

옥수수의 노균병 저항성 증대를 위한 저항성 유용유전자 발굴

민경도, 김효철¹, 김경희¹, 문준철², 이병무¹, 김재윤*

공주대학교 식물자원학과, ¹동국대학교 생명과학과, ²강원대학교 농업생명과학연구원

Identification of novel genes for improvement of downy mildew resistance in *Zea mays*

Kyeong Do Min, Hyo Chul Kim¹, Kyung-Hee Kim¹, Jun-Cheol Moon², Byung-Moo Lee¹ and JaeYoon Kim*

Department of Plant Resources, College of Industrial Science, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea

¹Department of Life Science, Dongguk University-Seoul, Seoul 04620, Republic of Korea

²Agriculture and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

*Corresponding author

JaeYoon Kim

Tel. 041-330-1203

E-mail. jaeyoonkim@kongju.ac.kr

Received: 15 October 2019

Revised: 17 October 2019

Revision accepted: 21 October 2019

Abstract: Maize (*Zea mays* L.) is a C4-plant and one of the three major crops grown worldwide. Because of its high productivity, maize is considered as one of the most important food and feed stocks in the world. Recently, bioethanol from maize was predominantly generated in the USA and Brazil. Infection of maize by several diseases resulted in a huge disaster and prevented maize production. Downy mildew, caused by *Peronosclerospora sorghi*, is one of the most serious diseases of maize. Despite efforts to develop downy mildew-resistant cultivars or seed treatment with metalaxyl, downy mildew persists as a serious pathogen and is still prevalent in specific geographical locations. Analysis of soils infected with downy mildew and investigation of candidates associated with downy mildew resistance is an attractive method to overcome downy mildew damage in maize. In a previous study, we reported that maize chromosome 6 carries a possible candidate gene for downy mildew resistance. Using bioinformatics tools and RT-PCR analysis, five novel genes including bZIP, OFP transcription factor, and *Ppr* were identified as candidate genes associated with downy mildew resistance.

Keywords: *Zea mays*, downy mildew, disease resistance, candidate gene

서 론

옥수수는 광합성 능력이 높은 C4 작물이며 단위 면적당 생산량이 높고 재배가 용이하여 밀, 벼와 함께 인류가 섭취하는 세계 3대 중요 작물 중 하나이다(Varshney *et al.* 2012; Kim *et al.* 2016). 옥수수는 동물의 사료로 이용되기도 하며, 다양한 제품을 생산하는 원료로 사용된다(Kim *et al.* 2002).

또한, 옥수수는 풍부한 전분, 지방, 단백질과 식이섬유를 가지고 있으며 함유된 화학물질인 carotenoid, tocopherol, phytosterol, phenolic compound 등을 함유하고 있어서 조미료, 의약품, 시약, 화장품, 주류, 과자류 등 다양한 산업분야에 이용되고 있다(Kim *et al.* 2002; Kim *et al.* 2009). 특히 우리 나라에서는 수입한 옥수수의 대부분을 사료용으로 이용하기도 하였으나 점차 옥수수 전분을 활용하여 식용

으로도 사용하는 분야가 넓어지고 있다(Son *et al.* 2012). 바이오에탄올의 경우 미국, 브라질을 비롯한 많은 나라들이 개발하고 있는데 그중 미국에서는 바이오에탄올의 보급확대를 위해 원료인 옥수수 생산성 향상에 힘쓰고 효율적 생산기술 개발에 앞장서고 있다(Kim *et al.* 2010).

다양한 옥수수의 용도에도 불구하고 옥수수를 감염시켜 환경, 재배적 문제를 일으키는 노균병은 *Peronosclerospora*와 *Sclerospora* 종에 의해 주로 발병되며 습기가 많은 열대 지방에서 피해가 발생하며 특히, 아시아의 열대지방 국가에 많은 피해를 입힌다(Rashid *et al.* 2013). 노균병(downy mildew)은 순활물기생균이기 때문에 밭에서 나오는 과채류와 벼, 밀, 옥수수 등의 화본과 작물의 살아있는 조직에서 발견된다(Kim *et al.* 2016). 노균병은 공기전염성 곰팡이 유발 식물병으로써 식물체 표면에 수막이 형성될 경우에 포자들이 포자낭경 위에 발생하며, 감염된 잎의 기공을 통하여 하얀 곰팡이 병징을 나타내며 공기중으로 전파된다(Kim *et al.* 2016). 또한 노균병은 주로 밭아 후에 감염되며 묘목이 자라나는 단계부터 수확단계까지 어느 시기에 도 발병할 수 있다(Sireesha *et al.* 2016).

아시아에서 발병하는 주요 노균병 종류는 sorghum DM [*Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) C.G Shaw], Philippine DM [*Peronosclerospora philippinensis* (Weston) C.G Shaw], sugarcane DM [*Peronosclerospora sacchari* (T. Miyabe) Shirai and Hara], Java DM [*Peronosclerospora maydis* (Raciborski)] 및 brown stripe DM [*Sclerophthora rayssiae* var. *zeae* (payak and Renfro)] 등이 있다(Rashid *et al.* 2013). 옥수수에 노균병을 일으키는 SDM(sorghum DM)은 유묘기부터 영양생장 초기 사이에 발생하며, 이러한 노균병이 감염된 옥수수는 식물 성장 주기 전체에 영향을 미쳐 심한 경우 옥수수가 죽거나 생육 저하로 인해 생산량이 감소한다(Kim *et al.* 2016). SDM은 수수 및 옥수수에 많이 발생하며 토양에 기생하면서 난포자를 통해 발생하며 종자를 통해 식물로 전염될 수 있다(Broyles 1956; Rao *et al.* 1985; Kim *et al.* 2016).

전 세계적으로 열대 및 아열대 지역의 옥수수 등에서 노균병에 대한 경제적 손실이 보고되었으며, 이러한 지역의 비율은 30%를 차지하고 있으며(Jeffers *et al.* 2000), 아시아 지역에서는 수량손실이 50% 또는 그 이상으로 발생한다(Pingali 2001). 이러한 노균병의 전염으로 인해 토양이 오염되어 향후 화곡류 작물들이 연작되어 심겨진다면 후작 작물은 심각한 피해를 입게 될 것이며, 이를 방지하기 위하여 살균제 살포, 소각, 토양 정화 및 저항성 품종 선택 등을

이용하여 방제하고 있다(Kim *et al.* 2016). 그러나 살균제 살포와 같은 화학적 처리는 환경 생태계를 오염시킴으로써 환경에 위협을 줄 수 있고 종자소독으로는 자라나는 긴 생장기간 동안 병원체로부터 보호할 수 없다(Sireesha and Velazhahan 2016). 따라서 비병원성 미생물을 이용한 생물학적 제어방법으로 토양질병 관리에 관하여 안전하고 환경친화적인 지속 가능한 대안이 요구되어 왔다(Sireesha and Velazhahan 2016). 그렇기 때문에 화학적 살균이 아닌 노균병 저항성 품종과 관련 유전자의 발현을 통하여 노균병 방제 방법을 개발함으로써 환경 친화적 지속 가능한 방제법이 필요하다.

또한, 경제적 측면에서 살균제를 처리한 종자는 일반 농가에서 재정적 부담이 크고 병원체 내에서 화학적 내성이 증가하여 다른 문제가 발생할 가능성이 있으므로 환경적으로 안전하며 비용적인 측면에서도 효과적인 저항성 품종의 육성이 필요하다(Kim *et al.* 2016; Sireesha and Velazhahan 2016). 국내에서도 친환경 재배를 위한 연구를 진행하고 있으며 화학비료와 유기합성농약의 사용을 줄이고 퇴비나 생물 농약의 사용을 늘리는 방식으로 방향을 바꾸어 나가고 있으나, 친환경 옥수수에 대한 품질 특성에 대한 정보는 여전히 제한적이다(Song *et al.* 2011).

따라서 본 연구는 노균병 저항성 유전자 후보군을 발굴 및 동정하여 화학적 방제가 아닌 재배시환경에 친화적인 노균병 저항성 품종을 탐색하고자 bioinformatics 분석 기술을 이용하여 감수성 계통인 B73, CML270과 저항성 계통인 CML288, Ki3 및 Ki11에서 예상 전사체를 발굴하였다. 예상 유전자들의 저항성과 감수성 계통에서 발현을 검정하여 노균병 저항성 관련 후보 유전자들을 선발하여 옥수수 재배시 품종선택 및 살균제 살포 감소 등 토양오염을 방지할 수 있는 친환경 품종 개발을 위한 유전자 선발을 본 연구로의 목표로 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료

미국 농무성을 통하여 NAM (Nested Association Mapping) 집단의 모본으로 B73, CML228, CML270, Ki3, Ki11를 분양받았다. 노균병에 감염된 옥수수 샘플은 캄보디아 프롬펜의 연구포장에서 재배되는 옥수수에 접종하여 수집하였다(Kim *et al.* 2017). CML228, Ki3, Ki11 계통에 대한

노균병에 감염되지 않은 건강한 샘플은 공주대학교 온실에서 발아시켜 4주 동안 주간온도 30°C, 야간온도 27°C, 습도 50%를 유지하며 15시간 광조건, 9시간 암조건이 일정하게 반복되도록 구축한 온실 안에서 포트 지름 21 cm, 높이 18.5 cm에서 생육하였다. 수집된 식물 샘플들은 RNA 추출 및 실험에 사용될 때까지 -80°C에 보관하였다.

2. RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA는 Ribospin™ Seed/Fruit kit (GeneAll Biotechnology Co. LTD., Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. 건강한 옥수수 잎과 노균병에 감염된 옥수수 잎 조직을 액체 질소로 급속 냉각 후에 막자사발을 이용하여 마쇄하였다.

곱게 분쇄된 샘플 100 mg을 정량하여 추출버퍼에 균일하게 잘 녹여준다. 이후 과정은 제조사의 표준 매뉴얼을 따라 수행되었으며, 추출한 RNA는 Biospec-nano (SHIMADZU Corporation, Kyoto, Japan)을 이용하여 측정하였으며 전기영동을 통하여 추출된 RNA의 확인하였다. 1 µg의 total RNA는 Power cDNA synthesis kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다.

3. Candidate gene 선발 및 프라이머 디자인

기존 연구를 통하여 노균병 저항성 부분이 옥수수 6번 염색체에 위치 (Chr6: 146,503,155-147,912,501)하는 것으

Table 1. Designed primer by Plant ensemble for predicted downy mildew resistance candidate gene

Primer name	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
ZM2G115065	CGCGCCAAATGTTCTAGTCC	CGGTCATGCGTCCCTGTA
ZM2G181259	TCAACACAAGTACACACCACA	CCAATGCGTCTCTGTACACCA
ZM2G353209	GAGCGAGGAGACGATGAAGG	CCCGATAGATTCCAAGGCC
ZM2G067122	TCTTTCCTCGCTGCTATTCCC	AGGTCGAGGGCGACGATAAG
ZM5G882442	TCACCTTGTATGTTGGCACCTC	GGTGCACGTGACAAGCAATAG
ZM2G073349	ATACCCAGCCAGGGGTATGT	GATTTGCCTGTGTTTCGCTCC
ZM2G073310	AAGATCGCGCCGGAGAAAGG	ATCCCCCGTCAGGTAAGGGA
ZM2G371058	CACTCGTCTTGTTGGCCTCT	AGAAGACAGCATCCGCGTAG
ZM2G137118	GCAGCCAACACAAGGAAGTG	AACTGATGGGGATCGTGCTG
ZM2G430871	CCATCCTGGAGAGGAAGCCT	ACCATCTCTGCATGGAAGC
ZM2G091201	CCAGCAACCAGAGTTCCTCCA	TAGTAGAAGGCCATTGCTGCG
ZM2G122709	CCTCATCTCCTCGCTCAAGTC	GCGACGAGAAGGTAGTAGTGG
ZM2G392918	TCGTCCTCGACCGTCTTCT	GCGACAGCATCACGTACATC
ZM2G465835	GTTCATTCGACAGGCGCAC	GGTCTTCTTGGTCCCGATGG
ZM2G106140	TCAGACTGAGGCTGTTGC	GTCTGAGATTGAGGCACGCT
ZM2G106190	CTCCTACCCCAAGGCAGACT	GAACGCACCACCACCTTTG
ZM2G000842	AGCGATCATGGTAGAGCTGC	TCAACAGATGTACGGGTGCC
ZM2G106218	GGCTGGCATCCTTCTTCT	TTACGTTTCCCCGCTCCTTC
ZM5G812246	GCTGCCAGTGTAGACATACATA	CCTTTTGAAGATCTGAGCATCC
ZM2G000836	ACGAGAAGAACTGCGGAAG	GATCATTCGGTCCAAGGGCT
ZM2G000829	GAGATTGCACGGCAAGAAGC	GAGCTCTGGACTCCATCTGT
ZM2G000816	GCTTGGTCTCTTTGGGTTGC	CATGCCTGACATGTTGGAGA
ZM5G834076	CTGGCCGGATGATGTTCTT	ACAGTGGTCCCTTGCTCCT
ZM2G171139	CTCCGGGACATCGTGTAAAG	TGCACGTAGTGCATGTCCTT
ZM2G131733	TGCCAAGCGGTCAATGATCA	ACTCTGAGCTGAATCGTCC
ZM2G131756	TTCGGGAGAGGGGGATGAAT	TCGCTGAGTCTGGGGGAATA
ZM2G141792	GCCACAACCAATCCATGTG	TGTTTATGAGGGAGACAACCTT
ZM2G152051	CCTGGTCTCGTCTTATCGG	GCTTTCGCTTGGTACCCTCA
ZM2G161534	GCTGAAACCTCGTCTTCCCA	TGGCCGGCAAATCTTTCTCT
ZM2G037048	CATGCTCAATCATGCCTGTGT	TGCAACGACTTCCCAACT
ZM2G129344	AGACCTAAGGCTGCAGAAGG	AGGCTTCAACACAAGAGGTCC
ZM2G129288	CATCGCCTCGGTGAAGAACT	CTTGCCACCTTACCGAACT
ZM2G129247	TGACCTGTCTCACTCGACC	TCCTGAATCGCGCTAGGTCC
ZM2G129234	TCGGACTCATCTCTCCTGG	TCCAGCGGGAACAGACAGTA
ZM2G429045	AGAAGCCGTCGTACCTTCTG	CAAACCTCGTAGTCGCT
ZM2G122410	GATTTCCAGCGACTGGCTCT	ACAGCCTCACACAAGGGAAG
ZM2G334216	ACCATTTGTCTGAGCACGGT	AAGTGTGCTGGCATGCTTTG
ZM2G070113	GATGGTTGCTGCCAGCTAGA	AGCTCCAGCTTGTGGAAGG

로 밝혀졌으며 (Kim *et al.* 2017), 정밀 QTL 분석을 통하여 옥수수 6번 염색체의 152,892,333과 154,335,437 사이 부분이 노균병 저항성과 높은 상관관계가 있는 것으로 확인되었다 (in preparation). 해당지역의 염기서열은 MaizeGDB (maizeGDB.org)를 이용하여 확보하였으며 수집된 염기서열에 존재할 것으로 예측되는 전사체 (predicted transcript)는 Ensembl Plants (plants.ensembl.org)를 이용하여 분석하였다.

프라이머 디자인은 수집된 예상전사체 염기서열을 바탕으로 유전자의 엑손 부분을 이용하여 PCR product가 200 bp 미만이 되도록 제작하였다 (Table 1). RT-PCR을 수행하기 위하여 유전자의 엑손 부분을 참고하여 NCBI-Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>)를 이용하여 프라이머를 제작하였다.

4. RT-PCR과 염기서열 분석

노균병 저항성 후보군 유전자를 탐색하기 위하여 reference gene으로는 다양한 환경에서도 안정적으로 발현되는 housekeeping gene인 옥수수의 actin1 유전자 (accession No. J01238 at genebank)를 선택하였다. 사용된 프라이머의 염기서열은 sense primer: 5'-GATTCCTGGGATGCCGAT-3', antisense primer: 5'-TCTGCTGCTGAAAAGTGCTGAG-3'

이다 (Manoli *et al.* 2012).

합성된 cDNA는 Rotor gene-Q (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 gene-specific primer set로 quantitative RT-PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 수행조건은 95°C에서 10분간 변성과정 (denature step)을 유지하고, 40 cycle (95°C 30초, 56~59°C 10초, 72°C 20초)을 진행한 후 melting curve를 65°C에서 95°C까지 진행하여 상대적 발현을 확인하였다. 또한, qRT-PCR 결과 Cq값 및 Cq평균값을 산출했으며, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001)를 이용하여 각 유전자의 상대적 발현값을 확인하였다. 모든 PCR 분석은 세 번의 반복 수행을 통해 얻은 데이터를 활용하여 actin1을 대조군으로 놓고 각 저항성 유전자 후보군의 발현 패턴을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 옥수수 생육 비교

공주대학교 연구 포장과 온실에서 생육시킨 옥수수의 잎과 캄보디아 프롬펜의 연구포장에서 노균병에 감염된 옥수수를 비교하였다. 노균병은 활물기생 병원균이므로 국내 반입이 불가능하여 프롬펜 현지 연구포장의 감염 식물

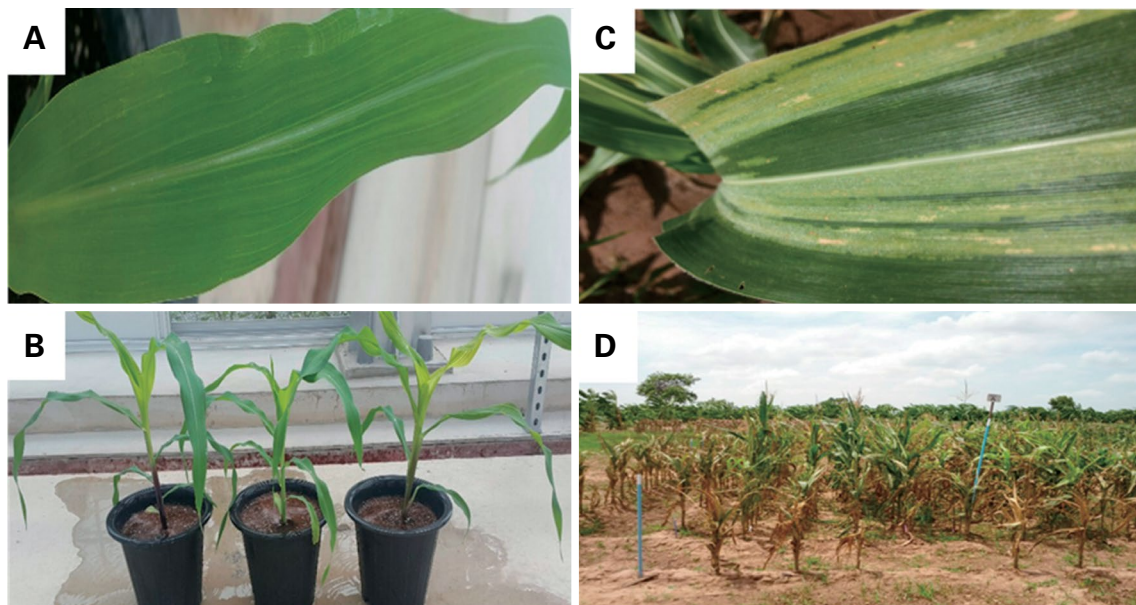


Fig. 1. Phenotypic differences between healthy and downy mildew-infected maize species. (A) A close-up of a healthy leaf in Ki11; (B) healthy maize Ki11 plants; (C) close-up of downy mildew-infected leaf in B73; and (D) infected maize field. The withering plants were infected with B73.

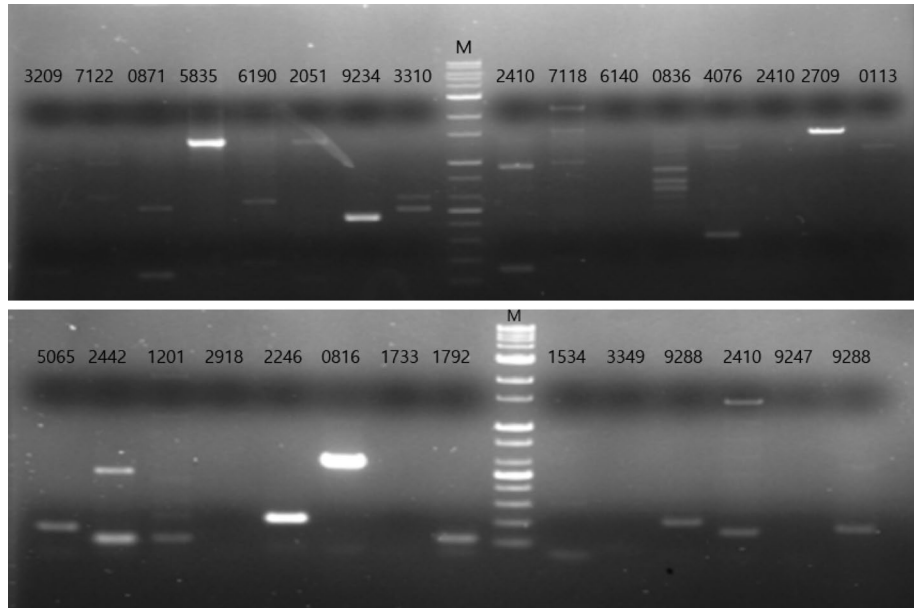


Fig. 2. PCR screening with the predicted transcript-specific primers in B73 genomic DNA (M represents size marker).

체와 간접 비교 하였다. 공주대학교 연구 포장의 건강한 옥수수 잎은 녹색을 띠고 있으며 줄기가 탄탄한 형상을 나타내고 있다. 또한 황변이 발견되지 않았다(Fig. 1A, B). 반면 노균병에 감염된 상태의 잎에는 노란색 반점이 나타났으며 잎맥 방향을 따라 염색이 흐려졌다(Fig. 1C). 노균병 감염 후 6주된 옥수수는 줄기와 잎이 심하게 말라 갈변화와 일어나 고사되었다(Fig. 1D). Kim *et al.* (2017)은 노균병 감염시키는 간이 방법을 개발했는데, Fig. 1의 노균병 감염 증상과 유사하게 잎맥을 따라 황변된 잎몸과 노란 반점이 나타나고 있다. 한편 Kim *et al.* (2016)은 국내외 40개 옥수수 품종(국내 7품종, USDA 분양 26품종, 동남아 적응 육성 7품종)에 대하여 노균병을 접종하여 저항성 여부를 검정하였다. 이를 통하여 B73과 CML270은 감수성으로 확인되었으며, Ki11, Ki3, CML228은 저항성으로 선발되었다. 본 연구에서는 B73, CML270, Ki11, Ki3, CML228에 대하여 노균병을 접종한 후 저항성 품종에서만 발현이 높아지는 전사체를 노균병 저항성 관련 후보 유전자군으로 평가하였다.

2. Primary PCR screening을 통한 예상 전사체 선발

옥수수의 6번 염색체의 152,892,333과 154,335,437 위치 사이의 예상전사체 정보로 제작된 프라이머는 GC 비율이

평균적으로 50%이며 예상 PCR 결과물은 101bp~199bp로 증폭될 수 있도록 38쌍으로 제작되었다. 제작된 프라이머는 노균병 감수성 계통이며 국제 옥수수의 표준 품종인 B73의 genomic DNA를 이용하여 프라이머의 정상적인 증폭 여부를 검정하였다(Fig. 2). 각각의 프라이머들은 PCR screening 과정을 통하여 100bp~2kbp의 PCR 결과물을 생성하였다. 프라이머 제작 시 예상된 PCR 증폭 크기와 실제 PCR 결과물이 다른 경우가 발견되는데, 이 이유는 cDNA는 인트론이 없기 때문에 PCR 증폭 시 genomic DNA와 PCR 결과가 달라질 수 있으며, 인트론 존재 유무에 인해 밴드의 크기가 예측과 달리 200bp 이상의 크기가 나올 수 있다. 한편, PCR 밴드가 2개 이상 나오는 경우도 발견되는데 이 결과는 genomic DNA는 cDNA보다 훨씬 더 복잡한 구조를 지니기 때문에 프라이머의 결합부위에서 mismatch 되기 때문이라고 사료된다. 프라이머 mismatch로 인하여 부정확한 PCR 증폭이 되는 프라이머들은 RT-PCR에서 일정한 발현을 보기 어렵다고 판단하여 프라이머를 다시 디자인하였으며 유사한 결과가 반복되는 경우 해당 프라이머는 RT-PCR에서 제외하였다. Primary screening PCR을 통해 선발된 16개의 프라이머는 대표 품종이며 감수성 계통인 B73과 저항성 품종인 Ki11에서 각 건강한(healthy) 샘플과 노균병 감염된(Infected) 샘플로 구분하여 RT-PCR을 수행하였다. 본 연구에서 사용된 B73과 Ki11은 노균병 감

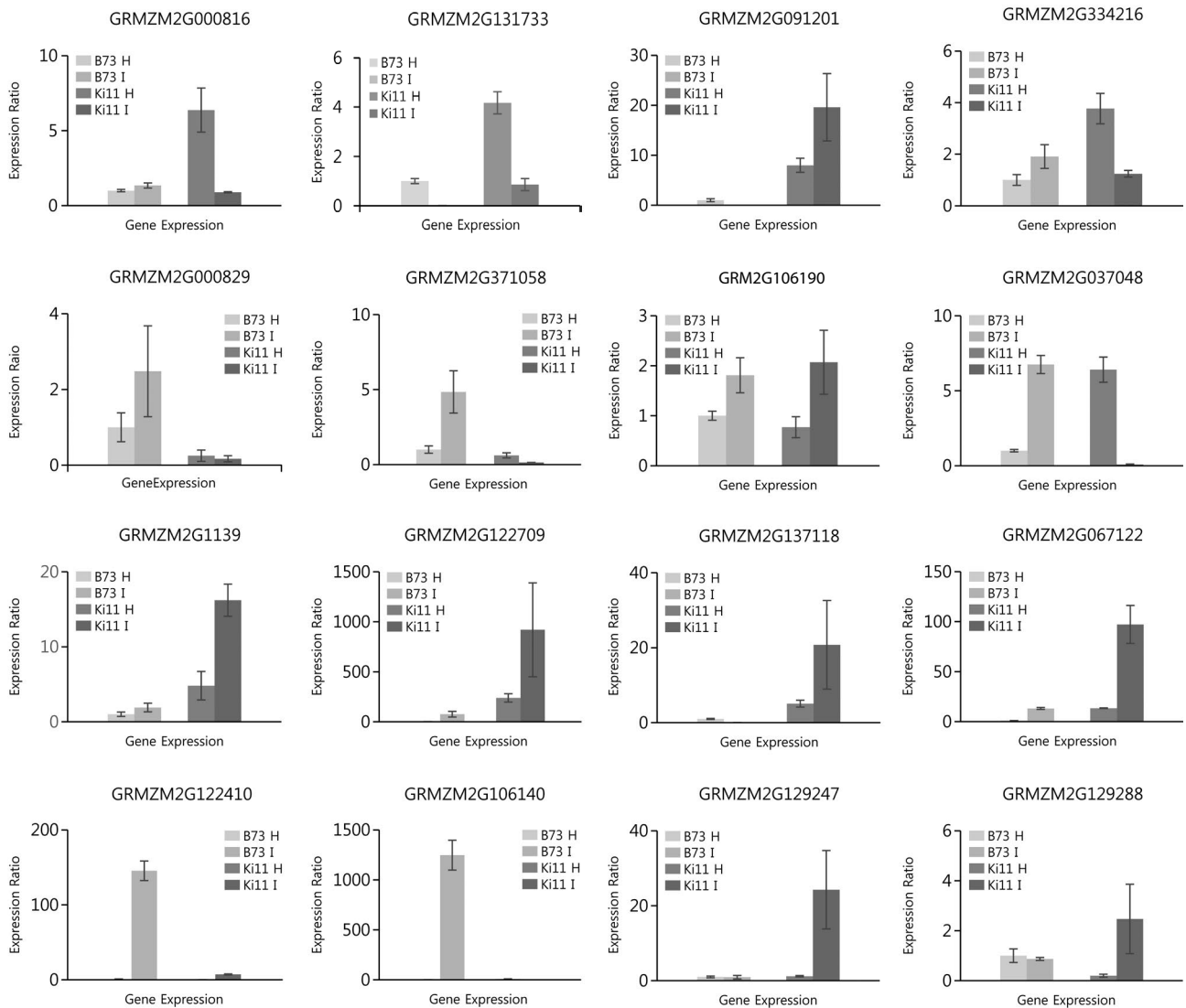


Fig. 3. RT-PCR analysis of candidate genes for downy mildew resistance predicted using the designed primer set with B73 Health, B73 Infected, Ki11 Health and Ki11-infected tissues. Data represent mean \pm SD ($n=3$) of three replicates.

수성과 저항성의 대표 품종이며 또한 두 품종의 F₇ 세대 mapping population을 육성하고 있기 때문에 추후 노균병 MAS (Marker Assisted Selection)으로 활용하기 위하여 두 품종에서 우선적으로 발현 검정을 수행하였다.

프라이머 0816과 1733은 건강한 Ki11에서의 발현이 다른 3 샘플보다 발현이 월등히 높으나 감염된 Ki11의 발현이 건강한 B73에서의 발현보다 낮게 검정되어 노균병 저항성 메커니즘과 관련이 적은 유전자로 사료된다(Fig. 3). 프라이머 0829와 1058의 경우 서로 유사한 발현 양상을 보이고 있는데 감염된 B73에서의 발현이 건강한 B73에서의

발현보다 매우 높으며 Ki11에서는 건강한 샘플, 감염된 샘플 둘다 건강한 B73에서의 발현보다 낮다. 프라이머 1139와 2709는 4개의 샘플에서 모두 발현이 되었으나 감수성 계통의 B73에서의 발현보다 저항성 계통의 Ki11의 발현이 더 높으며 각각 건강한 샘플, 감염된 샘플에서 비교하여도 높은 발현 양상을 확인할 수 있었다. 프라이머 2410과 6140은 감염된 B73에서의 발현이 다른 3개의 샘플보다 확연히 높은 발현을 보였다. B73은 노균병에 대하여 감수성 계통이므로 프라이머 2410과 6140에 의한 고발현은 노균병에 대한 직접적인 영향이라고 볼 수 없다고 사료된다. 또한,

저항성 계통인 Ki11에서의 건강한 샘플과 감염된 샘플 모두에서 발현이 낮기 때문에 프라이머 2410과 6140는 노균병 저항성과 관련된 유전자가 아니라는 가능성을 간접적으로 증명한다. 프라이머 1201는 Ki11에서의 발현이 B73보다 매우 높으며 특히, 감염된 샘플의 경우에는 건강한 샘플보다 약 1.5배 가량 발현이 높은 것으로 나타났다. 프라이머 4216은 4개의 샘플에서 발현이 나타났으나 건강한 Ki11에서의 발현이 매우 높았으며, 감염된 Ki11에서의 발현이 감염된 B73에서의 발현보다 낮고 건강한 B73에서의 발현과 비슷하여 프라이머 4216은 노균병 저항성과는 연관성을 획득하기 어렵다고 사료되며, 프라이머 6190은 B73과 Ki11 두 품종에서 건강한 샘플의 발현이 감염된 샘플의 발현보다 낮게 나타나는데 품종 간 발현 양상이 유사하다. 이는 노균병과 관련되어 있는 유전자보다 다른 유전자의 간섭이 있을 거라는 가능성이 농후하므로 이 두 개의 프라이머는 노균병 저항성 유전자 후보군 전사체 탐색에서 제외되었다. 프라이머 7048은 감염된 B73의 발현과 건강한 Ki11에서의 발현 정도가 서로 비슷하며 나머지 두 샘플에 비해 발현이 약 6배 정도 높으며, 감수성 계통에서는 감염된 샘플의 발현이 높고 저항성 계통에서는 건강한 샘플의 발현이 높는데 Ki11에서 감염된 샘플의 발현이 지나치게 낮아 노균병 저항성과 연관된 유전자가 아닌 다른 유전자가 발현된 것으로 예상된다. 프라이머 7118, 7122, 9247은 서로 발현 양상이 서로 유사하며, 다른 3개의 샘플에 비해 감염된 Ki11에서의 고발현 양상이 나타났으며 이는 노균병 저항성 유전자와 연관성을 가진다고 추론되며, 저항성 품종에서 특이적으로 발현하는 유전자가 관여되었을 것으로 사료된다. 프라이머 9288은 감염된 Ki11에서의 발현이 건강한 B73에서의 발현보다 약 2.5배 정도 높으며, 모든 샘플에서 발현되었고 저항성 계통의 건강한 Ki11에서의 발현보다 감염된 Ki11의 발현이 높은 것으로 나타났다. 이를 통해 노균병 저항성과 연관된 유전자로 추정할 수 있다.

종합적인 RT-PCR 분석을 통하여 저항성 품종인 Ki11이 노균병에 감염되었을 때 발현이 유전자 중심으로 최종 6개의 유전자(GRMZM2G171139, GRMZM2G122709, GRMZM2G091201, GRMZM2G129288, GRMZM2G129247, GRMZM2G067122)를 선발하였다.

3. 노균병 저항성 후보 전사체 선발 및 분석

최종 선발된 6개의 전사체들은 5개의 품종(감수성: B73,

CML270, 저항성: Ki11, CML228, Ki3)의 각각 건강한 cDNA와 병에 감염된 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 4). GRMZM2G067122 전사체는 B73 품종에서는 건강한 샘플, 감염된 샘플 모두에서 발현이 극히 낮았다. 반면 같은 감수성 계통인 CML270에서는 건강한 샘플, 감염된 샘플의 발현이 B73에서의 발현에 비하여 매우 높았다. 그러나 건강한 샘플과 감염된 샘플의 발현의 차이가 유의차가 없기 때문에 GRMZM2G067122 전사체는 CML270에서 발현이 자연스럽게 높아지는 전사체로 예상된다. 반면 저항성 품종인 Ki11, CML228, Ki3의 경우 감염된 샘플에서는 발현이 건강한 샘플보다 높게 나타났으며, 저항성 품종에서도 Ki11, CML288, Ki3 순으로 발현이 높았다. GRMZM2G091201 전사체는 B73에서 발현은 낮으나 건강한 샘플의 발현이 감염된 샘플의 발현보다 다소 높았다. CML270은 다른 품종에 비하여 가장 발현이 높게 나타났으며 특히 건강한 샘플보다 감염된 샘플이 유의차 있게 발현이 높게 나타났다. Ki11에서는 감염된 샘플에서 건강한 샘플보다 발현이 높게 나타났다. CML288, Ki3의 발현은 거의 없었다. GRMZM2G091201 전사체는 저항성 품종에서 발현이 낮게 확인되었기 때문에 노균병 저항성 유전자는 아닌 것으로 판단된다. GRMZM2G171139 전사체는 감수성 계통인 B73과 CML270의 발현이 저항성 계통인 Ki11, CML228, Ki3의 발현보다 높게 나왔으나, 감염된 CML270에서는 건강한 CML270보다 발현이 낮고 감염된 Ki11과 CML228의 발현이 감염된 B73보다 높으므로 노균병 저항성 관련 유전자가 미약하나 존재할 수 있다고 예측한다. GRMZM2G122709 전사체는 건강한 Ki11에서의 발현이 건강한 B73, 건강한 CML270보다 발현이 높으므로 저항성 유전자가 관련되어 있을 가능성이 있으며, 감수성 계통의 감염된 CML270에서의 발현이 감수성 샘플 중에서는 제일 높았으나 저항성 계통의 감염된 Ki11에서의 발현이 이보다 훨씬 높으며 감염된 CML228에서도 다른 감수성 샘플보다 발현이 높게 나왔다. 이 전사체는 노균병 저항성과 관련있는 유전자일 것으로 사료된다. GRMZM2G129247 전사체는 감염된 CML228에서 가장 높은 발현을 나타냈으며 두 번째로 발현이 높은 감염된 Ki11에서의 발현이 감수성 계통의 건강한 샘플들, 감염된 샘플들보다 발현이 높게 나타났다. 저항성 품종의 감염된 샘플에서 GRMZM2G129247 전사체 발현이 건강한 샘플에 비하여 증가하였기 때문에 노균병 저항성이 연관되어 있다고 예상하였다. GRMZM2G129288 전사체는 감수성 계통의 노균병에 감염된

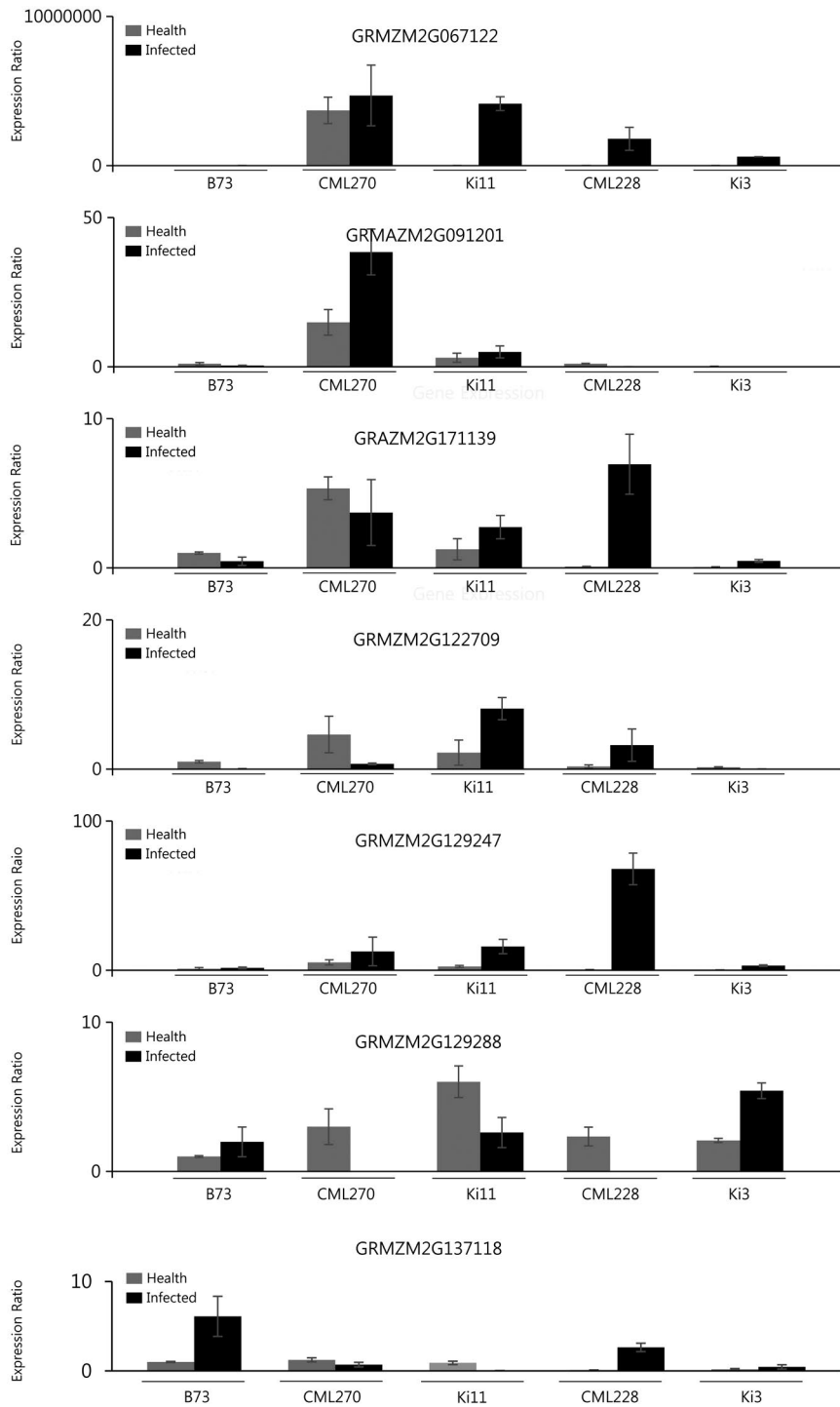


Fig. 4. Expression profiles of selected candidate genes associated with downy mildew resistance generated using qRT-PCR. Data represent mean \pm SD ($n=3$) of three replicates.

샘플의 발현이 저항성 계통의 샘플의 발현보다 상대적으로 낮았다. 그리고 다른 전사체와 달리 건강한 Ki11의 발현

이 월등히 높으며 감염된 CML228의 발현은 낮지만 건강한 Ki3와 감염된 Ki3에서의 발현은 높으므로 이 유전자는

Table 2. Summary for identification of Downy mildew resistance candidate transcript

Transcript ID	Name	Type	Length (bp)
GRMZM2G067122	<i>Zea mays</i> uncharacterized LOC100277843 (LOC100277843), mRNA.	T01	2,109
GRMZM2G171139	<i>Zea mays</i> clone 461707 hypothetical protein mRNA, complete cds.	T01	2,610
GRMZM2G129247	<i>Zea mays</i> clone pUT3459 bZIP transcription factor (bZIP101) mRNA, partial cds.	T03	1,284
GRMZM2G122709	<i>Zea mays</i> clone pUT5725 OFP transcription factor (OFP28) gene, partial cds.	T01	1,060
GRMZM2G129288	PREDICTED: <i>Zea mays</i> pentatricopeptide repeat-containing protein At3g42630 (LOC103630413), mRNA	T02	2,535

Ki3에 특화되어 있다고 볼 수 있기 때문에 노균병 저항성 유전자와 관련이 있을 것으로 예측할 수 있다.

전사체 발현 분석을 통하여 노균병 저항성에 관련이 있을 것으로 사료되는 5개의 전사체의 염기서열을 분석하여 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 annotation을 검정하였다. 선발된 전사체는 uncharacterized LOC100277843, hypothetical protein, bZIP transcription factor, OFP (Ovate Family Protein) transcription factor, pentatricopeptide repeat (*Ppr*)-containing protein으로 최종 확인되었다 (Table 2). OFP transcription factor는 식물의 형태적 외관을 조절하는 유전자로 알려져 있다 (Lin *et al.* 2014). Yu *et al.* (2015)에 의하면 식물의 발달과 광범위한 스트레스 저항성에 관여하는 전사인자로 보고되고 있다. OFP 전사인자가 특이적 발현을 보이는 이유는 노균병 감염에 대한 식물 스트레스에 의한 발현 가능성이 있다고 보인다. *Ppr* 유전자는 식물의 병저항성 유전자로 알려져 있다 (Sekhwal *et al.* 2015). 특히 포도의 *Ppr* 유전자인 Rpv12는 upstream에 존재하는 SNP 마커에 의하여 노균병 저항성이 결정되는 것으로 알려져 있다 (Venuti *et al.* 2013). bZIP 전사인자는 루이신 지퍼 도메인을 가지고 있는 전사인자로서 대부분 비생물학적 스트레스에 관여하나 일부 전사인자에서 병저항성에 관여한다고 알려져 있다 (Alves *et al.* 2013). 본 연구를 통해 발굴한 bZIP101 전사인자는 아직 그 기능이 많이 알려져 있지 않으므로 직접적인 노균병 저항성 유전자라고 판단할 수는 없으나 추가 실험을 통하여 가능성을 검정할 필요가 사료된다. Kim *et al.* (2017)은 국내의 옥수수 품종에서 노균병 저항성 마커를 검정하여 저항성 유전자로 bZIP (Basic leucine Zipper) transcription factor (GRMZM2G045236)와 *Ppr* 유전자 (GRMZM2G447535)를 탐색되었다. 이 결과는 본 실험결과와 유사한 관계를 나타낸다. 비록 transcript ID는 다르나 서로 독립된 실험에서 유사한 유전자가 발굴된 것으로 미루어보아 bZIP과 *Ppr*은 노균병 저항성에 깊이 관여하는 유전자 후보라고 예상된다.

본 연구는 옥수수의 노균병 저항성 후보 유전자 군을 발굴하기 선행 QTL 분석을 바탕으로 6번 염색체의 노균병 예상 전사체를 분석하고 발현을 검정한 실험이다. 이를 통하여 발굴된 5개의 후보 유전자군 (OFP 전사인자, bZIP101 전사인자, *Ppr*과 미확인 유전자 2개)는 후속 연구를 통하여 옥수수 노균병이 일으키는 피해에 대응할 방법에 기여할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 옥수수 재배 시 환경에 영향을 미치는 노균병 저항성과 관련된 유전자 후보군을 탐색해서 노균병으로 인한 토양오염과 옥수수 생산량 감소를 해결하기 위하여 노균병 저항성 품종을 효율적으로 발굴하기 위한 연구이다. 옥수수의 6번 염색체의 152,892,333과 154,335,437 사이에 있는 노균병 저항성 유전자를 탐색하였으며 이 부분에 존재할 것으로 예상되는 전사체에서 38개의 프라이머 세트를 디자인하여 이 중 16개의 예측 전사체를 가려 내었다. 또한 RT-PCR을 수행하여 감염된 Ki11의 발현이 높은 7개의 전사체로 5개의 품종에 대하여 건강한 샘플과 감염된 샘플을 검정하였고 최종 5개의 후보 유전자군 [알려지지 않은 미확인 유전자 2개, OFP transcription factor, bZIP transcription factor, pentatricopeptide repeat (*Ppr*)]이 발견되었다. 본 연구의 결과로 추가적인 실험 설계를 통해 5개의 후보 유전자군에 대한 재검정을 통하여 확실한 노균병 저항성 유전자를 발굴하고 이를 노균병 저항성 품종 개발 및 방재에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업 (식량종자사업단, 과제번호

호: 213009-05-3-SB710)과 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ012649022019)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Alves MS, SP Dadalto, AB Goncalves, GBD Souza, VA Barros and LG Fietto. 2013. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: A review. 2013. Int. J. Mol. Sci. 14:7815–7828.
- Broyles JW. 1956. Observations on time and location of penetration in relation to amount of damage and chemical control of *Physoderma maydis*. Phytopathology 46:8.
- Jeffers D, H Córdova, S Vasal, G Srinivasan, D Beck and M Barandiarán. 2000. Status in breeding for resistance to maize diseases at Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. pp. 257–266. In Proceedings of 7th Asian Regional Maize Workshop (Vassal *et al.* eds.). PCARRD, Los Baños, Philippines.
- Kim CH, YH Lee, KH Kim, SH Shin, KS Song, JC Moon, BM Lee and JY Kim. 2016. The study of genetic diversity for drought tolerance in maize. Korean J. Environ. Biol. 34:223–232.
- Kim EO, MH Yu, KT Lee, KS Yun and SW Choi. 2009. Effect of thermal pretreatment on the functional constituents of waxy corn (*Zea mays* L.). Food Sci. Biotechnol. 18:1336–1341.
- Kim JY, JC Moon, HC Kim, SH Shin, KT Song, KH Kim and BM Lee. 2017. Identification of downy mildew resistance gene candidates by positional cloning in maize (*Zea mays* subsp. *mays*; *Poaceae*). Appl. Plant Sci. 5:1600132.
- Kim KH, JC Moon, JY Kim, HC Kim, SH Shin, KT Song, SB Baek and BM Lee. 2016. Evaluation of maize downy mildew using spreader row technique. Korean J. Crop Sci. Biotechnol. 61: 41–49.
- Kim SD and BE Dale. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenerg. 26:361–375.
- Kim SL, HG Moon and YH Ryu. Current status prospect of quality evaluation in Maize. 2002. Korean J. Crop Sci. Biotechnol. 47:107–123.
- Lin JJ, CP Yu, YM Chang, SCC Chen and WH Li. 2014. Maize and millet transcription factors annotated using comparative genomic and transcriptomic data. BMC Genomics 15:818.
- Livak KJ and TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods 25:402–408.
- Manoli A, A Sturaro, S Trevisan, S Quaggiotti and A Nonis. 2012. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. J. Plant Physiol. 169:807–815.
- Pingali PL. 2001. 1999/2000 World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. CIMMYT, Mexico.
- Rao BM, HS Prakash, HS Shetty and KM Safeeulla. 1985. Downy mildew inoculum in maize seeds: techniques to detect seed-borne inoculum of *Peronosclerospora sorghi* in maize. Seed Sci. Technol. 13:593–600.
- Rashid Z, PH Zaidi, MT Vinayan, SS Sharma and TAS Setty. 2013. Downy mildew resistance in maize (*Zea mays* L.) across *Peronosclerospora* species in lowland tropical Asia. Crop Prot. 43:183–191.
- SeKhwal MK, P Li, I Lam, X Wang, S Cloutier and FM You. 2015. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. Int. J. Mol. Sci. 16:19248–19290.
- Siresha Y and R Velazhahan. 2016. Biological control of downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* under environmentally controlled conditions. J. Appl. Nat. Sci. 8: 279–283.
- Song EM, HY Kim, SH Lee, SH Woo, HS Kim, KS Kyung, JS Lee and HS Jeong. 2011. Chemical components and quality characteristics of waxy corns cultured by conventional and environmentally-friendly methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40:962–968.
- Varshney RK, JM Ribaut, ES Buckler, R Tuberosa, A Rafalski and P Langridgem. 2012. Can genomics boost productivity of orphan crops. Nat. Biotechnol. 30:1172–1176.
- Venuti S, D Copetti, S Foria, I Falginella, S Hoffmann, D Bellin, P Cindrić, P Kozma, S Scalabrin, M Morgante, R Testolin and GD Gaspero. 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. PLoS One 8:e61228.
- Yu H, W Jiang, Q Liu, H Zhang, M Piao, Z Chen and M Bian. 2015. Expression pattern and subcellular localization of the ovate protein family in rice. PLoS One 10:e0118966.