

DEB 처리에 의해 유도된 벼 돌연변이 집단으로부터 도열병 감수성 돌연변이 분리

김혜경 · 이상규 · 한무호 · 전용희¹ · 이기환² · 이윤형 · 부성희 · 한태룡 · 전종성*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹농촌진흥청 작물과학원,

²농촌진흥청 작물과학원 영남농업연구소

Isolation of Mutants Susceptible to Rice Blast from DEB-treated Rice Population

Hye-Kyung Kim, Sang-Kyu Lee, Muho Han, Yong-Hee Jeon¹, Gihwan Yi², Youn-Hyung Lee,
Seong-Hee Bhoo, Tae-Ryong Hahn and Jong-Seong Jeon*

Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University,
Yongin 449-701, Korea

¹National Institute of Crop Sciences, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea

²Yeongnam Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science,
Rural Development Administration, Milyang 627-130, Korea

Received Novem 25, 2005; Accepted December 2, 2005

Rice blast, which is caused by the fungus *Magnaporthe grisea*, is one of the most destructive diseases of rice. To identify genes involving in the signal transduction pathways that mediate rice blast resistance, we screened over 2,000 mutant lines of a highly resistant variety *RIL260* that were generated by using a DEB (1, 3-Butadiene diepoxide) treatment method. In the mutant population, the frequency of albino plants was 6.7%, indicating that this population has a high frequency of mutations in the genome. The primary screening identified 29 mutant plants that exhibit a complete or partial loss of the resistance to rice blast. Among them, M5465, the most susceptible line, was subsequently examined by DNA gel-blot experiments using DNA molecular markers of *Pi5(t)* that has been previously identified as a durable resistance locus in *RIL260*. The result revealed that a large deletion and rearrangement of genomic DNA occurred in the *Pi5(t)* locus. The results suggest that DEB can be used as an efficient mutagen to induce large scale mutations in the rice genome. The isolated mutants should be useful for elucidating the *Pi5(t)*-mediated signaling pathways of rice blast resistance.

Key words: *Oryza sativa*, *Magnaporthe grisea*, DEB, mutant, *Pi5(t)*

서 론

도열병은 곰팡이 균 *Magnaporthe grisea*에 의해 벼에 발병되는 것으로, 벼 수확량에 가장 큰 손실을 일으키는 질병이다. 최근 도열병에 대한 연구는 곰팡이 균에 의해 유발되는 식물 질병의 발생 과정을 이해하는 데 중요한 모델이 되고 있다. *M. grisea*는 높은 변이를 유발하는 특징을 보여, 새로 육성한 저항성 품종에서 다시 병을 유발하는 새로운 변이체를 발생시키게 되어 이에 따라 결국 벼는 저항성을 상실하게 된다.^{1,2)} 따라서 지속적인 내구 저항성을 갖는 도열병 저항성 품종을 육성하는

것이 주요한 연구의 목표이며, 이를 위하여 *M. grisea*에 의한 도열병 발생과정을 이해하는 것이 중요한 연구과제가 되고 있다.

최근 벼 유전체의 염기서열 분석이 완료되면서³⁾ 이 정보를 바탕으로 기존의 돌연변이체로부터 밝혀지지 않은 새로운 유전자의 기능을 분석하는 역유전학적(reverse genetics) 연구가 활발하게 수행되고 있다.⁴⁾ 역유전학적 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는 다양한 유전자에 돌연변이가 일어난 집단을 육성하는 것이 무엇보다 선행되어야 한다.

벼의 질병 연구에서 최근까지 T-DNA나 전이 유전자 [Dissociation element(Ds), Activation element(Ac), Tos17]와 같은 DNA 절편을 돌연변이 유발 물질로 사용한 삽입 돌연변이 집단이 확립되어 연구에 이용되어 왔다.^{4,7)} 벼의 질병 저항성에 필수적인 유전자 내에 결손이 발생하거나 삽입이 일어난 돌연변이체들은 해당 유전자의 기능에 대한 직접적인 해답을

*Corresponding author
Phone: +82-31-201-3671
E-mail: jjeon@khu.ac.kr

제공할 수 있는 매우 중요한 재료이기 때문이다. 그러나 현재 T-DNA 및 전이 유전자를 이용한 돌연변이 유발 체계는 널리 사용되고 있음에도 불구하고 몇 가지 한계점을 갖고 있다.

예로서 전이 유전자 Ac(activator)에 의해서 만들어진 돌연변이 집단은 세대를 계속하면서 이차적 유전자 변이의 빈도가 높고⁸⁾ Tos17을 이용하는 경우에는 상당수의 돌연변이체가 동일한 유전자 내에 삽입 돌연변이체로 나타나는 이른바 “hot spot”을 보인다.⁷⁾ T-DNA 삽입 돌연변이 집단은 많은 세대 동안 계속해서 삽입된 DNA가 화학적 및 물리적으로 안정되어 있다는 장점이 있지만 10만 개 이상의 대규모 집단을 육성하는 데 많은 비용과 시간이 필요하다는 단점이 있다.^{5,9)}

최근 기존의 삽입 돌연변이 체계의 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법이 개발되고 있는데 그중 가장 간편하여 활용 가능성이 높은 것이 fast neutron 광선을 조사하거나 ethylmethane sulphonate(EMS) 등 화학 물질을 처리하여 각각 유전자 결손과 점 돌연변이를 만드는 방법이다.¹⁰⁻¹¹⁾ 화학 물질 및 광선을 처리하여 제조된 돌연변이는 외래 DNA 삽입에 의해 생산된 형질 전환체가 아니므로, 이는 형질전환이 어려우면서 유용한 유전 자원을 갖는 일부 인디카형 벼 품종 등에 적용할 수 있는 방법이다. 아울러 다양한 유전자 결손 및 점 돌연변이체를 쉽게 만들 수 있다는 큰 장점이 있다. 이와 같은 새로운 돌연변이 유발 기법들은 주요 농작물의 유용 유전자 개발을 위한 역유전 학적 연구에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

돌연변이를 유발하는 물질 중 가장 대표적으로 사용되는 알킬화 반응 물질인 EMS는 많은 점 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이와는 대조적으로 1,3-Butadiene diepoxide (DEB)는 점 돌연변이와 함께 상당한 비율의 유전자 결손도 유발하는 알킬화 반응 물질이다.¹²⁾ DEB를 처리한 돌연변이 집단을 분석한 결과, 대략 40%의 돌연변이 집단에서 유전자의 결손이 존재함을 알 수 있게 되었다.¹³⁾ 유사한 비율로 발견된 염기가 치환된 돌연변이 중에 G, C와 A, T 염기에 국소적인 변이가 있는 것은 집단 내에서 대략 각각 30%, 15%의 비율로 나타났다. 따라서 DEB는 점 돌연변이와 DNA 결손 돌연변이를 동시에 일으킬 수 있는 돌연변이 유발 물질임이 알려져 있다.¹⁴⁾

현재까지 육성된 많은 벼 품종과 다양한 종류의 도열병균을 이용한 온실 내 접종 실험 및 도열병균에 심하게 오염된 필리핀, 인도네시아 지역에서의 재배실험을 통하여 저항성 유전자 *Pi5(t)*가 도열병의 내구 저항성 및 광범위 저항성에 밀접한 관련을 갖고 있음이 밝혀졌다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 본 연구에서는 첫째, *Pi5(t)* 도열병 저항성 유전자를 갖는 벼 품종인 *RIL260*을 사용하여 벼 돌연변이 집단을 육성하고, 둘째, 이들 집단에서 백색 돌연변이 식물체의 발생 빈도를 조사하여 돌연변이 유발 효율을 평가하며, 마지막으로 도열병균 접종 실험을 통하여 병 저항성이 현저히 감소된 돌연변이를 선별하고자 한다. 분리된 이병성 벼 돌연변이는 도열병 저항성 기작을 밝히는 데 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물 재료 및 병원균 배양. 본 연구에 사용된 벼(*Oryza sativa* cv. *RIL260*) 식물체는 낮과 밤의 온도가 각각 27, 20°C이며 낮의 길이가 14시간 유지되는 온실에서 재배한 것이다. 도열병균 접종 실험에 사용된 균주는 필리핀 레이스(race)인 *M. grisea* PO6-6로, 이는 식물체로 사용된 *RIL260*과는 비친화적(incompatible)인 작용을 보여 저항성 표현형을 나타냈다. *M. grisea* PO6-6는 오트밀(oatmeal) 고형 배지의 24°C 암소에서 2주간 배양하였으며, 4일간 접종에 사용할 포자 형성을 유도하였다. 수집된 포자는 0.05%의 Tween 20 용액에 1×10^5 포자(conidia)/ml 농도로 조정하여 사용하였다.

DEB 처리 및 M2 돌연변이 집단 육성. 벼 품종 *RIL260*의 3,000여 개 종자를 1.5 mM DEB 용액에 4시간 동안 담가 두었다. DEB 처리 후에 발아율은 82%였다. DEB 처리된 종자는 2시간 동안 증류수로 다섯 번 씻어 DEB 용액을 제거하였다. DEB 처리된 종자는 온실에서 발아 후에 농촌진흥청 작물과학원의 포장에서 재배되었으며, 이들 M1 집단의 자기수분을 통해 육성된 종자를 M2 집단으로 분류하였다.

병 저항성 돌연변이 분리. 모든 도열병균 접종 실험은 경희대학교 온실에서 수행하였으며, 병 발생의 판단 기준은 Chen 등¹⁹⁾의 방법을 기준으로 사용하였다. 병원균 접종 실험에는 3주간 재배한 유식물체를 사용하였다. 도열병균 접종 후 식물체는 24시간 동안 24°C의 암소에 보관한 후, 14시간의 빛 조건과 습도 95% 조건을 계속 유지하였다. 병 발생의 여부는 포자 접종 후 7일째에 조사하였다. *RIL260* 돌연변이 집단 M2 2,219 라인을 이용하여 도열병균의 접종 후 표현형의 변화를 조사하였는데 각 라인 당 20개체를 병원균 접종 실험에 사용하였다. 표현형 분석을 통하여, 저항성 표현형의 부분적인 결손이 일어나 중도 저항성을 나타낸 개체와 저항성을 완전히 상실하여 이병성을 보이는 개체를 구분 선별하였다. 선별된 개체들은 분리 재배되어 M3 라인의 육성에 이용되었다. 병 저항성이 감소된 표현형은 M3 라인을 통해 재검정되었다.

Southern 혼성화 반응(Southern blot hybridization). 돌연변이 개체에서 분리된 약 3 µg의 벼 게놈(genomic) DNA를 제한 효소로 절단하여 0.8% agarose 겔에서 전기영동을 통하여 분리하였다. Southern 혼성화 반응 분석은 high-stringency hybridization condition에서 수행하였다.²⁰⁾ DNA 탐침(probe)은 [α -³²P]dCTP를 이용하여 random priming의 방법으로 표지하여 준비하였다. 혼성화 반응 후 결과는 phosphorimager(Typhoon, Amersham, USA)를 사용하여 확인하였다.

결 과

DEB 처리에 의한 *RIL260* 돌연변이 집단 육성. 돌연변이 집단 육성에 사용된 벼 품종 *RIL260*은 아프리카에서 생육하는 자포니카형 벼 *Moroberekan*과 인디카형 벼 *CO39*간의 교배를 통

Table 1. Estimation of mutation frequency in DEB-treated M2 population of RIL260

Total	No. of lines		Frequency of albino plants (%)
	Wild type	Albino	
2,219	2,071	148	6.7%

하여 육성된 RIL(recombinant inbred line)이다.¹⁵⁾ *Moroberekan*은 도열병균에 대한 저항성이 매우 강해 병 저항성 연구의 모델 품종으로 알려져 있다. 따라서 도열병 저항성이 매우 약한 품종인 *CO39*와 교배하는 방법으로 *Moroberekan*에 존재하는 저항성에 영향을 미치는 유전자를 찾기 위하여 281개의 F₂ RIL 집단을 육성하였다.^{15,17)} 특히 *RIL260*은 도열병에 대한 내구 및 광범위 저항성을 조절하는 *Pi5(t)* 도열병 저항성 유전자를 갖고 있어 도열병 저항성 기작을 이해하는 데 좋은 재료로 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 벼 도열병의 광범위성 및 내구 저항성에 관련되는 신호 전달 과정을 이해하기 위하여 기초 재료로서 *RIL260*을 사용하여 DEB 처리를 거쳐 돌연변이 집단을 육성하였다. DEB는 벼 종자가 대략 80% 발아율을 보이는 농도인 1.5 mM을 사용하였다. 이보다 높은 농도에서는 발아율이 현저히 감소됨을 확인하였다. DEB 처리된 종자는 발아 후 포장에서 재배되어 최종적으로 총 2,219개의 M2 돌연변이 집단이 육성되었다. 대략 200여 개는 발아 후에 포장에서 재배 도중에 생장에 결손을 보여 더 이상 자라지 못하였으며 일부 개체는 개화 후에 불임 표현형을 보여 M2 육성에 이용되지 못했다.

돌연변이 빈도 조사. DEB 처리에 의해 돌연변이가 유발되는 빈도를 조사하기 위하여, M2 종자를 15개씩 파종하여 각 라인별로 백변종(albino) 돌연변이 식물이 나타나는 비율을 살펴보았다. 일반적으로 백변종 식물체 표현형은 관찰하기 편리하고, 다양한 유전자의 돌연변이에 의해서 유발되기 때문에 돌연변이 빈도 조사에 주로 이용되고 있다.²¹⁾ 전체 2,219개의 M2 돌연변이 집단에서 148라인(6.7%)에서 백변종 식물체의 출현이 관찰되었다(Table 1). 이 결과는 DEB 처리에 의해 육성된 *RIL260* 돌연변이 집단의 돌연변이 빈도가 매우 높음을 의미하며, DEB가 효과적으로 돌연변이를 유발할 수 있음을 보여주는 것이다. 이와 함께 일부 라인에서는 왜성 식물체가 발견되었으며, 개화 시기가 지연되는 라인도 발견되었다.

도열병 저항성 돌연변이 분리. 총 2,219라인의 M2 종자를 사용하여 도열병 저항성이 감소된 돌연변이 개체를 선발하여 집중하였다. 집중에 사용한 개체는 3주 동안 자란 유식물체로, 한 라인당 각각 20개체씩으로 구성되어 있다. 집중 7일 후 식물체 앞에 병반이 발생한 개체가 관찰된 29개 라인(*M5425*, *M5427*, *M5465*, *M5470*, *M5479*, *M5489*, *M5492*, *M5495*, *M5496*, *M5510*, *M5536*, *M5545*, *M6105*, *M6113*, *M6141*, *M6169*, *M6180*, *M6185*, *M6520*, *M6521*, *M6522*, *M6532*, *M6535*, *M6500*, *M6502*, *M6512*, *M6530*, *M6774*, *M7023*)을 분리하였다(Fig. 1).

각 라인별로 병 저항성 돌연변이는 1-2개씩 관찰되었다. 따라서 DEB에 의한 돌연변이 집단이 대부분 멘델의 유전법칙에 의한 3:1(정상:돌연변이)의 비율로 유전양상을 보이지는 않는

것으로 나타났다. 이것은 벼 종자의 배(embryo)의 일부 세포만이 DEB에 의해서 유전적으로 변이가 발생하여 키메라(chimera) 식물체가 만들어지기 때문으로 해석된다. 분리된 29개 라인인 도열병 저항성 유전자인 *Pi5(t)*에 의해 매개되는 병 저항성 신호 전달 과정 중 핵심인자에서 돌연변이가 발생한 것으로 추정되며, 따라서 이들은 *Pi5* 저항성 억제 돌연변이(*Pi5* suppressor)로 판단된다.

곰팡이 포자가 식물체 감염 후에 왕성하게 번식하는 형태의 큰 병반(도열병 판정 점수- 4 혹은 5)을 보이는 경우는 분리된 라인 중 두 개 라인(*M5465*, *M7023*)이었으며, 이들은 도열병원균인 *M. grisea* PO6-6에 완전히 저항성을 상실한 것으로 보였다. 그러나 나머지 라인들은 모두 도열병균에 대해서 부분적으로 저항성이 감소된 표현형(도열병 판정 점수- 2 혹은 3)인 것으로 보였다(Fig. 1).

돌연변이 라인의 *Pi5(t)* 유전좌위 DNA 구조 분석. *M. grisea* PO6-6에 저항성이 감소된 돌연변이 라인 중에서 도열병 저항성을 완전히 상실한 두 라인 중 *M5465*의 분석을 실시하였다. 먼저 *M5465* 돌연변이 라인에서 저항성의 감소가 염색체 상의 *Pi5(t)* 유전좌위(locus)에서 DNA 결손 때문인지 아닌지를 조사하는 실험을 실시하였다. 이를 수행하기 위하여 큰 병반을 보이는 돌연변이 라인 *M5465*는 표현형 재분석 및 DNA 분석을 위하여 M3 동형접합성(homozygous) 식물체를 세대 진전을 통하여 육성하였다. 우리는 선행 연구를 통하여 *Pi5(t)*가 존재하는 벼 염색체 9번에 위치한 약 170 kb 지역을 결정하였으며, 이 지역 내에 존재하는 DNA 표지를 개발하였다.¹⁷⁻¹⁸⁾ *Pi5(t)* 유전좌위에 존재하는 DNA 표지 8개(*CI454*, *Pi5-2*, *JJI13-T3*, *Pi5-3*, *JJ81-T3*, *Pi5-1*, *S04G03*, *17I18-12*)를 선택하여 실험에 사용하였다(Fig. 2i).

각 DNA 표지를 이용한 Southern 혼성화 반응의 결과, 모든 지역에서 DNA 결손, 재배치(rearrangement), 중복(duplication) 등의 발생이 관찰되어 *Pi5(t)* 유전좌위 내에서 DNA의 구조에 심한 변화가 발생하였음을 알 수 있었다(Fig. 2a-h). *CI454*, *Pi5-2*, *Pi5-1*, *S04G03*, *17I18-2*를 이용한 혼성화 반응을 통하여 이들 지역에서는 야생형 *RIL260*과 돌연변이 *M5465*에서 DNA 다형성(polymorphism)을 볼 수 있었다. 흥미롭게도 *Pi5(t)* 유전좌위의 중앙 부위에 존재하는 *JJI13-T3*, *Pi5-3*, *JJ81-T3*의 3개의 분자표지들은 모두 돌연변이 *M5465*에서는 밴드를 보이지 않았으며, 야생형 *RIL260*에서만 밴드가 관찰되었다. 결국 *M5465*는 *Pi5(t)* 유전좌위에 돌연변이가 발생하여 저항성이 현저히 감소된 돌연변이 라인인 것으로 확인되었다. 또한 본 연구를 통하여 DEB 처리에 의해서 약 50 kb 이상의 DNA 결손이 일어날 수 있음을 발견하였다.

고 찰

벼 유전체의 전체 염기서열 분석이 완료되어 대략 3~5만 개의 유전자가 존재하는 것으로 분석된다.³⁾ 일반적으로 식물병원균의 공격 시에 약 20%에 해당되는 유전자에서 발현이 변화되는 것으로 확인되었다.²²⁾ 따라서 병원균의 공격시에 대략 6,000~10,000개의 식물 유전자가 발현의 변화를 일으키며, 궁극

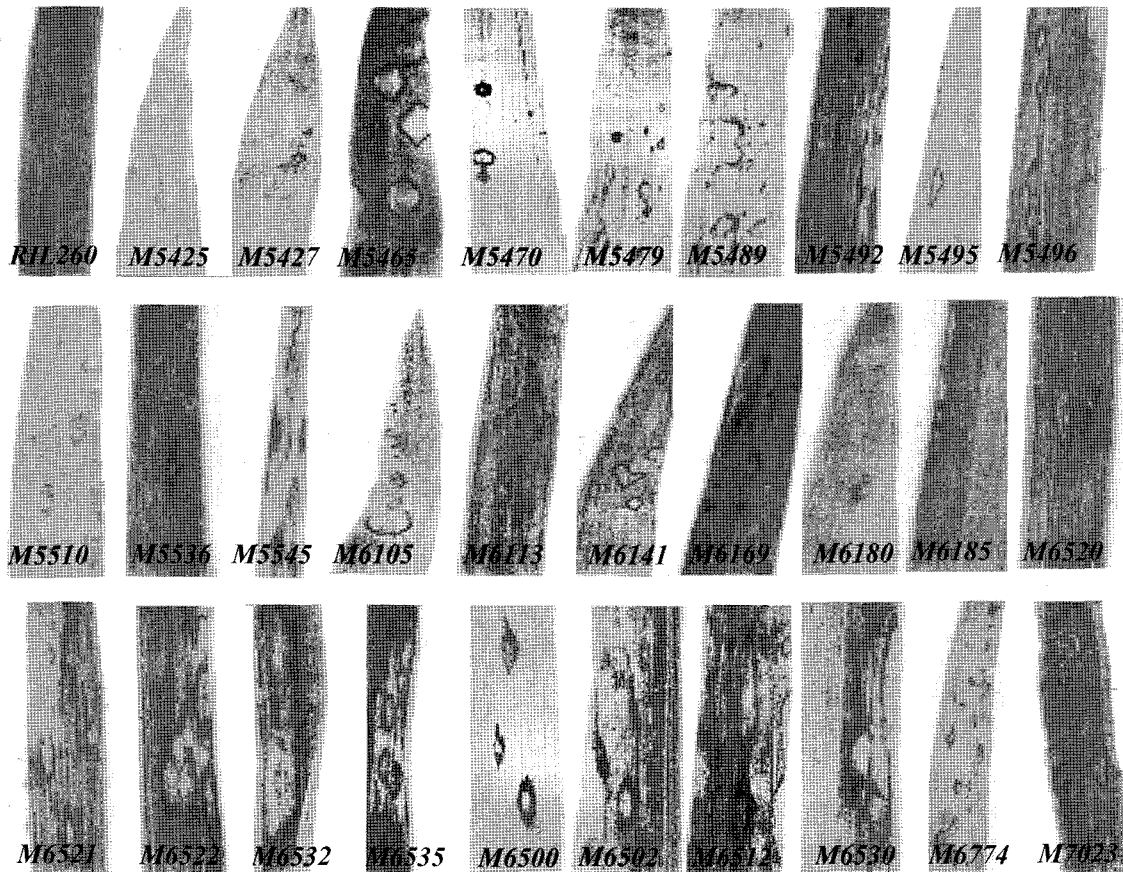


Fig 1. Rice mutants exhibiting enhanced susceptibility to the *M. grisea* PO6-6. RIL260, wild type; twenty-nine susceptible plants (M5425 to M7023), *Pi5* suppressors. Two mutant lines, M5465 and M7023, were the most susceptible to the rice blast isolate PO6-6.

적으로 식물병원균에 대한 저항성을 조절하게 된다. 현재 활발하게 진행되고 있는 microarray를 이용한 유전자 발현 분석을 통하여 상당한 수의 방어와 관련된 후보 유전자를 발견하고 있다.

다양한 병원균에 대한 지속적이며 광범위한 저항성을 갖는 식물체를 개발하기 위하여 병 저항성에 관련된 다수의 유전자에 대한 기능 분석이 먼저 요구된다. 궁극적으로 각각의 유전자에 대한 기능 분석에서 가장 직접적인 해답을 줄 수 있는 방법은 돌연변이를 분리하여 표현형의 변화를 분석하는 것이다. 이와 같은 방법의 역유전학적 연구에는 잘 확립된 돌연변이 집단이 요구된다. 본 연구에서는 병 저항성이 매우 강한 RIL260 품종을 사용함으로써 병 저항성에 관련된 유전자의 기능 분석에 적합한 돌연변이 집단을 확립하고자 하였으며, 돌연변이 빈도를 확인하기 위하여 백변종 표현형과 병 저항성 표현형의 변화를 조사하였다. 그 결과 백변종 식물체의 출현 빈도는 6.7% (148/2219), 이병성 돌연변이의 출현 빈도는 1.3%(29/2219)인 것으로 나타났다. 이러한 비율은 기존의 보고된 돌연변이 집단에서 발견되는 돌연변이 빈도(예, 애기장대 T-DNA 돌연변이 집단에서 백변종 출현빈도는 1.2%임) 보다 높은 것으로 나타나, DEB가 효과적인 돌연변이 유발물질로서 사용될 수 있음이 입증되었다.

본 연구에서 분리된 돌연변이 라인 M5465의 분석 결과, 도열병 저항성의 완전한 소실은 *M. grisea*에서 분비되는 신호물질인 리간드(ligand; *avrPi5(t)*)를 인지하는 것으로 추정되는

Pi5(t) 수용체(receptor) 자체에서의 결손이나 변이 때문인 것으로 나타났다. 우리는 최근에 병 저항성의 완전한 소실을 보인 또 다른 라인 M7023에서도 *Pi5(t)* 유전좌위에서 변이가 발생하였음을 확인하였다(H.-Y. Kim and J.-S. Jeon, unpublished). 대조적으로 도열병 저항성이 부분적으로 손상된 돌연변이 라인들은 *Pi5(t)* 유전좌위에서 어떠한 변이, 결손, 재배열 등도 검출되지 않았다. 결국, *M. grisea* PO6-6에 대한 RIL260의 저항성 유지에는 *Pi5(t)* 수용체의 존재가 필수적임을 보였다. 또한 상당히 많은 수(27)의 부분적인 저항성 손실 돌연변이가 확보되었다는 사실은 *Pi5(t)*와 *avrPi5(t)*의 결합으로부터 발생하는 저항성 신호전달에 다수의 유전자와 상당히 다양한 경로가 관여함을 암시하는 것으로 이해된다. 왜냐하면 부분적인 저항성 손실은 식물 병 저항성을 유지하기 위해 필요한 유전자가 상당히 많거나 혹은 다양한 통로가 있다는 것을 의미할 가능성이 높기 때문이다.²³⁾ 현재 확보된 저항성 돌연변이 라인들은 RIL260에서 도열병 저항성의 신호 전달 과정을 이해하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

초 록

도열병은 곰팡이 균(*Magnaporthe grisea*)에 의해 발생하는 것으로, 벼 수확량에 가장 큰 손실을 일으킨다. 본 연구에서는 벼 도열병 저항성 신호전달 체계에 관여하는 유전자를 분리하기

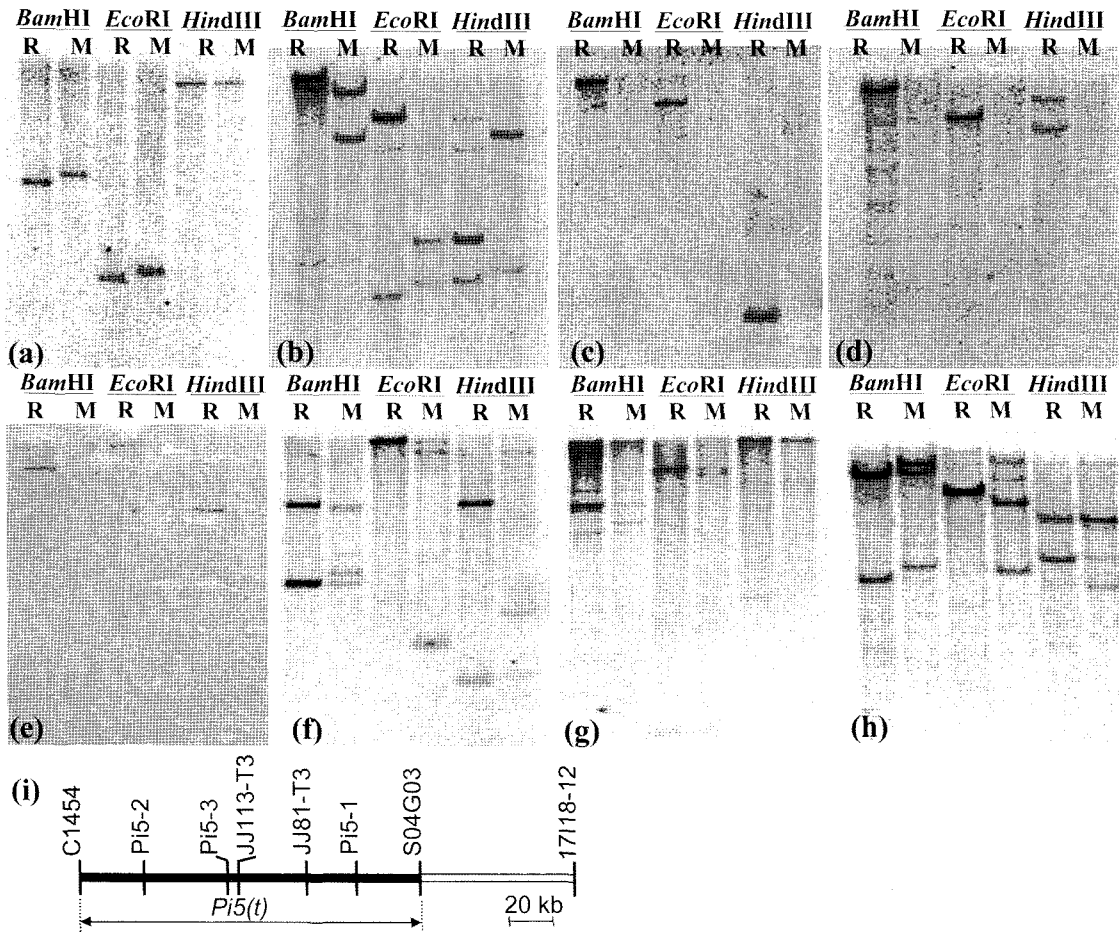


Fig. 2. Southern blot analysis of the wild-type *RIL260* (R) and the highly susceptible mutant line *M5465* (M). The location of used probes is shown in (i). DNA blots were hybridized with the following probes: (a) *C1454*, (b) *Pi5-2*, (c) *JJ113-T3*, (d) *Pi5-3*, (e) *JJ81-T3*, (f) *Pi5-1*, (g) *S04G03*, and (h) *17118-12*.

위하여 DEB(1, 3-Butadiene diepoxide) 처리를 통하여 벼 도열병 저항성 품종인 *RIL260*의 돌연변이 2,000여 종을 생산하고, 이들로부터 병 저항성 변이 개체를 조사하였다. 돌연변이 집단에서 백변종 돌연변이의 비율은 6.7%로 매우 높았으며, 이것은 DEB 처리에 의해서 생산된 집단 내에 돌연변이가 높은 빈도로 발생하였음을 보여준다. 돌연변이 집단의 병 저항성 분석을 통하여 완전히 혹은 부분적으로 벼 도열병에 저항성을 상실한 29개의 돌연변이체를 분리하였다. 이들 중에서 가장 심한 이병성 라인으로 확인된 *M5465*는 DNA 혼성화 반응 분석을 사용하여 분석하였으며, *RIL260* 품종에서 도열병 병 저항성과 밀접한 관련을 갖고 있는 것으로 보고된 *Pi5(t)* 유전좌위의 DNA 표지들이 실험에 사용되었다. 이 결과들은 *M5465*에서 *Pi5(t)* 유전좌위 내부에 DNA의 큰 결손 및 재배열이 있었음을 보여준다. 분리된 병 저항성 돌연변이 라인들은 *Pi5(t)*에 의해 매개된 도열병 저항성의 신호 전달 과정을 이해하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 2003학년도 경희대학교 지원(KHU-20030206)에 의해 수행된 연구의 결과물이므로 이에 감사드립니다. 본 논문의

국문 교정을 해주신 김정남 교수(경희대 한국어학과)께 감사드립니다.

참고문헌

- Bonman, J. M. and Mackill, D. J. (1988) Durable resistance to rice blast. *Oryza* **25**, 103-110.
- Bonman, J. M., Vergel de Dios, T.I. and Khin, M. M. (1986) Physiological specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Disease* **70**, 767-769.
- International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.
- An, G., Jeong, D. H., Jung, K. H. and Lee, S. (2005) Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol Biol.* **59**, 111-123.
- Jeon, J.-S. and An, G. (2001) Gene tagging in rice: a high throughput system for functional genomics. *Plant Sci.* **161**, 211-219.
- Jeong, D. H., An, S., Kang, H. G., Moon, S., Han, J., Park, S., Lee, H. S., An, K. and An, G. (2002). T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol.* **130**, 1636-1644.
- Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S.,

- Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K. and Hirochika, H. (2003) Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* **15**, 1771-1780.
8. Izawa, T., Ohnishi, T., Nakano, T., Ishida, N., Enoki, H., Hashimoto, H., Itoh, K., Terada, R., Wu, C., Miyazaki, C., Endo, T., Iida, S. and Shimamoto, K. (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol Biol.* **35**, 219-229.
9. Jeon, J.-S., Lee, S., Jung, K.-H., Jun, S.-H., Jeong, D. H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M. J., Sung, R. J., Choi, H. S., Yu, J. H., Choi, J. H., Cho, S. Y., Cha, S. S., Kim, S. I. and An, G. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* **22**, 561-570.
10. Li, X., Song, Y., Century, K., Straight, S., Ronald, P., Dong, X., Lassner, M. and Zhang, Y. (2001) A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.* **27**, 235-242.
11. Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G. Till, B. J., Reynolds, S. H., Enns, L. C., Burtner, C., Johnson, J. E., Odden, A. R., Comai, L. and Henikoff, S. (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics.* **164**, 731-740.
12. Lawley, P. D. and Brookes, P. (1967) Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents. *J. Mol. Biol.* **25**, 143-160.
13. Lee, D. H., Kim, T. H., Lee, S. Y., Kim, H. J., Rhee, S. K., Yoon, B., Pfeifer, G. P. and Lee, C.S. (2002) Mutations induced by 1,3-butadiene metabolites, butadiene diolepoxide, and 1,2,3,4-diepoxybutane at the Hprt locus in CHO-K1 cells. *Mol. Cells* **14**, 411-419.
14. Wang, G.-L., Wu, C., Zeng, L., He, C., Baraoidan, M., de Assis Goes da Silva, F., Williams, C. E., Ronald, P. C. and Leung, H. (2004) Isolation and characterization of rice mutants compromised in *Xa21*-mediated resistance to *X. oryzae pv. oryzae*. *Theor. Appl. Genet.* **108**, 379-384.
15. Wang, G.-L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C. and Nelson, R.J. (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar. *Genetics* **136**, 1421-1434.
16. Chen, D.-H., Zeigler, R. S., Leung, H. and Nelson, R. J. (1995) Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. *Phytopathology* **85**, 1011-1020.
17. Jeon, J.-S., Chen, D., Yi, G. H., Wang, G.-L. and Ronald, P.C. (2003) Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 280-289.
18. Yi, G., Lee, S.-K., Hong, Y.-K., Cho, Y.-C., Nam, M.-H., Kim, S.-C., Han, S.-S., Wang, G.-L., Hahn, T.-R., Ronald, P.C. and Jeon, J.-S. (2004) Use of *Pi5(t)* markers in marker-assisted selection to screen for cultivars with resistance to *Magnaporthe grisea*. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 978-985.
19. Chen, D.-H., Zeigler, R. S., Ahn, S.W. and Nelson, R.J. (1996) Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi2(t)*. *Plant Dis.* **80**, 52-56.
20. Jeon, J.-S., Lee, S., Jung, K.-H., Jun, S.-H., Kim, C. and An, G. (2000) Tissue-preferential expression of a rice α -Tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiol.* **123**, 1005-1014.
21. Feldmann, K. A. (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J.* **1**, 71-82.
22. Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F. 3rd and Dangl, J. L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 579-609.
23. Innes, R. W. (1998) Genetic dissection of *R* gene signal transduction pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 229-304.