형질전환체 9계통과 대비로 수비초와 금탑을 사용하였다. 2월 28일 원조믹스 상토로 충전된 25공 포트에 본엽이 2 ~ 3매 전개 된 고추 묘를 가식하여 하우스에서 육묘하였다.

Table 5-1. Transgenic plants of red pepper (T₁, T₂)

Line	Parent	Generation
0101	S ₁	T ₁
0102	S ₂	T ₁
0103	S ₃	T ₁
0104	S ₄	T ₁
0105	S ₅	T ₁
0106	S ₁	T ₂
0107	S ₃	T ₂
0108	S ₅	T ₂
0109	S ₄	T ₂

역병 저항성 검정을 위해 역병균 (*Phytophthora capsici*)을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 5일간 배양한 후 직경 5 mm의 균총을 Petri dish에 분주한 V8배지 (V8주스 200 ml + agar 20 g + 증류수 800 ml)에 이식하여 28℃에서 14시간 배양하였으며, 유주포자낭을 형성하기 위해 실내 (약 20℃)에서 5일간 배양한 후 배지 표면에 살균수를 가하여 유주포자낭 현탁액을 만든 다음, 7℃에서 1시간, 실온에서 3시간 경과시킨 후에 유주포자낭으로부터 방출된 유주포자를 혈구계측기로 계수하여 유주포자 현탁액을 10³ ~ 10⁵ 개/ml

농도도 조정하여 사용하였다. 역병의 접종은 3월 30일에 본업 4-5매 시기의 고추 표에 역병 유주포자 농도별도 주당 5 ㎖을 관주하고 2일간 습실처리를 하였다 (그림 5-1). 접종 5일, 12후에 역병발병률을 2차 조사하였다.



Fig. 5-1. Transgenic red pepper inoculated with *Phytophthora* blight.

포장시험은 경상북도농업기술원 영암고추시험장 포장에서 수행하였다. 포장준비는 정식 2주전에 비료 및 석회, 퇴비를 포장에 사용한 후 5월 10일에 정식하였다. 시비량은 N-P-K-석회-퇴비=180-112-148- 750-30,000 kg/ha로 하여 P, 석회, 퇴비는 전당기비도 N, K는 30% 기비, 70%는 추비로 정식 후 30일 후부터 25일 간격으로 4회 사용하였다. 재배방법은 재식거리 160×40 cm, 2열이며, 비배관리 및 병해충방제는 일반 농가재배관리에 준하며, 8월 역병 발생 및 본포생육을 농사시험연구 표준조사방법에 기준하여 조사하였다.

농도로 조정하여 사용하였다. 역병의 접종은 3월 30일에 본엽 4-5매 시기의 고추 묘에 역병 유주포자 농도별로 주당 5 ml을 관주하고 2일간 습실처리를 하였다 (그림 5-1). 접종 5일, 12후에 역병발병주를 2차 조사하였다.

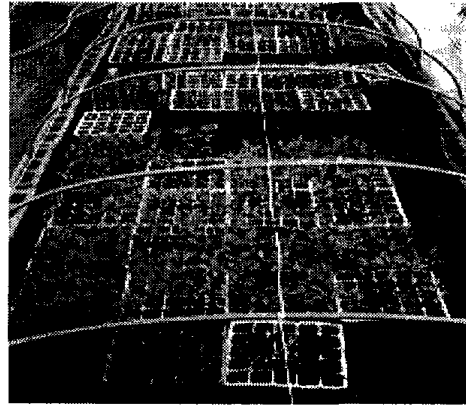


Fig. 5-1. Transgenic red pepper inoculated with *Phytophthora* blight.

포장시험은 경상북도농업기술원 영양고추시험장 포장에서 수행하였다. 포장준비는 정식 2주전에 비료 및 석회, 퇴비를 포장에 사용한 후 5월 10일에 정식하였다. 시비량은 N-P-K-석회-퇴비=190-112-149- 750-30,000 kg/ha로 하여 P, 석회, 퇴비는 전량기비로 N, K는 30% 기비, 70%는 추비로 정식 후 30일 후부터 25일 간격으로 4회 사용하였다. 재배방법은 재식거리 160×40 cm, 2열이며, 비배관리 및 병해충방제는 일반 농가재배관리에 준하며, 8월 역병 발생 및 본포생육을 농사시험연구 표준조사방법에 기준하여 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 고추의 조직으로부터 Callus 유도 및 식물체 재분화

생장조정제 종류 및 농도에 따른 고추 자엽의 callus 형성정도는 수비초의 경우 Zeatin 1 mg/ℓ + NAA 0.1 mg/ℓ 처리를 제외한 모든 처리에서 양호하였으며, 칠성초는 수비초에 비해 callus 형성정도가 떨어지는 경향이였다 (표 5-2). 본엽의 경우 자엽에 비해 callus 형성정도가 감소하였으나, 수비초, 칠성초 모두 zeatin 2 + BA 4 + NAA 0.05 + IAA 0.5 mg/ℓ 처리구에서 다소 높은 경향을 나타냈다 (표 5-3). 본엽보다 자엽에서 callus의 형성이 양호하였으나 두 조직 모두 형성된 callus로부터 식물체로의 재분화는 잘 되지 않았다.

Table 5-2. Effect of plant growth regulators on callus formation from cotyledon of red pepper.

Plant growth regulators (mg/L)		Callus formation	
Zeatin	NAA	Subicho	Chilsungcho
1	0.01	++ [♪]	++
	0.05	+++	++
	0.10	+++	+++
2	0.01	+++	++
	0.05	+++	+++
	0.10	+++	+++
3	0.01	+++	++
	0.05	+++	+++
	0.10	+++	+++

♪ - ~ ++++ : no formation ~ good

Table 5-3. Effect of plant growth regulators on callus formation from first leaf of red pepper.

Plant growth regulators (mg/L) ¹⁾			Callus formation	
BA	NAA	IAA	Subicho	Chilsungcho
2	0.05	0.1	+ ²⁾	+
		0.5	+	+
		1.0	++	++
	0.10	0.1	++	++
		0.5	+	+
		1.0	+	+
4	0.05	0.1	+	+
		0.5	+++	+++
		1.0	-	-
	0.10	0.1	++	++
		0.5	++	++
		1.0	-	-
8	0.05	0.1	-	-
		0.5	+	+
		1.0	-	-
	0.10	0.1	-	-
		0.5	+	-
		1.0	-	-

¹⁾ Zeatin : 2 mg/l

²⁾ - ~ ++++ : non formation ~ good

Table 5-4. Effect of zeatin concentration on shoot regeneration from cotyledon of red pepper.

Zeatin (mg/L)	Shoot regeneration (%)	
	Subicho	Kumtap
1	30.0	33.3
2	28.3	56.7
3	36.7	58.3
4	60.0	80.0
5	65.0	78.3

고추의 지엽조직으로부터 shoot 분화를 위해 생장조절제를 첨가했을 때 zeatin 4 mg/L에서 분화율이 수비초 60%, 금탑 80%로 높았고 (표 5-4), BA의 경우 수비초는 6 mg/L에서 46.7%, 금탑은 8 mg/L에서 65.0%로 나타났다 (표 5-5). 적절한 Shoot 분화를 위해서는 BA의 경우 zeatin 보다 2배 정도의 농도가 필요하였으며, 두 생장조절제에서 재래 고정종인 수비초보다 시판 교잡종인 금탑의 shoot 분화율이 높았다. Zeatin과 NAA 혼용시 (표 5-6) 수비초와 금탑에서 zeatin 2 ~ 4 mg/L에서 NAA 0.05 mg/L 혼용에서 shoot의 분화율이 90% 이상이었고, NAA 0.1 mg/L에서는 shoot 분화율이 낮아지는 경향이 있었다. Zeatin과 NAA 혼용시 분화율은 높았지만, callus의 생장으로 초기 shoot의 성장에 다소 영향이 있었다. 생장조절제 첨가시 root 분화율은 NAA 0.5 mg/L에서 수비초 75.0%, 금탑 85.0%였고 (표 5-7), IAA 1.0 mg/L에서 수비초 68.3%, 금탑 81.7%로 양호하였다. 적절한 root의 분화를 위해서 IAA는 NAA보다 높은 농도가 필요하였다. 두 생장조절제 모두 시판종인 금탑이 재래종인 수비초보다 root 분화율이 높았다.

Table 5-5. Effect of BA concentration on shoot regeneration from cotyledon of red pepper.

BA (mg/L)	Shoot regeneration (%)	
	Subicho	Kumtap
1	6.7%	1.7%
2	25.0	43.3
4	41.7	46.7
6	46.7	51.7
8	41.7	65.0
10	50.0	53.3

Table 5-6. Combinational effect of zeatin and NAA on shoot regeneration from cotyledon of red pepper.

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot regeneration (%)	
Zeatin	NAA	Subicho	Kumtap
2	0.01	82.0	90.0
	0.05	98.0	90.0
	0.1	98.0	80.0
3	0.01	80.6	85.2
	0.05	94.6	96.3
	0.1	88.9	97.2
4	0.01	97.2	77.8
	0.05	100	100
	0.1	100	51.9

Table 5-7. Effect of plant growth regulators on root regeneration from first leaf of red pepper.

Plant growth regulators (mg/L)		Root regeneration (%)	
		Subicho	Kumtap
NAA	0.01	46.7	11.7
	0.05	58.3	60.0
	0.1	56.7	76.7
	0.5	75.0	85.0
	1.0	51.7	95.0
IAA	0.01	30.0	13.3
	0.05	31.7	13.3
	0.1	38.3	25.0
	0.5	36.7	93.3
	1.0	68.3	81.7

2. 형질전환에 의한 고추 역병저항성 식물체 육성

고추 자엽에 *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 CASC or cyc600 promoter + syn α)을 이용한 형질전환 실험 (그림 5-2)에서 cyc600 promoter + syn α construct을 도입하여 식물체를 얻었는데, shoot의 형성율은 수비초의 경우 zeatin 3 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 11.1%, zeatin 4 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 12.8%로 나타났다 (표 5-8). 형질전환시 전배양과 공동배양기간에 따른 재분화율은 표 5-9과 같다. 전배양 기간에 따른 재분화율은 3일에서 높았으며, 공동배양의 경우 2일 27.8%, 3일 69.4%, 4일 66.7%로 고추 형질전환시 전배양과 공동배양은 3 ~ 4일 정도가 적당하였다. 치상된 자엽의 엽병 유무에 따른 재분화율은 zeatin 3, 4 ppm과 NAA 0.05 ppm을 첨가한 MS 배지에서 조사한 결과(표 5-10), 형질전환시 이용되는 자엽은 엽병을 포함하여 치상시 재분화율이 높았다.

자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 NPTII 유전자의 primer을 이용한 PCR 반응에서 형질전환이 되지 않은 intact 고추 (Lanes 4)에서는 536 bp의 밴드가 나타나지 않았으나 형질전환된 재분화 식물체 중에서 Lanes 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13에서는 536 bp의 PCR product를 관찰할 수 있었고 Lanes 8, 11, 14에서는 product가 나타나지 않았다 (그림 5-3). PCR 분석에 의해 536 bp의 밴드를 확인한 후 membrane에 blot하여 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석을 한 결과, 그림 5-4에서 보는 바와 같이 536 bp 부위에 밴드와 signal을 관찰할 수 있었는데, Lane 11, 12, 13의 고추형질전환 식물체에서 강한 signal을 보였다. 따라서 본 연구에서 확립한 형질전환 시스템으로 형질전환 고추 식물체의 육성이 가능할 것이다.

Table 5-8. Shoot regeneration from cotyledon of Subicho as cocultivated with *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600-syn α).

Plant growth regulators (mg/L)	Inoculated cotyledon	Number of shoots	Shoot regeneration (%)
Zeatin 3 + NAA 0.05	207	23	11.1
Zeatin 4 + NAA 0.05	288	37	12.8

Table 5-9. Influence of pre- and co-cultivation with *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 cyc600-syn α) on shoot regeneration from cotyledon of red pepper.

Coculture period (Days)	Preculture period (Days)	
	2 (%)	3 (%)
2	10.6	27.8
3	27.3	69.4
4	63.9	66.7

Table 5-10. Effect of petiole on shoot regeneration from cotyledon of red pepper for transformation.

Plant growth regulators (mg/L)	Petiole	Non petiole
	Shoot regeneration (%)	
Zeatin 3 + NAA 0.05	9.5	2.4
Zeatin 4 + NAA 0.05	13.9	8.3

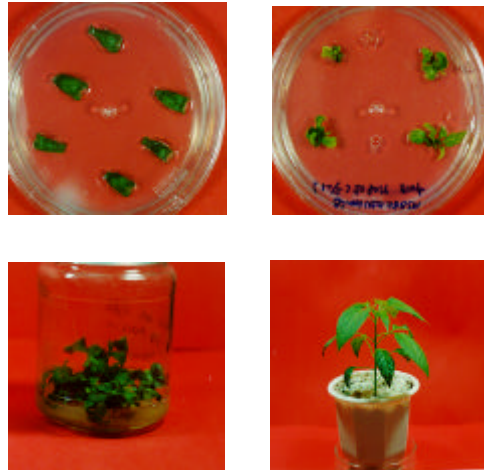


Fig. 5-2 Transformation of red pepper cotyledons using *Agrobacterium* (LBA4404/pB1101 *cyc500-sym q*).

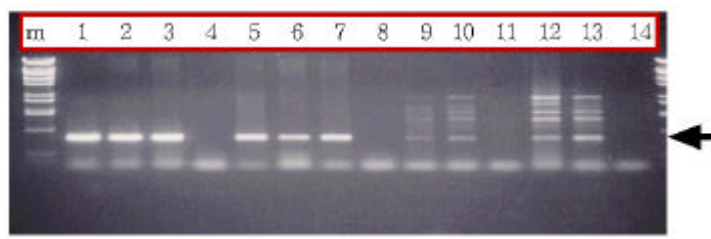


Fig. 5-3. PCR products of transgenic plants harboring *cyc500-sym q* gene). n, λ DNA (BstE II digested); Lanes 1, pB1121 vector with NPTII gene; Lane 2 ~ 3, transgenic tobacco; Lanes 4, intact red pepper; Lane 5 ~ 14, transgenic red pepper. PCR product of NPTII gene was indicated by arrow.

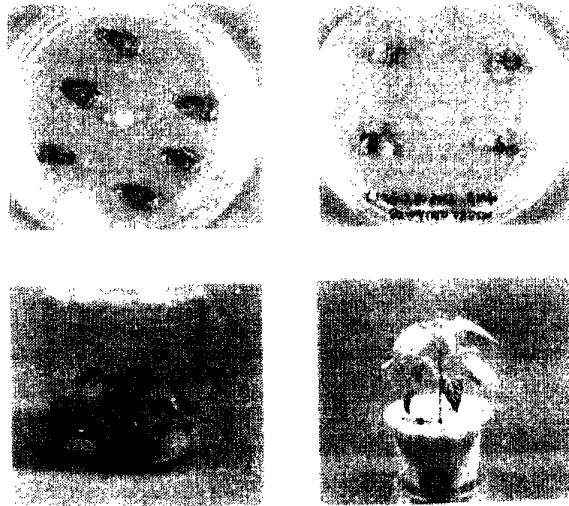


Fig. 5-2 Transformation of red pepper cotyledons using *Agrobacterium* (LBA4404/pBI101 *cyc600-syn a*).

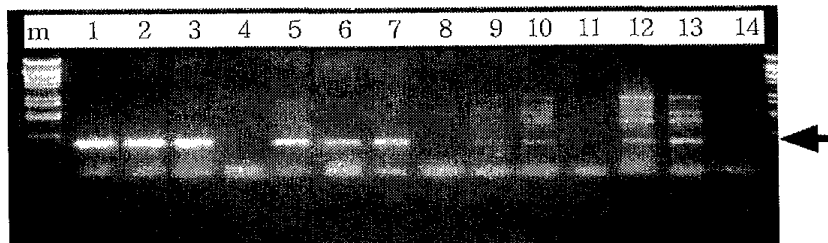


Fig. 5-3. PCR products of transgenic plants harboring *cyc600-syn a* gene). m, λ DNA (BstE II digested); Lanes 1, pBI121 vector with NPTII gene; Lane 2 ~ 3, transgenic tobacco; Lanes 4, intact red pepper; Lane 5 ~ 14, transgenic red pepper. PCR product of NPTII gene was indicated by arrow.

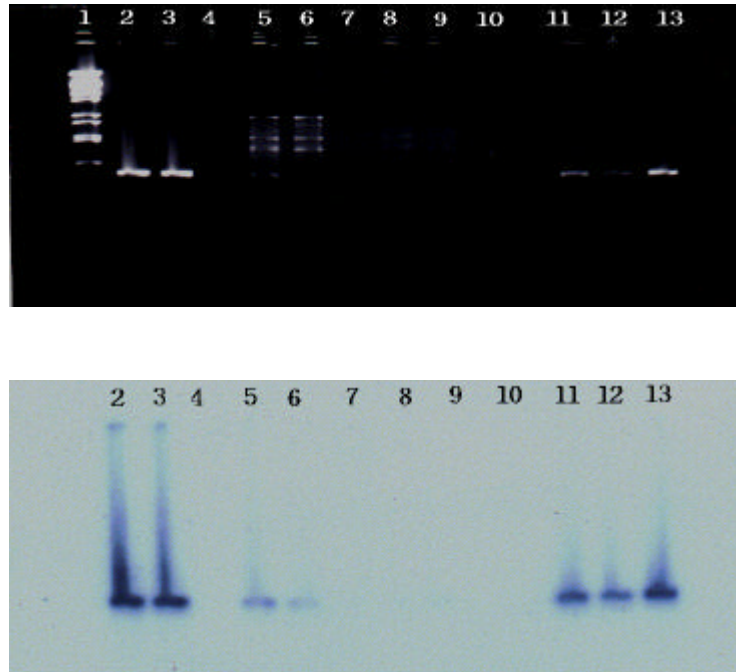


Fig 5-4. PCR Southern blot analysis of transgenic plants of red pepper. Top : Detection of NPTII gene from transgenic plants by genomic PCR. Lane 1, size marker; Lane 2, positive control as the pBI121 binary vector; Lane 3, positive control as the transgenic tobacco plant; Lane 4, negative control as the untransgenic plant; Lane 5 ~ 13, transgenic plant. Bottom : PCR Southern blot analysis of transgenic plants.

3. 병저항성 형질발현 및 증종의 특성조사

Elicitin gene를 이용한 역병 저항성 형질전환체 수미초 T₀ 세대의 생육은 초장 14.5 ~ 28.5 cm, 초폭 27.8 ~ 40.2 cm, 주경장 3.5~5.0 cm, 경경 4.7 ~ 7.6 mm이었다 (표 5-11). 과육성은 과장

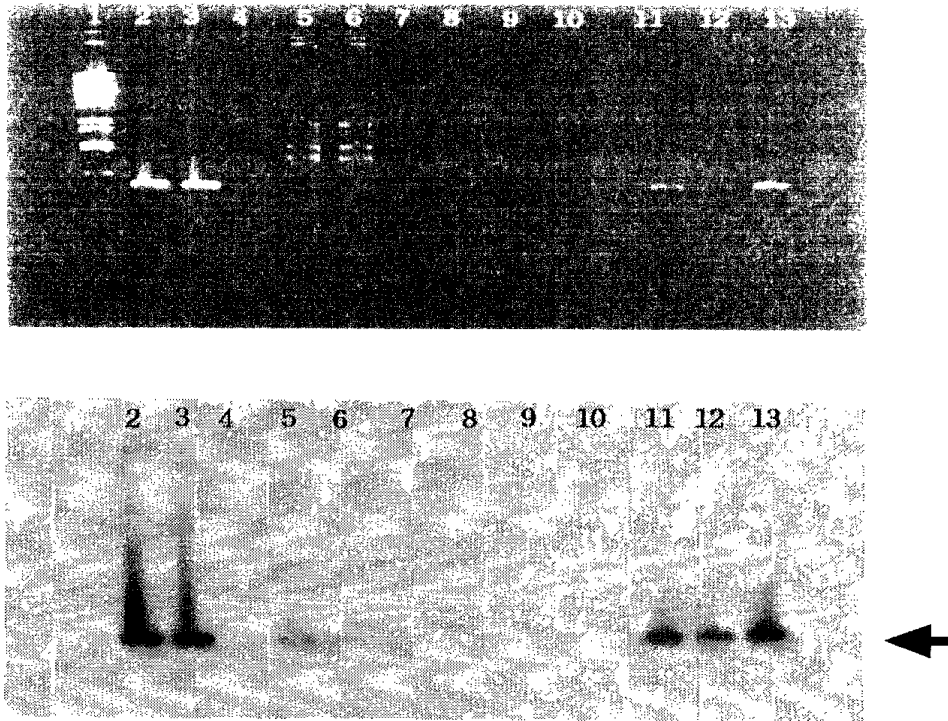


Fig 5-4. PCR Southern blot analysis of transgenic plants of red pepper. **Top** : Detection of NPTII gene from transgenic plants by genomic PCR. Lane 1, size marker; Lane 2, positive control as the pBI121 binary vector; Lane 3, positive control as the transgenic tobacco plant; Lane 4, negative control as the untransgenic plant; Lane 5 ~ 13, transgenic plant. **Bottom** : PCR Southern blot analysis of transgenic plants.

3. 병저항성 형질발현 및 품종의 특성조사

Elicitin gene을 이용한 역병 저항성 형질전환체 수비초 T₀ 세대의 생육은 초장 14.5 ~ 28.5 cm, 초폭 27.8 ~ 40.2 cm, 주경장 3.5~5.0 cm, 경경 4.7 ~ 7.6 mm이었다 (표 5-11). 과특성은 과장

6.2~8.5 cm, 과경 11.3 ~ 13.8 mm, 1과중 4.0 ~ 7.2 g이었다 (표 5-12). 생육 및 과실특성은 계통간에 다소 차이는 있었지만 모든 계통의 생육은 저조했다. 이는 기내 배양시 호르몬, 항생제의 영향과 재분화된 형질전환체를 기외로 이식하기 위한 순화과정에 기인한 것으로 생각된다. 과실모양은 과타이 컵형으로 수비초 고유의 특성과 유사하였다 (그림 5-5). 이들 T₀ 식물체는 개화 및 수정 등의 임성은 정상적이었고 유산지를 이용하여 자식으로 후대를 채종하였다.

Table 5-11. Growth characteristics of transgenic red pepper of Subicho (T₀).

Line	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)
S1	14.5	27.8	5.0	4.7
S2	20.0	35.0	4.5	5.6
S3	27.5	40.2	4.5	7.6
S4	24.5	35.0	4.5	6.0
S5	28.5	32.0	3.5	5.5

Table 5-12. Characterization of fruit in red pepper transformant of Subicho (T₀).

Line	Fruit receptacle	Fruit length (cm)	Fruit diameter (mm)	Fruit thickness (mm)	Fruit weight (g)
S1	Cup type	8.5	13.8	1.91	7.2
S2	Cup type	6.8	12.8	1.47	4.0
S3	Cup type	6.2	11.3	1.19	3.8
S4	Cup type	6.6	12.2	1.53	4.3
S5	Cup type	7.7	12.4	1.96	7.0

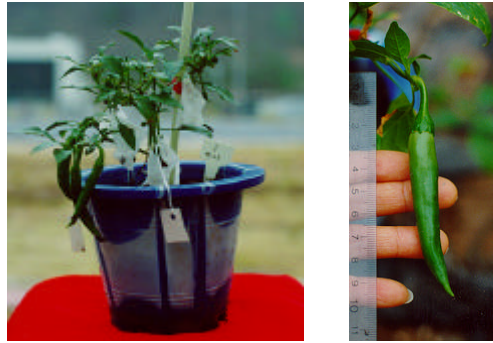


Fig. 5-5. Growth of transgenic red pepper (T_0) and its fruit.

채종된 T_1 종자는 상도도 증진된 묘상에 6월 22일 파종하였다. S2 계통이 전혀 발아하지 않았고, S1 등 4계통은 7월 5일 직경 12 cm 비닐 포트에 이식하여 하우스에서 육묘하였다 (그림 5-6). S2 계통은 계속 자식을 통한 채종으로 재파종을 하여 후대를 전개하였으나 시기상 포장에서의 원예적 특성은 볼 수 없었다. T_1 식물체의 묘생육은 업수 15.2 ~ 18.8개, 초장 32.7 ~ 34.0 cm, 주경장 26.5 ~ 28.5 cm, 견경 3.7 ~ 4.1 cm도 계통간에 다소 차이는 있지만, 묘의 생육은 정상적이었다 (표 5-13).

T_0 식물체에서 채종한 T_1 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. T_1 식물체에서는 Lanes 2 ~ 6의 S1 ~ S5 계통 모두에서 elicitor 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T_1 식물체인 Lanes 7 ~ 17에서는 Lane 7의 S1-1 등 7계통에서 elicitor 밴드가 나타났으며, Lane 8의 S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체의 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다 (그림 5-7).

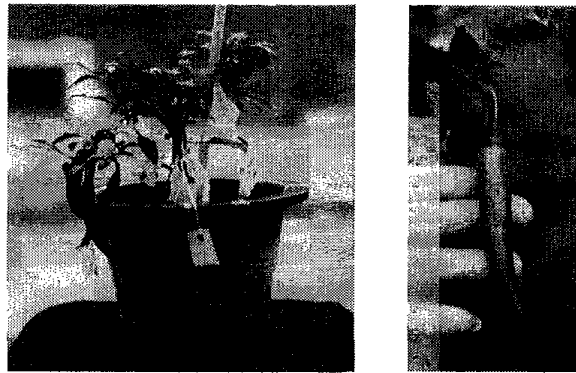


Fig. 5-5. Growth of transgenic red pepper (T_0) and its fruit.

채종된 T_1 종자는 상토로 증진된 묘상에 6월 22일 파종하였다. S2 계통이 전혀 발아하지 않았고, S1 등 4계통은 7월 6일 직경 12 cm 비닐 포트에 이식하여 하우스에서 육묘하였다 (그림 5-6). S2 계통은 계속 자식을 통한 채종으로 재파종을 하여 후대를 전개하였으나 시기상 포장에서의 원예적 특성은 볼 수 없었다. T_1 식물체의 묘생육은 엽수 15.2 ~ 18.8개, 초장 32.7 ~ 34.0 cm, 주경장 26.5 ~ 29.5 cm, 경경 3.7 ~ 4.1 cm로 계통간에 다소 차이는 있지만, 묘의 생육은 정상적이었다 (표 5-13).

T_0 식물체에서 채종한 T_1 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. T_1 식물체에서는 Lanes 2 ~ 6의 S1 ~ S5 계통 모두에서 elicitin 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T_1 식물체인 Lanes 7 ~ 17에서는 Lane 7의 S1-1 등 7계통에서 elicitin 밴드가 나타났으며, Lane 8의 S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체의 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다 (그림 5-7).



Fig. 5-6. The growth of transgenic pepper of T₁ generation in the green house.

Table 5-13. Growth characteristics of transgenic red pepper (Subicho) in T₁ seedling stage.

Line	No. of leaf	Plant height (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)
S1-M	18.8	33.7	28.0	3.8
S3-M	15.2	32.8	28.3	4.1
S4-M	17.0	34.0	26.5	3.8
S5-M	17.2	32.7	28.5	3.7

Syn *a* primer에 의해 증폭된 DNA의 크기는 syn *a*와 동일하였으나, 실제 syn *a*와 같은 유전자인지를 확인하기 위하여 syn *a* gene을 이용하여 Southern blot analysis를 하였다. 그 결과 300 bp 정도의



Fig. 5-6. The growth of transgenic pepper of T₁ generation in the green house.

Table 5-13. Growth characteristics of transgenic red pepper (Subicho) in T₁ seedling stage.

Line	No. of leaf	Plant height (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)
S1-M	18.8	33.7	28.0	3.8
S3-M	15.2	32.8	29.3	4.1
S4-M	17.0	34.0	26.5	3.9
S5-M	17.2	32.7	29.5	3.7

Syn a primer에 의해 증폭된 DNA의 크기는 *syn a*와 동일하였으나, 실제 *syn a*와 같은 유전자인지를 확인하기 위하여 *syn a* gene을 이용하여 Southern blot analysis를 하였다. 그 결과 300 bp 정도의

band를 확인할 수 있었다 (그림 5-8). 위의 결과에서 *cyc500 promoter + synQ*의 construct가 수비초의 genomic DNA에 삽입되었으며, 실제도 후대에 유전될 수 있는 것으로 사료된다.

T₁ 식물체의 묘생육은 PCR 밴드가 확인된 S1-1 등 7계통은 업수 13 ~ 20개, 초장 28.5 ~ 36.5 cm, 주경장 25.8 ~ 30.5 cm, 경경 3.3~4.0 mm이었고, PCR 밴드가 없는 S2 등 4계통은 업수 12 ~ 20개, 초장 28.5 ~ 38.5 cm, 주경장 26.0 ~ 31.0 cm, 경경 3.3 ~ 3.7 mm도 다소 차이는 있지만 생육은 정상적이었고 기형주는 없었다 (표 5-14). 또한 PCR 밴드의 유무에 따른 생육상의 차이는 관찰되지 않았고 (그림 5-9), 개화과 임성은 정상이었다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

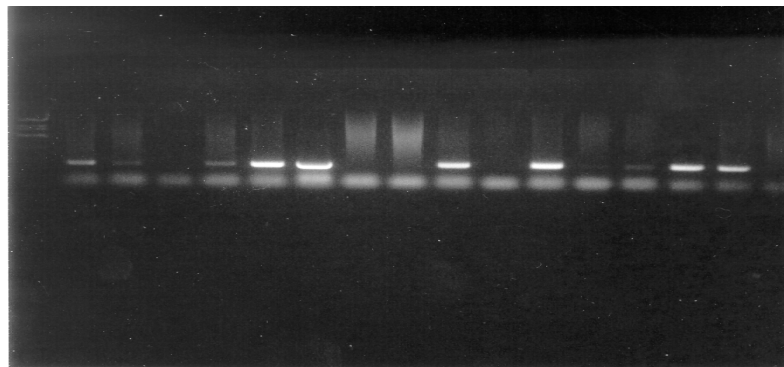


Fig. 5-7. PCR products from T₁ plants of transgenic red pepper. Lane 1; λ BstE11 digested size marker, Lane 2; S1, Lane 3; S3, Lane 5; S5, Lane 6; S4, Lane 7; S1-1, Lane 8; S1-2, Lane 9; S1-4, Lane 10; S3-6, Lane 11; S3-7, Lane 12; S3-8, Lane 13; S3-8, Lane 14; S4-13, Lane 15; S1-5, Lane 16; S3-10, Lane 17; S3-11

band를 확인할 수 있었다 (그림 5-8). 위의 결과에서 *cyc600* promoter + *syn α* 의 construct가 수비초의 genomic DNA에 삽입되었으며, 실제로 후대에 유전될 수 있는 것으로 사료된다.

T₁ 식물체의 묘생육은 PCR 밴드가 확인된 S1-1 등 7계통은 엽수 13 ~ 20개, 초장 29.5 ~ 36.5 cm, 주경장 25.8 ~ 30.5 cm, 경경 3.3~4.0 mm이었고, PCR 밴드가 없는 S2 등 4계통은 엽수 12 ~ 20개, 초장 28.5 ~ 38.5 cm, 주경장 26.0 ~ 31.0 cm, 경경 3.3 ~ 3.7 mm로 다소 차이는 있지만 생육은 정상적이었고 기형주는 없었다 (표 5-14). 또한 PCR 밴드의 유무에 따른 생육상의 차이는 관찰되지 않았고 (그림 5-9), 개화와 임성은 정상이었다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

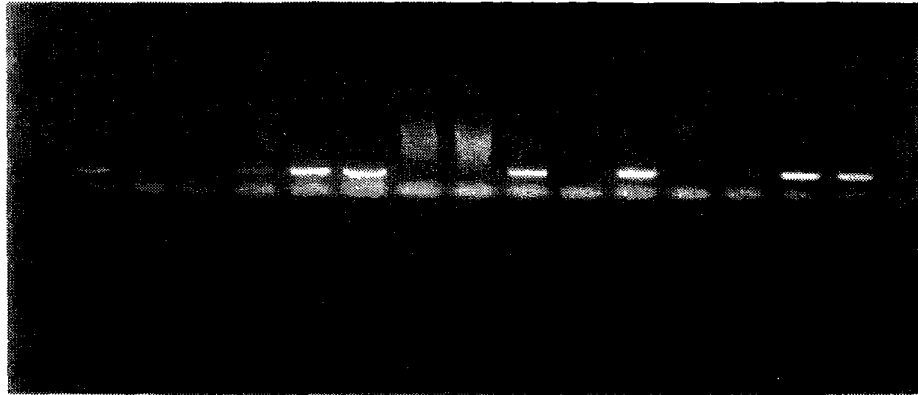


Fig. 5-7. PCR products from T₁ plants of transgenic red pepper. Lane 1: λ BstEII digested size marker, Lane 2: S1, Lane 3: S3, Lane 5: S5, Lane 6: S4, Lane 7: S1-1, Lane 8: S1-2, Lane 9: S1-4, Lane 10: S3-6, Lane 11: S3-7, Lane 12: S3-8, Lane 13: S3-9, Lane 14: S4-13, Lane 15: S1-5, Lane 16: S3-10, Lane 17: S3-11



Fig. 5-8. Southern analysis of T₀ and T₁ plants transformed with *cyc500* + *syn2* construct. Lane 1: λ BstE11 size marker, lane2: S1, lane3: S1-1, lane4: S1-5, lane5: S3, lane6: S3-6, lane7: S3-8, lane8: S3-10.

Table 5-14. Growth characteristics of transgenic red pepper (T₁) having elicitor gene screened by PCR.

Line	No. of leaf (ea)	Plant height (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	PCR band
S1- 1	18	30.5	26.5	3.3	+
S1- 5	17	32.5	28.5	3.8	+
S3- 6	13	28.5	26.7	3.2	+
S3- 8	16	30.5	26.5	3.6	+
S3- 8	16	31.8	30.5	3.7	+
S3-10	15	30.5	28.2	3.6	+
S4-13	20	36.5	25.8	4.0	+
Average	16	31.7	27.5	3.6	
S1- 2	15	31.0	26.0	3.3	-
S1- 4	18	35.5	30.0	3.7	-
S3- 7	12	28.5	27.0	3.4	-
S3-11	20	38.5	31.0	3.5	-
Average	16	33.4	28.5	3.5	

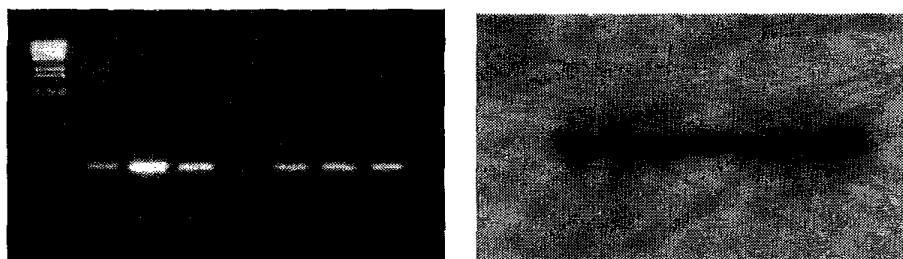


Fig. 5-8. Southern analysis of T₀ and T₁ plants transformed with *cyc600* + *syn α* construct. Lane 1: λ BstEII size marker, lane2: S1, lane3: S1-1, lane4: S1-5, lane5: S3, lane6: S3-6, lane7: S3-8, lane8: S3-10.

Table 5-14. Growth characteristics of transgenic red pepper (T₁) having elicitin gene screened by PCR.

Line	No. of leaf (ea)	Plant height (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	PCR band
S1- 1	18	30.5	26.5	3.3	+
S1- 5	17	32.5	28.5	3.8	+
S3- 6	13	29.5	26.7	3.2	+
S3- 8	16	30.5	26.5	3.6	+
S3- 9	16	31.8	30.5	3.7	+
S3-10	15	30.5	28.2	3.6	+
S4-13	20	36.5	25.8	4.0	+
Average	16	31.7	27.5	3.6	
S1- 2	15	31.0	26.0	3.3	-
S1- 4	18	35.5	30.0	3.7	-
S3- 7	12	28.5	27.0	3.4	-
S3-11	20	38.5	31.0	3.5	-
Average	16	33.4	28.5	3.5	



T₁ generation Non-transformant

Fig. 5-B. Growth of transgenic red pepper (T₁) in seedling stage.

4. 고추 억병저항성 식물체의 병검정과 포장시험

고추형질전환체 T₁ 및 T₂ 세대의 유묘에 억병진종시 병 발생율은 표 15와 같다. 억병균을 유주포자 농도별로 접종한 결과 대비종인 수미초와 금답은 접종 5일 후 각각 80 ~ 100%, 20 ~ 80% 발병하였고, 접종 12일 후에는 유주포자 10⁸ 개/ml에서 억병 발생이 100%였다. 형질전환체는 유주포자 10⁵ 개/ml에서 접종 5일 후 억병발병율은 0101계통 56.0%, 0107계통 86.0%로도 계통간에 차이가 있었지만, 접종 12일 후에는 모든 계통에서 고사하였다. 유주포자 10⁴ 개/ml에서 접종 5일 후 103계통 19.2%, 0108계통 72.0%도 10⁵ 개/ml보다 발병율이 낮았지만, 접종 12일 후에는 86% 이상의 높은 발병율을 보였다 (표 5-15, 그림 5-10). 유주포자 10³ 개/ml에서 접종 5일 후 억병 발병율은 0101계통 4.0%, 0104 계통 16.0%였으며, 접종 12일 후에는 0108 계통 40.0%, 0109 계통 80.0%도 대비종인 금답과 수미초 100%에 비해 발병율이 낮았다. 이상의 결과 억병 형질전환체의 유묘



T₁ generation Non-transformant

Fig. 5-9. Growth of transgenic red pepper (T₁) in seedling stage.

4. 고추 역병저항성 식물체의 병검정과 포장시험

고추형질전환체 T₁ 및 T₂ 세대의 유묘에 역병접종시 병 발생율은 표 15와 같다. 역병균을 유주포자 농도별로 접종한 결과 대비종인 수비초와 금탑은 접종 5일 후 각각 80 ~ 100%, 20 ~ 80% 발병하였고, 접종 12일 후에는 유주포자 10³ 개/ml에서 역병 발생이 100%였다. 형질전환체는 유주포자 10⁵ 개/ml에서 접종 5일 후 역병발병율은 0101계통 56.0%, 0107계통 96.0%으로 계통간에 차이가 있었지만, 접종 12일 후에는 모든 계통에서 고사하였다. 유주포자 10⁴ 개/ml에서 접종 5일 후 103계통 19.2%, 0108계통 72.0%로 10⁵ 개/ml보다 발병율이 낮았지만, 접종 12일 후에는 96% 이상의 높은 발병율을 보였다 (표 5-15, 그림 5-10). 유주포자 10³ 개/ml에서 접종 5일 후 역병 발병율은 0101계통 4.0%, 0104 계통 16.0%였으며, 접종 12일 후에는 0108 계통 40.0%, 0109 계통 80.0%로 대비종인 금탑과 수비초 100%에 비해 발병율이 낮았다. 이상의 결과 역병 형질전환체의 유묘

검정시 유주포자 10^5 개/ml에서는 시기별 발병정도는 차이가 있었지만 형질전환의 유무에 관계없이 모두 고사하였다. 유주포자 10^3 개/ml에서는 형질전환체의 저항성 계통선택이 가능하였다 (그림 5-11, -12).

Elicitin gene를 이용한 역병 저항성 형질전환체를 영양양고추 시험장의 역병 상습포장에서 재배하였다 (그림 5-13). 수비초의 생육은 초장 58.2 ~ 68.4 cm, 초폭 53.4 ~ 68.0 cm, 주경장 12.5 ~ 23.2 cm, 경경 10.4 ~ 18.5 mm도 계통간에 다소 차이는 있었다 (표 5-16). 1화방의 꽃이 80% 개화까지의 일수인 개화소요일수는 0105 계통이 81일도 가장 많았고, 0107 계통이 117일정도 늦었다. 측지수는 8.0 ~ 8.3개도 많았다. 과득성은 (표 5-17) 과장 7.4 ~ 11.6 cm, 과경 13.1 ~ 15.7 mm, 과육두께가 1.50 ~ 2.05 mm 없으며, 1건과중은 1.1 ~ 1.8 g정도 계통간에 차이가 있었다. 과닥형은 모두 전형이었다. 측지수가 많고, 과닥이 전형인 것과 과심포양 등이 수비초와 매우 유사하였다(그림 5-14). 포장에서의 역병의 발생은 (표 5-18, 그림 5-15) 계통간에 차이가 많았으며, 계통 0101, 0102, 0106, 0108는 시잔종이 금담에 비해 약 30% 정도 적었다.



Fig. 5-10. Root rot of red pepper transformant inoculated with *Phytophthora capsici* in seedling stage.

검정시 유주포자 10^9 개/ml에서는 시기별 발병정도는 차이가 있었지만 형질전환의 유무에 관계없이 모두 고사하였다. 유주포자 10^3 개/ml에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다 (그림 5-11, -12).

Elicitin gene을 이용한 역병 저항성 형질전환체를 영영양고추시 험장의 역병 상습포장에서 재배하였다 (그림 5-13). 수비초의 생육은 초장 58.2 ~ 68.4 cm, 초폭 53.4 ~ 68.0 cm, 주경장 12.6 ~ 23.2 cm, 경경 10.4 ~ 18.5 mm로 계통간에 다소 차이는 있었다 (표 5-16). 1화방의 꽃이 80% 개화까지의 일수인 개화소요일수는 0105 계통이 91일로 가장 빨랐고, 0107 계통이 117일로 늦었다. 측지수는 8.0 ~ 9.3개로 많았다. 과특성은 (표 5-17) 과장 7.4 ~ 11.6 cm, 과경 13.1 ~ 16.7 mm, 과육두께가 1.60 ~ 2.05 mm 였으며, 1건과중은 1.1 ~ 1.9 g으로 계통간에 차이가 이었다. 과타형은 모두 컵형이었다. 측지수가 많고, 과타이 컵형인 것과 과실모양 등이 수비초와 매우 유사하였다(그림 5-14). 포장에서의 역병의 발생은 (표 5-18, 그림 5-15) 계통간에 차이가 많았으며, 계통 0101, 0102, 0106, 0109는 시판종이 금탑에 비해 약 30% 정도 적었다.



Fig. 5-10. Root rot of red pepper transformant inoculated with *Phytophthora capsici* in seedling stage.

Table 5-15. Root rot of red pepper transformant inoculated with *Phytophthora capsici* in seedling stage.

Line	5days after inoculation				12days after inoculation			
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	Mean	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	Mean
0101	56.0	40.0	4.0	33.3	100	100	52.0	82.7
0102	68.8	70.0	10.0	49.6	100	100	64.0	88.0
0103	67.5	19.2	12.0	32.9	100	100	68.0	89.3
0104	72.0	56.7	16.0	48.2	100	100	78.0	82.6
0105	64.0	63.2	5.3	32.0	100	100	57.9	86.0
0106	88.0	80.0	12.0	54.4	100	100	63.0	87.7
0107	86.0	48.0	12.0	62.7	100	86.0	56.0	84.0
0108	60.0	72.0	8.0	38.7	100	100	40.0	80.0
0109	82.0	40.0	8.0	57.3	100	100	80.0	83.3
Subicho	100	80.0	80.0	86.7	100	100	100	100
Kuntap	80.0	60.0	20.0	46.7	100	100	100	100

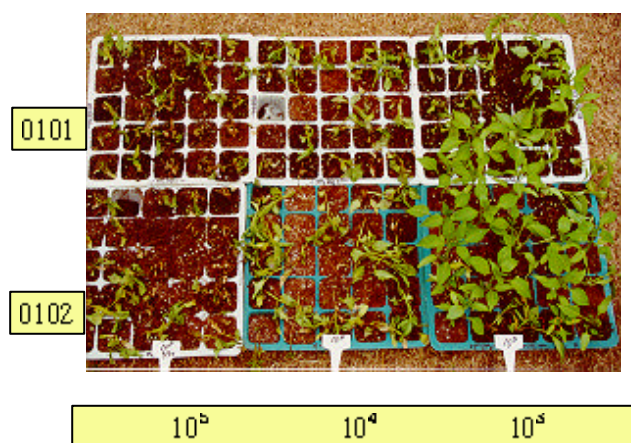


Fig. 5-11. Root rot of red pepper transformant after inoculation with *Phytophthora capsici* zoospores at different concentrations.

Table 5-15. Root rot of red pepper transformant inoculated with *Phytophthora capsici* in seedling stage.

Line	5days after inoculation				12days after inoculation			
	10 ⁹	10 ⁴	10 ³	Mean	10 ⁹	10 ⁴	10 ³	Mean
0101	56.0	40.0	4.0	33.3	100	100	52.0	82.7
0102	68.9	70.0	10.0	49.6	100	100	64.0	88.0
0103	67.5	19.2	12.0	32.9	100	100	68.0	89.3
0104	72.0	56.7	16.0	48.2	100	100	78.0	92.6
0105	64.0	63.2	5.3	32.0	100	100	57.9	86.0
0106	88.0	80.0	12.0	54.4	100	100	63.0	87.7
0107	96.0	48.0	12.0	62.7	100	96.0	56.0	84.0
0108	60.0	72.0	8.0	38.7	100	100	40.0	80.0
0109	92.0	40.0	8.0	57.3	100	100	80.0	93.3
Subicho	100	80.0	80.0	86.7	100	100	100	100
Kumtap	80.0	60.0	20.0	46.7	100	100	100	100

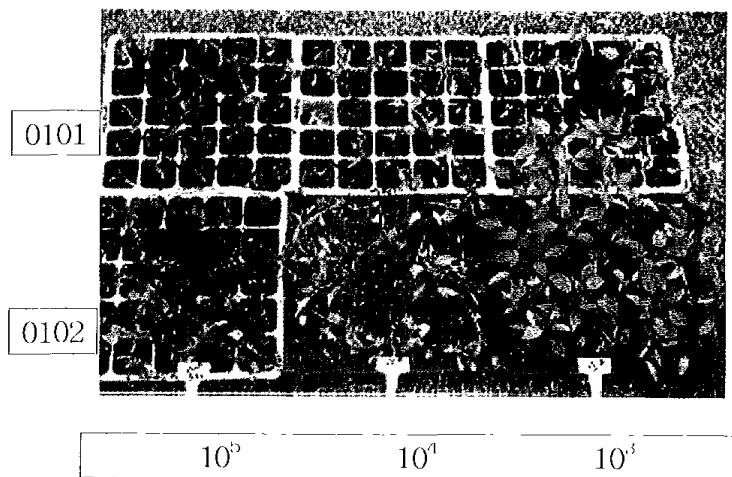


Fig. 5-11. Root rot of red pepper transformant after inoculation with *Phytophthora capsici* zoo-spores at different concentrations.

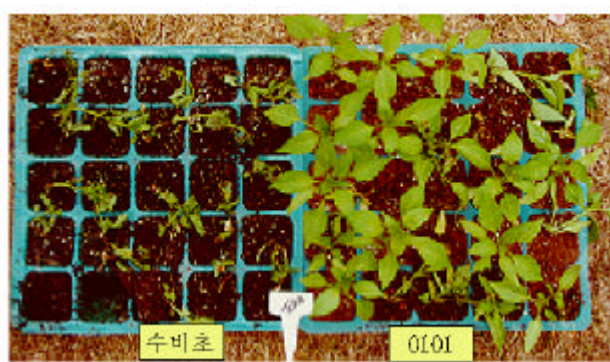


Fig. 5-12. Root rot of red pepper after inoculation with *Phytophthora capsici* (10^8 zoospores/mL).

Table 5-16. Growth characteristics of transgenic red pepper (T_1 and T_2) in field.

Line	Days to flower	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	No. of lateral branch (ea)
0101	98	58.2	68.0	12.6	13.6	8.8
0102	98	58.2	53.7	14.2	10.4	9.2
0103	117	64.9	60.6	19.5	13.5	8.9
0104	104	60.3	54.5	15.3	12.1	9.3
0105	91	60.4	53.4	16.5	18.5	9.0
0106	106	64.6	62.0	18.2	11.5	8.8
0107	119	68.4	66.0	23.2	12.6	8.0
0108	106	63.6	60.0	15.5	11.4	8.8
0109	108	68.4	63.0	15.0	11.4	8.6

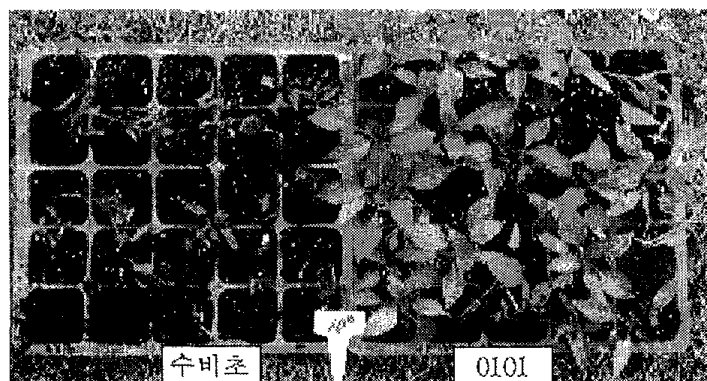


Fig. 5-12. Root rot of red pepper after inoculation with *Phytophthora capsici* (10^3 zoo-spores/mL).

Table 5-16. Growth characteristics of transgenic red pepper (T_1 and T_2) in field.

Line	Days to flower	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	No. of lateral branch (ea)
0101	98	58.2	68.0	12.6	13.6	8.8
0102	98	58.2	53.7	14.2	10.4	9.2
0103	117	64.9	60.6	19.5	13.5	8.9
0104	104	60.3	54.5	15.3	12.1	9.3
0105	91	60.4	53.4	16.5	18.5	9.0
0106	106	64.6	62.0	18.2	11.5	8.8
0107	119	68.4	66.0	23.2	12.6	8.0
0108	106	63.6	60.0	15.5	11.4	8.8
0109	108	68.4	63.0	15.0	11.4	8.6

Table 5-17. Characterization of fruit in red pepper transformant grown in field.

Line	Fruit receptacle	Fruit length (cm)	Fruit diameter (mm)	Fruit thickness (mm)	Fruit dry weight (g/ea)
0101	Cup type	9.6	16.6	1.87	1.4
0102	Cup type	10.4	16.7	1.80	1.5
0103	Cup type	8.2	16.1	1.60	1.2
0104	Cup type	7.7	13.1	1.60	1.1
0105	Cup type	11.6	15.9	1.91	1.9
0106	Cup type	10.4	16.3	2.02	1.7
0107	Cup type	7.4	13.4	1.83	1.6
0108	Cup type	9.8	14.6	1.92	1.3
0109	Cup type	10.0	16.2	2.05	1.4

Table 5-18. Root rot of transgenic red pepper in field.

Line	Root rot(%)			Generation
	July 5	Aug. 3	Sep. 20	
0101	4.2	50.0	66.7	T ₁
0102	8.3	35.4	54.2	T ₁
0103	8.3	87.5	95.8	T ₁
0104	8.3	70.8	95.8	T ₁
0105	0.0	58.3	91.7	T ₁
0106	14.6	45.8	68.8	T ₂
0107	8.3	70.8	91.7	T ₂
0108	11.9	71.4	88.1	T ₂
0109	8.3	52.1	68.8	T ₂
Kumtap	16.7	79.2	95.8	-



Fig. 5-13. Field infestation with *Phytophthora* blight in red pepper



0101



01102



0106



0108

Fig. 5-14. Growth and fruit characteristics of selection lines for *Phytophthora* blight in field.

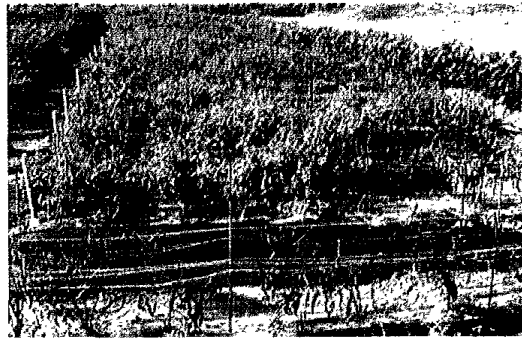


Fig. 5-13. Field infestation with *Phytophthora* blight in red pepper



0101



01102



0106



0109

Fig. 5-14. Growth and fruit characteristics of selection lines for *Phytophthora* blight in field.



Fig. 5-15. Root rot of transgenic red pepper line 0101 and Kuntap in field.

제 4 절 적 요

재래종 고추인 수미초와 칩성초의 자엽을 이용한 식물체 재분화 조건을 구명하고 형질전환을 통하여 고추 역병 저항성 품종 육성을 위해 특이성 promoter와 elicitor gene을 fusion 시켜 고추에 도입 하는 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

고추 자엽으로부터 shoot 분화율은 zeatin 2 ~ 4 mg/L에서 NAA 0.05 mg/L 혼용에서 분화율이 높았고, root 분화율은 NAA 0.5 mg/L 에서 높았다.

고추 형질전환은 고추 자엽에 *Agrobacterium* (LBA4404/pB1101 cyc600- syn α)을 이용한 cyc600 promoter + Elicitor 유전자의 형질전환시 shoot의 형성율은 수미초의 경우 Zeatin 3 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 11.1%, Zeatin 4 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 12.8%를 보였다. 그리고 *Agrobacterium* 공동배양 기간 은 전배양 3일, 공동배양 3 ~ 4일에서 재분화율이 높았다. 자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 MPT11 유전자 primer를 이용한 PCR



Fig. 5-15. Root rot of transgenic red pepper line 0101 and Kumtap in field.

제 4 절 적 요

재래종 고추인 수비초와 칠성초의 자엽을 이용한 식물체 재분화 조건을 구명하고 형질전환을 통하여 고추 역병 저항성 품종 육성을 위해 특이성 promoter와 elicitin gene을 fusion 시켜 고추에 도입하는 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

고추 자엽으로부터 shoot 분화율은 zeatin 2 ~ 4 mg/L에서 NAA 0.05 mg/L 혼용에서 분화율이 높았고, root 분화율은 NAA 0.5 mg/L에서 높았다.

고추 형질전환은 고추 자엽에 *Agrobacterium* (LBA4404/pB1101 cyc600- syn α)을 이용한 cyc600 promoter + Elicitin 유전자의 형질전환시 shoot의 형성율은 수비초의 경우 Zeatin 3 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 11.1%, Zeatin 4 mg/l + NAA 0.05 mg/l 함유 배지에서 12.8%를 보였다. 그리고 *Agrobacterium* 공동배양 기간은 전배양 3일, 공동배양 3 ~ 4일에서 재분화율이 높았다. 자엽으로부터 재분화된 형질전환체의 NPTII 유전자 primer를 이용한 PCR

분석에서 형질전환된 재분화 식물체는 536 bp의 밴드를 보여 형질전환체임을 확인하였다. 이들을 *membrane*에 *transfer*하여 *NPTII gene*을 *probe*로 사용하여 *Southern blot* 분석한 결과, 고추형질전환 식물체는 536 bp 부위에 강한 *signal*을 보였다.

*Elicitin gene*을 이용한 역병 저항성 형질전환체 수비초 T_0 세대의 생육은 계통간에 다소 차이는 보였고, 모든 계통의 생육은 저조한 반면 개화 및 수정 등의 임성은 정상적이었다. 자식을 통해 채종한 T_1 식물체의 유전자 도입을 확인하기 위하여 *elicitin primer*를 이용하여 *PCR*을 수행한 결과, T_0 식물체 S1 ~ S5 계통에서 *elicitin* 밴드가 나타나 형질전환체임을 확인하였고, T_1 식물체인 S1-1 등 7 계통에서 *elicitin* 밴드가 나타났고, S1-2 등 4계통에서는 밴드가 나타나지 않아 형질전환체가 후대에서 분리가 일어남을 확인할 수 있었다. *Syn α clone*을 이용하여 *Southern blot analysis*를 한 결과 *band*가 나타난 300 bp 위치에서 강한 *signal*을 관찰할 수 있었다. 위의 결과에서 *cyc600 promoter + syn α* 의 *construct*가 수비초의 *genomic DNA*에 삽입되었으며, 실제로 후대에 유전될 수 있는 것으로 사료된다.

고추형질전환체 T_1 및 T_2 세대의 유묘에 역병균을 접종한 결과 유주포자 10^3 개/ml에서 접종 5일 후 역병 발병율은 0101계통 4.0%, 0104계통 16.0%였으며, 접종 12일 후는 0108계통 40.0%, 0109계통 80.0%로 대비종인 금탑과 수비초 100%에 비해 발병율이 떨어져 유주포자 10^3 개/ml에서는 형질전환체의 저항성 계통선발이 가능하였다. 획득된 역병 저항성 형질전환체를 영양고추시험장의 역병 상습포장에서 재배한 결과 생육, 개화소요일수, 과특성 등은 계통간에 다소 차이가 있었으나, 과실모양은 수비초와 매우 유사하였다. 포장에서

의 역병의 발생은 계통간에 차이가 많았으며, 계통 0101, 0102, 0106, 0109는 시판종인 금탑에 비해 약 30%정도 적었다. 포장에서 선발된 형질전환체는 세대의 진전을 통해 저항성의 고정이 필요한 것으로 판단된다.

제 5 절 참고문헌

- An G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153:292-305.
- Alcantara T. and Bosland P. 1994. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. *HortScience* 29(10): 1182-1183.
- Arroyo R. and Revilla M. 1991. In vitro plant regeneration from cotyledone and hypocotyl segment in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Report* 10: 414-416.
- Barksdale T., Papavizas G. and Johnston S. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 68(6): 506-509.
- Diaz I., Moreno R. and Power J. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annum*. *Plant Cell Report* 7: 210-212
- Fari M. and Czako M. 1981. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explant cultured *in vitro*. *Scientia Horticulture* 15: 207-213
- Gil R., Palazon C. and Cuartero Z. 1990. Genetics of resistance

- to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper 'Line 29'.
Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin 20: 117-122.
- Gil Ortega R., Palazon Espanol C. and Cuartero Z. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breeding 107: 50-55.
- Harrison B. and Mary D. 1987. Virus restance in transgenic plant that express cucumber mosaic satellite RNA. Nature 328: 799-802.
- 홍순성. 1990. 고추역병균 길항균 *Pseudomons cepacia*의 입제제형 및 활성. 한국식물병리학회지 6(4): 434-439.
- Horsch R., Fry J., Hoffmann N., Wallroth M., Eichholt D., Rogers S. and Fraley R. 1985. A simple and general method from transferring genes into plants. Science 227:1229-1231.
- Kimble K. and Grogan R. 1960. Resistance to pytophthora root rot in pepper. Plant Dis. Rep. 44(11): 872-873.
- 김충희, 김병수, 김승철. 1979. 고추역병에 대한 저항성 검정과 방제에 관한 시험. 농기연시험연구보고서. pp. 291-240.
- 경북농촌진흥원. 1997. 경북의 농업주요지표 pp. 2-3.
- Lee S., Kim B. and Pack K. 1993. In vitro plant regeneration *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledone explants of hot pepper. Korean J Plant Tissue Culture 20: 289-294.
- Leonian L. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. Phytophthology 12: 401-408.
- 농촌진흥청. 1995. 농작물 병해충 발생예찰 요강 p 7.

- 박경석, 장성완, 김충희, 이은종. 1989. 고추역병에 대한 생물학적 방제 연구 III. *Phytophthora capsici*의 길항균 *Trichoderma harzianum*과 *Pseudomonas cepacia* 제형 lac 보존. 한국식물병리학회지 5(2):131-138.
- Phillips G. and Hubstenberger J. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 4: 261-269.
- Powell-Abel P., Nelson R., Hoffman B., Rogers S., Fraley R. and Beschy R. 1986. Delay of Disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 758-743.
- Shah D., Horsh R., Kiee K., Kishore G., Winter J., Tumer N., Hiromaka P., Gusser C., Aykent S., Siegal N., Roger S. and Franley R. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plant. *Science* 233: 478-481.
- Smith P., Kimble K., Grogan R. and Millett A. 1967. Inheritance of resistance in pepper to *phytophthora* root rot. *Phytophthology* 57:377-379.