야생벼 *Oryza minuta*에서 유래한 '수원506호'의 도열병 저항성유전자에 대한 유전분석

정지웅* · 최병주 · 강경호 · 모영준 · 이상복 · 오세관 · 김보경

국립식량과학원 답작과

Genetic Analysis on the Blast Resistance Gene of 'Suweon506' Derived from a Wild Relative, *Oryza minuta*

Ji Ung Jeung*, Byung Joo Choi, Kyung Ho Kang, Young Jun Mo, Sang Bok Lee,
Sea Kwan Oh, and Bo Kyeong Kim

Rice Research Division, NICS, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

Abstract : Rice blast is one of the major threats to stable rice production. In modernized rice breeding system, development of rice cultivars harboring resistance gene is one of the most efficient approaches against blast disease. Wild rice species, to the context, have been recognized as valuable genetic resources in improving resistance or tolerance level of modern commercial rice cultivars against biotic or abiotic stresses. National Institute of Crop Science (NICS), Korea developed an introgression line, 'Suweon 506', which has inherited the rice blast resistance from a BBCC genome wild *Oryza* species, *O. minuta* (Acc. 101141). Genetic analysis was carried out to localize the chromosomal region responsible for the rice blast resistance of 'Suweon 506' by using F₂ progenies from 'Suweon 506' × 'Milyang 23'. Association analysis between marker genotypes and their inferred resistance levels of F₂ progenies against a Korean blast isolate, '93-072' localized the target genetic region on rice chromosome 12. Further association analysis with increased number of DNA markers, and e-Landings on the rice pseudomolecule 6, the segment of 'RM101-S10704-RM1337' was identified to be tightly linked to the rice blast resistance gene from *O. minuta* at the 8.8~11.9 Mbp physical region of rice chromosome 12, where at least 9 rice blast resistance genes have been also identified. The 3.1 Mb equivalent virtual contig, composed with 31 BAC/PAC clones will be further analyzed for fine mapping and gene identification.

Keywords : Rice, Introgression line, Rice blast, Resistance, Association analysis

서 언

벼 도열병은 벼의 육묘단계부터 최고분얼기까지 잎을 침해하고 출수기 이후에는 이삭목, 이삭가지 뿐만 아니라 벼 알까지 침해하는 등 벼의 수량과 품질에 가장 큰 피해를 주는 병해 중 하나이다(Kim 1994, Shim et al. 2005). 도열병 방제를 위해서 농약의 사용과 경종적 방법 등이 고려될 수 있으나, 저항성 품종을 활용하는 것이 가장 경제적이며 친환경적이다

(Bonman et al. 1994, Kim et al. 2011a).

우리나라는 1992년 이후 자포니카계 양질 벼품종들만이 주로 육성되고 재배되어 품종들의 유전적 변이가 협소한 편이다(Jeung et al. 2005, Kang et al. 2007). 이는 특정 병충해의 대발생과 불량환경 등에 효과적으로 대응할 수 있는 유용한 대립인자(allele)를 확보하는데 큰 제한요인으로 작용하고 있다(Jena et al. 2006, Jeung et al. 2006, Noh et al. 2003). 이러한 여건을 극복하기 위해 근래 국내외에서는 야생벼의 내병충성과 내재해성 등에 관여하는 유용 유전인자들을 재배벼로 도입하려는 연구들이 지속되어왔다(Brar & Khush 1997, Kang et al. 2007, Kim et al. 2011b, Rahman et al. 2007). 우리나라에서는 화성벼(AA 계통)와 야생벼 *O. minuta*간의

*Corresponding author (E-mail: jrnj@korea.kr, Tel: +82-31-290-6728, Fax: +82-31-290-6730)

(Received on October 21, 2013. Revised on February 18, 2014.
Accepted on February 25, 2014.)

종간교잡 후대들로부터 바이러스저항성을 지닌 ‘수원487호’, 흰잎마름병저항성을 지닌 ‘수원497호’ 및 흰잎마름병과 도열병에 저항성을 발현하는 ‘수원506호’ 등의 우량계통이 육성된 바 있다(Jeung et al. 2011a, 2011b). 또한 최근에는 아프리카 육도인 ‘모로베라칸’으로부터 도열병 저항성 유전자인 *Pi45*가 이전된 ‘화원4호’가 육성되었다(Kim et al. 2011b).

야생벼로부터 이입된 유용 유전자위를 구체적으로 파악하고 이를 표지 할 수 있는 분자마커를 확보하는 일련의 과정은 유망계통확립에 많은 시간과 노력이 요구되는 벼 종간교잡육종의 효율을 결정짓는 중요한 요소이다(Jeung et al. 2011a). 벼 유전체학의 발전은 재배벼로 이입된 야생벼의 저항성유전자들의 염색체상 위치와 유전기작을 파악하는데 분자마커의 활용성을 크게 제고시켰다(Huang et al. 2008, Jeung et al. 2007, Kim et al. 2011a, Rahman et al. 2007, Sallaud et al. 2003, Yang et al. 2009). 본 연구는 화성벼와 야생벼 *O. minuta*간의 종간교잡 후대인 ‘수원506호’의 도열병 저항성에 대한 유전분석을 수행함으로써, 야생벼에서 유래한 도열병 저항성 유전자의 유전양상을 구명하고, 유전자위를 표지 할 수 있는 분자마커를 확보하여 국내 자포니카 벼 품종의 도열병 저항성 증진을 위한 육종모재로 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 DNA 추출

야생벼인 *O. minuta* (BBCC; Acc. 101141)와 국내육성 벼 품종간 종간교잡 후대계통으로 다년간의 발뚱자리 도열병 검정에서 저항성으로 평가된 ‘수원509호’(Jeung et al. 2011b, Kang et al. 2007)와 반복친인으로 사용된 ‘화성’ 그리고 대비 품종으로 ‘진부’, ‘남일’, ‘일품’, ‘주남’, ‘밀양23호’ 등을 공시하여 국내수집 도열병 균주들에 대한 저항성 정도를 검토하였다(Table 1). 도열병 저항성 유전자에 대한 유전분석을 위해서는 ‘수원506호’와 통일계인 ‘밀양23호’ 간의 교잡후대를 사용하였다. 작성된 F₁ 종자의 자가수정을 통해 140개의 F₂ 식물체들을 육성하였다. F₂ 식물체와 모본, 부분으로부터 변형된 CTAB 방법(Murray & Thompson 1980)으로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며, NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 정량 후 5 ng/ul로 희석하여 PCR에 이용하였다. 도열병 저항성 유전분석을 위한 표현형 자료의 확보는 각 F₂ 개체들로부터 수확된 종자들(F_{2:3}

seeds)을 이용하였다. 140개 F₂ 개체들 중 임성이 매우 낮은 15개를 제외하고 총 125개 개체들로부터 F_{2:3} 종자를 확보하였다.

도열병 균주 선정 및 공시재료에 대한 친화성 판정

국내수집 도열병 균주들 중 반복친인 ‘화성’에 매우 높은 친화성을 발현하는 6개 균주를 선정하여, 공시재료들의 도열병 저항성 정도를 평가하였다(Table 1). 도열병 균주의 접종 및 발병유도는 Kim et al. (2004)의 방법을 따랐다. 공시재료를 파종 후 3~4엽기까지 온실에서 육묘한 후, 포자농도가 1.5×10^5 spores/ml 로 조정된 각각의 도열병 균주를 분무접종하고, 26°C 압조건의 습윤상에서 24시간 처리한 후 온실로 옮겨 10일간 발병을 유도하였다. 공시재료들의 도열병 저항성 정도는 발병 정도에 따라 0~5의 단계로 판정하였는데(0: 병반 없음, 1: 0.5 mm 이하의 갈색반점, 2: 1 mm 이하의 원형반점, 3: 1.5 mm 이하의 진갈색 병반, 4: 2 mm 이하의 병반 중심부로부터 고사, 5: 2mm 이상의 병반 및 고사), 0~1은 저항성, 2~3은 중도 저항성 및 4~5는 감수성 등으로 접종된 도열병 균주에 대한 저항성과 감수성 정도를 구분하였다(Kim et al. 2011a).

도열병 저항성에 대한 유전분석은 ‘화성’과 ‘밀양23호’에 친화성이며 ‘수원506호’에는 비친화성인 도열병 균주 ‘93-072’를 사용하였다. ‘수원506호’ × ‘밀양23호’ F₂ 집단 내에서 도열병 저항성 유전자의 분리양상을 평가하기 위해 각 F₂개체로부터 세대 진전된 F_{2:3} 계통의 저항성 수준을 평가하였다. 계통 별로 임의로 선택된 20~30개 종자를 파종하고 3엽기에 다다른 유묘에 도열병 균주 ‘93-072’를 분무접종하였다. 계통 내 모든 식물체들의 병반응 정도는 접종 후 1주일 경에 개체별로 조사한 후, 그 평균값을 취하여 각 계통에 대응하는 F₂ 개체의 도열병 저항성 표현형으로 사용하였다(Jeung et al. 2007).

분리후대집단을 이용한 연관지도 작성

근래 개발되어 보고된 정보를 참조하여(McCouch et al. 2002) ‘수원506호’와 ‘밀양23호’간에 다형성을 보이며 벼 염색체상에 균등배치된 SSR 마커들을 선정하였다. 이를 위해 각 SSR 마커에 의해 표지되는 벼 유전체정보(Rice Pseudomolecules Release 6; <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)에 대응하는 물리적 위치를 e-Landing (Jeung et al. 2007) 기법으로 파악하였다. 확인된 물리적 위치에 대응하는 BAC 혹은

PAC 클론들은 ‘Rice Genome Annotation Project’ (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)에서 제공하는 ‘Rice Pseudomolecule Information and Gene Search’를 통해 확인하였다. 각 BAC 혹은 PAC 클론들에 대응하는 벼 연관지도상의 위치(cM)는 ‘IRGSP Build5 Pseudomolecules’ (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build5/build5.html>)의 정보에 의거하여 판정하였다.

최초 51개의 SSR 마커들에 대해 F₂ 식물체들의 유전자형을 조사하여 연관지도 초안(linkage map skeleton)을 작성하였다. 차후 각 개체의 유전자형과 도열병 저항성(표현형)간의 연관성분석(association analysis)을 통해 확인된 목표유전자 위에 대한 분자마커의 밀도를 올리기 위해 염색체 12번에 대응하는 3개 SSR (RM3747, RM3472, RM1337) 마커와 1개 STS 마커(S10704; Forward: 5’-cctccgtgatggcgctc-3’, Reverse: 5’-acgataacaaactgggaaca-3’)를 추가로 분석하였다(Table 3,

Fig. 3). 각 마커들에 대하여 F₂ 식물체들로부터 조사된 유전자형의 분리비가 기대치에 부합하는지 평가하기 위하여 적합성검정(χ^2 test)을 실시하였다.

PCR은 10 ng의 DNA와 5 pmol의 forward 및 reverse 프라이머, 0.2 mM dNTP mix, 1X PCR buffer[50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂] 및 1 unit의 Taq polymerase (Nurotics, Korea)를 이용하여 총 부피 20 ul로 실시하였다. PTC-100[®] thermocycler (Waltham, USA)를 사용하여, 95℃에서 3분간 초기 변성 후 95℃에서 20초, 55℃에서 30초, 72℃에서 60초로 총 35회 반복하고, 72℃에서 5분간 반응하였다. PCR 산물은 Sequencing gel[5% polyacrylamide (19:1, acrylamide:bis- acrylamide), 6 M Urea, 1X TBE, 80 W]을 이용하여 전기영동 한 후 Silver Sequence[™] (Promega, USA)로 염색하여 유전자형을

Fig. 1. Reaction patterns of the ‘Suweon506’ to virulent Korean rice blast isolates, which are highly compatible to the recurrent parent, ‘Hwaseong’, and a good quality japonica rice cultivar, ‘Ilpum’.

Table 1. Reactions of rice lines to selected Korean virulent blast isolates.

Lines ^z	Rice blast isolate (race) ^y					
	90-008 (KI1113)	93-072 (KJ103)	93-093 (KI197)	93-456 (KI409)	02-319 (KJ105)	03-177 (KJ105)
‘Suweon506’	4	0	3	0	5	0
‘Hwaseong’	5	5	5	5	5	5
‘Jinbu’	2	5	4	0	0	4
‘Namil’	4	4	4	1	5	5
‘Ilpum’	5	5	5	4	5	5
‘Junam’	5	0	5	1	5	5
‘Milyang23’	3	4	3	2	3	2

^z‘Suweon506’ is an introgression line of a wild rice *O. minuta* (BBCC genome, Acc. 101141) into a Korean Japonica rice cultivar, ‘Hwaseong’.

^yRice blast isolates were collected from Korean farmers’ fields, and tested on rice lines due to their high compatibility to ‘Hwaseong’, the recurrent parent of ‘Suweon506’.

판정하였다. 단, STS 마커 S10704의 경우, PCR 산물을 제한 효소 *Hinf* I (New England Biolabs, USA)로 절단한 후 Agarose gel (1% Agarose, 1X TBE, 200 V)로 전기영동 하고 ethidium bromide로 염색하였다.

도열병 저항성 유전자위 표지를 위한 유전통계분석

야생벼에서 유래한 도열병 저항성 관련 유전자위의 벼 염색체상 위치를 파악하기 위해 ‘수원506호’와 ‘밀양23호’의 F₂ 개체들로부터 확보된 마커 유전자형과 도열병 균주 ‘93-072’에 대한 F_{2:3} 계통들의 저항성 간의 연관성을 평가하였다 (association analysis). SAS 프로그램(SAS Institute 2000)의 PROC MEANS를 이용하여 기술통계량을 산출하였고, PROC GLM을 이용하여 각 SSR 마커들에 의해 표지되는 유전자좌가 도열병 저항성에 관여되는 정도를 판정하였다. 각 유전자좌에 대한 *F* 분석 결과 *P*값이 0.05보다 작으면 유의하다고 판정하고, F₂분리집단에서 관찰된 전체 도열병저항성 분산에 대한 해당 유전자좌의 기여도(*R*² value; %)와 유전적 작용가 (additive effect) 및 기작양상(degree of dominance) 등을 추정하였다(Jeung et al. 2007).

결과 및 고찰

수원506호의 도열병 저항성평가 및 검정 균주선정

‘수원509호’ 등 6개 품종에 대해 6개 도열병 균주를 접종하여 이병반응을 검정한 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다. ‘화성’과 ‘일품’은 접종된 6개 균주 모두에 이병성 반응을 보였고, 그 외 4개 품종들은 서로 다른 이병성 반응을 보였다. 특히 공시된 6개 균주 모두에 감수성인 ‘화성’에 비해 ‘수원506호’는 3개 균주(93-072, 93-456, 03-177)에 저항성을 발현하므로 야생벼 *O. minuta*의 도열병 저항성 유전인자가 ‘화성’에 이전되었음을 재차 확인할 수 있었다. 도열병 저항성 유전자 연관분석(Jeung et al. 2007) 및 벼 품종 육성계보도 추정연구(Cho et al. 2007) 등의 선행연구를 통해 ‘화성’은 *Pia*, ‘진부’는 *Piz*, *Pita*, *Pik* 및 *Pi9(t)*, ‘일품’은 *Pib* 및 *Pii*, ‘주남’은 *Pib*, ‘밀양23호’는 *Pib*, *Pita* 및 *Pik-p* 등의 도열병 저항성 유전자를 보유하는 것으로 밝혀진 바 있다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 ‘수원506호’는 비교 품종들이 보유하고 있는 저항성 유전자들과는 다른 유전자의 작용에 의해 도열병 저항성이 발현되는 것으로 판단되어 이에 대한 유전분석을 수행하고자 하였다.

‘수원506호’는 불입, 탈립성 등 중간교잡 후대에서 흔히 관찰되는 열악한 형질 발현(Barar & Khush 1997)을 극복하기 위해 여교잡으로 육성된 ‘화성’의 근동질 계통이다(Kang et al. 2007, Jeung et al. 2011b). 그러므로 자포니카 벼 품종에 대해 분자마커의 다형성(polymorphism) 확보가 용이한 ‘밀양23호(통일계)’를 F₂ 유전분석 집단의 부분으로 선정하였다. ‘수원506호’의 도열병 저항성이 분리하는 교잡후대에서 변별력 높은 표현형결과(도열병 저항성)를 확보하기 위해 ‘수원506호’는 침해하지 못하면서 반복친인 ‘화성’과 부분인 ‘밀양23호’에 동시에 친화성인 도열병 균주 ‘93-072’를 유전분석에 이용하였다.

‘수원506호’ x ‘밀양23호’ 후대 F₂ 집단을 이용한 연관지도 작성

‘수원506호’ x ‘밀양23호’의 교배립에서 유래한 F₁ 식물체의 자가수정을 통해 F₂ 종자를 확보하고 총 140개의 F₂ 식물체로 구성된 유전분석 집단을 구축하였다. 각 F₂ 개체에서 DNA를 추출하여 분자마커를 이용한 연관지도를 작성하였다 (Table 2). 연관지도 작성에서는 처음부터 전 염색체에 고밀도의 분자마커를 배치하는 대신, 각 염색체 마다 최소한의 개수의 SSR 마커를 균등하게 배치하여 ‘연관지도 초안(linkage map skeleton)’을 작성하였다. 일차적으로 연관지도 초안에 포함된 각 분자마커의 유전자형과 표현형(도열병 저항성) 간의 연관성분석을 수행하여, 유의성이 높은 염색체 부위에만 선택적으로 분자마커의 배치밀도를 높여주는 전략을 취하였다(Jeung et al. 2011a, 2011b; Table 3). 염색체별 분자마커 배치에는 Jeung et al. (2007)이 제시한 ‘*e*-Landing’ 기법을 활용하여 각 분자마커에 대응하는 벼 유전체정보를 파악하고 ‘mirror-map’을 구축함으로써 연관지도 작성에 요구되는 부가적인 유전통계분석 절차를 생략하였다(Table 2).

‘수원506호’와 ‘밀양23호’ 간에 다형성을 보이며, 각 염색체상에 균등하게 위치한 총 51개의 SSR 마커를 이용하여 연관지도 초안을 작성하였다(Table 2). 유전자형의 분리비를 검정한 결과, 염색체 3번과 6번의 상단부위와 염색체 12번 전반에서 분리비 이상(segregation distortion)이 매우 유의하게 관찰되었다(Table 2). 염색체 12번에서는 ‘수원506호’의 유전자형에 비해 ‘밀양23호’의 유전자형의 빈도가 매우 높게 관찰되었는데, 이러한 분리비 이상은 RM3747, RM3472, S10704 및 RM1337 등 4개 마커의 추가분석에서도 동일한 경향이었다(Table 2, Table 3).

Table 2. List of DNA markers, their *e*-Landing mediated physical positions on rice Pseudomolecule6, corresponding BCA/PAC clones with their determined cM positions, and the segregation test (χ^2 test) results on the F₂ progenies derived from the cross between ‘Suweon506’ and ‘Milyang23’.

Marker ^z	Physical information ^y						Mirror map ^x		Segregation test ^w				
	Ch	Start	Stop	<i>e</i> -PCR	<i>e</i> %	BAC/PAC	cM	cM%	A	H	B	M	χ^2
RM3252	1	299,681	299,852	172	0.7	AP002818	0.3	0.7	34	66	40	0	0.76
RM600	1	9,461,346	9,461,566	221	21.7	AP001081	49.6	21.7	36	56	48	0	7.08*
RM449	1	15,305,619	15,305,758	140	35.1	AP008247	72.8	35.1	35	61	44	0	3.10
RM1349	1	25,398,082	25,398,300	219	58.3	AP002744	103.1	57.9	30	59	51	0	9.02*
RM1003	1	33,803,800	33,803,927	128	77.5	AP003345	136.6	77.5	29	75	36	0	1.16
RM6321	1	43,251,019	43,251,186	168	99.2	AP003277	181.8	99.2	37	72	31	0	0.45
RM154	2	1,083,895	1,084,077	183	3.0	AP005851	4.7	2.2	26	67	47	0	5.93
RM5699	2	8,981,409	8,981,575	167	25.0	AP005803	42.1	25.0	30	72	38	0	0.79
RM1211	2	18,450,427	18,450,588	162	51.4	AP005299	59.5	51.4	29	74	37	0	1.10
RM3850	2	35,425,798	35,425,907	110	98.6	AP003989	110.9	98.6	35	75	30	0	0.88
RM7	3	9,808,540	9,808,710	171	27.0	AC134232	44.4	27.0	15	59	66	0	39.02***
RM1164	3	14,840,558	14,840,757	200	40.8	AC084766	68.7	40.8	19	77	44	0	9.53**
RM1350	3	28,632,514	28,632,682	169	78.8	AC087181	126.8	78.8	28	74	38	0	1.56
RM3585	3	36,080,616	36,080,784	169	99.3	AC128647	161.7	99.3	21	82	37	0	7.16*
RM551	4	168,620	168,811	192	0.5	AL606442	3.1	0.5	38	73	29	0	1.13
RM5633	4	13,059,370	13,059,580	211	37.1	AL731595	19.9	37.1	34	73	33	0	0.16
RM3524	4	22,674,720	22,674,847	128	64.3	AL606636	68.3	64.3	30	73	37	0	0.73
RM349	4	32,465,508	32,465,652	145	92.1	AL606455	111.3	92.1	24	70	44	2	5.25
RM559	4	35,117,645	35,117,804	160	99.6	AL606637	129.6	99.6	32	76	32	0	0.79
RM5693	5	441,872	442,071	200	1.5	AC129716	4.6	1.5	37	67	36	0	0.16
RM5558	5	21,168,727	21,168,899	173	70.9	AC105769	86.0	70.9	46	64	30	0	4.16
RM1054	5	29,144,035	29,144,184	150	97.6	AC098598	122.0	97.6	31	77	32	0	1.13
RM3353	6	435,582	435,697	116	1.4	AP001129	1.4	1.4	21	77	42	0	7.02*
RM276	6	6,230,046	6,230,169	124	19.9	AP003488	33.5	19.9	17	83	40	0	11.56***
RM6818	6	16,581,413	16,581,542	130	53.1	AP004012	65.8	53.1	30	76	34	0	1.02
RM3628	6	23,737,032	23,737,157	126	76.0	AP003612	85.4	76.0	25	88	27	0	8.56*
RM5753	6	30,966,850	30,967,050	201	99.1	AP004685	124.4	99.1	34	78	28	0	2.02
RM1093	7	668,161	668,310	150	2.3	AP003746	2.5	2.3	36	72	32	0	0.22
RM1377	7	12,782,829	12,783,009	181	43.1	AP004305	49.7	43.1	35	71	34	0	0.02
RM3743	7	19,342,334	19,342,513	180	65.2	AP003815	67.0	65.2	37	74	29	0	1.10
RM172	7	29,560,592	29,560,750	159	99.6	AP005199	118.6	99.6	45	70	25	0	5.16
RM408	8	119,935	120,063	129	0.4	AP005406	0.5	0.4	33	64	43	0	2.10
RM547	8	5,586,058	5,586,291	234	19.7	AP004746	40.2	19.7	37	73	25	5	2.61
RM3262	8	22,248,334	22,248,500	167	78.6	AP005483	86.7	78.6	34	76	29	1	1.31
RM5545	8	28,141,927	28,142,083	157	99.4	AP004623	121.2	99.4	35	68	37	0	0.10
RM316	9	1,074,933	1,075,126	194	4.7	AP005860	0.8	4.5	44	58	38	0	4.13
RM219	9	7,887,585		NA	34.3	AP005912	20.7	34.5	44	60	36	0	3.36
RM566	9	14,704,798	14,705,036	239	63.9	AP005397	50.7	63.9	35	78	27	0	2.42
RM205	9	22,720,646	22,720,801	156	98.7	AP005546	93.5	98.7	29	76	35	0	1.30

Table 2. Continued.

Marker ^z	Physical information ^y						Mirror map ^x		Segregation test ^w				
	Ch	Start	Stop	e-PCR	e %	BAC/PAC	cM	cM%	A	H	B	M	χ^2
RM1375	10	16,386,764	16,386,943	180	71.6	AC025905	42.7	71.6	39	74	27	0	2.13
RM590	10	22,784,993	22,785,130	138	99.6	AC018727	83.8	99.6	35	68	37	0	0.10
RM332	11	2,840,211	2,840,381	171	10.0	AC133217	10.3	10.0	26	77	37	0	2.73
RM536	11	8,968,470	8,968,712	243	31.5	AC138197	49.1	31.5	32	63	45	0	3.36
RM5961	11	19,425,385	19,425,513	129	68.2	AC108223	79.9	68.2	30	75	35	0	0.88
RM144	11	28,246,930	28,247,154	225	99.2	AC134045	116.2	99.2	38	64	38	0	0.79
RM8215	12	1,585,781	1,586,001	221	5.8	BX000498	10.8	9.9	8	65	66	1	47.27***
<u>RM3747</u>	12	2,304,368	2,304,510	143	8.4	AL954364	19.1	17.5	11	61	68	0	46.99***
RM6296	12	3,200,576	3,200,730	155	11.6	AL713906	26.7	24.5	13	79	47	1	18.13***
<u>RM3472</u>	12	3,520,117	3,520,331	215	12.8	AL713902	27.1	24.8	11	63	66	0	42.96***
RM101	12	8,826,829		NA	32.1	AL928776	48.2	44.1	22	65	53	0	13.50***
<u>S10704</u>	12	10,081,374		NA		AL731739	49.3	45.1	23	65	52	0	13.82***
<u>RM1337</u>	12	11,933,319	11,933,500	182	43.4	BX000556	50.5	47.2	22	66	52	0	12.42***
RM277	12	18,290,458		NA	66.5	AL831799	63.3	58.0	15	70	54	1	20.78***
RM1300	12	25,965,369	25,965,533	165	94.4	AL713940	100.2	93.4	10	66	64	0	40.53***
RM17	12	26,954,668	26,954,835	168	98.0	AC027133	107.4	98.4	13	63	64	0	37.02***

^zA total of 55 DNA markers are listed, in which 51 SSR anchor markers were used to construct 'linkage map skeleton', and 4 DNA markers (underlined; RM3747, RM3472, S10704, and RM1337) were included, after conducting initial association analysis, to increase marker density nearby the chromosomal region harboring the blast resistance gene on chromosome 12

^yThe primer sequences were used as queries to localize on the 'Rice Pseudomolecules Release 6' (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_blast.shtml). When both primer sequences were successfully recognized for their physical locations to be annealed, the expected PCR product size (e-PCR: 'Stop'-'Start'+1bp, NA=not available) was used to judge PCR products. If any primer failed for e-Landing, the other primer's location was used to estimate the corresponding point. The determined physical regions followed by e-Landing were used to match corresponding BAC/PAC clones according to the 'Rice Pseudomolecule Information and Gene Search' (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)

^xThe determined cM position for each BAC/PAC clones was directly adopted from the 'IRGSP Build5 Pseudomolecules' (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build5/build5.html>). To compare the cM positions from various mapping populations with different total lengths, the percentage relative genetic positions, 'cM%', was also calculated

^wA and B are homozygous for 'Suwon506' and 'Milyang 23' allele types, respectively, H is for heterozygous progenies at the tested locus, and M indicates the number of plants with missing genotype. Segregation distorted loci are indicated with asterisk; *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$

‘수원506호’ x ‘밀양23호’ 후대 F_{2:3} 계통을 이용한 도열병 저항성 평가

‘수원506호’ x ‘밀양23호’ F₂ 집단에서 도열병 저항성 유전자의 분리양상을 평가하기 위하여 각 F₂ 개체들로부터 수확된 F_{2:3} 종자를 이용하였다. 불임이 심하였던 15개 개체를 제외한 125개 F₂ 개체들로부터 종자가 수확되었다. 각 F_{2:3} 계통 당 20~30개 개체들을 도열병 균주 ‘93-072’로 접종한 후, 개체 별로 평가된 저항성 정도의 평균값을 취하여 각 F_{2:3} 계통에 대응하는 F₂ 개체의 도열병 저항성 표현형으로 사용하였다.

양친인 ‘수원506호’ 및 ‘밀양23호’의 저항성 수준은 각각

0.35와 3.75로 평가되었으며, ‘수원506호’의 반복친 ‘화성’은 4.55로 평가되었다. 이러한 결과로 미루어 도열병 균주 ‘93-072’의 특이성(specificity)이 F_{2:3} 계통평가 과정에서도 잘 발현되었음을 알 수 있었다(Table 1). 125개 F₂ 개체들의 저항성 수준의 분포는 평균 1.67을 중심으로 왼편(저항성)으로 크게 편향된 양상을 보여(skewness=0.63), F₂ 집단에서 도열병 균주 ‘93-072’에 대한 저항성이 소수의 주동유전자에 의해 지배되고 있음을 강하게 시사하였다(Fig. 2).

연관성평가에 의한 도열병 저항성 유전자위 표시

연관지도 초안에 배치된 51개 SSR 마커에 대응하는 F₂ 개

체들의 유전자형과 $F_{2:3}$ 계통검정을 통해 확보된 표현형간의 연관성 평가를 실시하였다(Table 3). 각 SSR 마커에 대해 125개 F_2 개체들을 3개의 유전자형 군집으로 나눈 후(No. of genotypes), 각 군집의 평균(Resistance mean)에 대해 분산분석을 실시하였다(Single-locus ANOVA). 분산분석 결과 F 값이 유의한 경우 해당 유전자좌 근접부위에 표현형 변이에 영향을 끼치는 유전자가 존재하는 것으로 판단하고 R^2 값(전체 표현형 분산이 유전자형에 의해 설명되는 비율)을 제시하고 유전적 작용력(Genetic effect)을 추정하였다.

연관지도 초안에 배치된 총 51개의 SSR 마커들 중 통계적으로 유의한 F 값을 지니는 마커는 6개로 4번, 6번 및 12번 염색체에서 각각 1개, 2개 및 3개가 확인되었다(Table 3, $Ap=1$). 분산분석 결과가 유의한 6개 SSR 마커에 대해 추정된 F 값과 R^2 값에 미루어 도열병 균주 ‘93-072’에 저항성을 발현하는 후보 유전자좌들은 4번 염색체 중단 부위(RM3524), 6번 염색체 중단 부위(RM6818) 및 12번 염색체 중단 부위

(RM101) 등에서 1차적으로 표지 되었다. 이들 유전자좌들에서 추정된 상가적 효과(additive effect)는 ‘수원506호’의 대립인자에 의해 4번 및 12번 염색체에서 각각 0.49 및 0.98씩 저항성이 증가되고, 6번 염색체에서는 ‘밀양23호’의 대립인자에 의해 저항성이 0.56 증가 되었다.

‘수원506호’가 발현하는 도열병 저항성에 관여하는 주동유전자좌가 12번 중단부위에 위치하는 것으로 판단하고 해당부위의 연관지도 밀도를 높이기 위해 RM3747, RM3472, S10704 및 RM1337 등의 분자마커들에 대한 연관성 평가를 추가로 실시하였다(Table 3, $Ap=2$). 분산분석 결과의 F 값 및 R^2 값에 의거하여 ‘수원506호’의 도열병 저항성 관련 유전자는 RM101-S10704-RM1337 분자마커들에 대응하는 2.3 cM 영역 내에 위치하는 것으로 추정되었다. 상기 3개 분자마커들에 대응하는 ‘화성(반복친)’의 유전자형을 ‘수원506호’와 비교한 결과 RM101과 RM1337에서는 동일한 유전자형이(자료 미제시), S10704에서는 이질적인 유전자형이 확인되었다(Fig. 3).

Table 3. Summary of association analysis between the SSR marker genotypes of F_2 progenies and rice blast resistance level of $F_{2:3}$ seedlings derived from ‘Suwon506’ × ‘Milyang 23’.

Locus ^z		Mirror-map ^y			Individuals used for association analysis ^x						Single-locus ANOVA ^w				Genetic effect ^v		
					No. of genotypes (F ₂)			Resistance mean (F _{2:3})									
Marker	Ap	Ch	cM	cM(%)	A	H	B	A	H	B	SSM	SSE	<i>F</i>	<i>R</i> ²	Add	Dom	DeD
RM3524	1	4	68.3	64.3	27	66	32	1.28	1.54	2.26	16.3	177.1	5.6 ^{**}	0.084	0.49	-0.23	-0.47
RM6818	1	6	65.8	53.1	19	73	33	2.37	1.68	1.25	15.3	178.1	5.2 ^{**}	0.079	-0.56	-0.13	0.24
RM3628	1	6	85.4	76	19	81	25	2.07	1.73	1.16	9.9	183.5	3.3 [*]	0.051	-0.46	0.12	-0.25
RM3747	2	12	19.1	17.5	11	53	61	0.72	1.51	1.98	17.1	176.3	5.9 ^{**}	0.088	0.63	0.16	0.26
RM6296	1	12	26.7	24.5	12	71	41	0.63	1.58	2.16	23.1	168.1	8.3 ^{***}	0.121	0.76	0.19	0.25
RM3472	2	12	27.1	24.8	11	55	59	0.45	1.56	2.00	23.8	169.6	8.5 ^{***}	0.123	0.78	0.33	0.43
RM101	1	12	48.2	44.1	20	58	47	0.55	1.38	2.51	63.2	130.2	29.6 ^{***}	0.327	0.98	-0.15	-0.16
S10704	2	12	49.3	45.1	18	61	46	0.57	1.41	2.45	53.7	139.3	23.5 ^{***}	0.278	0.94	-0.10	-0.10
RM1337	2	12	50.5	47.2	20	59	46	0.53	1.38	2.54	66.0	127.4	31.6 ^{***}	0.341	1.01	-0.16	-0.16
RM277	1	12	63.3	58.0	15	62	48	0.70	1.44	2.26	34.3	159.1	13.1 ^{***}	0.177	0.78	-0.04	-0.05

^zDNA markers were tested on 140 F_2 progenies of ‘Suwon506’ × ‘Milyang 23’. After the first round of association analyses with well defined 51 anchor markers (application: $Ap=1$), additional 4 markers were applied to narrow down the putative location of rice blast resistance gene on chromosome 12 ($Ap=2$). Markers with significant F value were presented on rice chromosomes 4, 6, and 12

^yBoth cM positions and percentage-expressed (cM%) are indicated (see Table 2)

^xAssociation analysis was conducted on 125 fertile F_2 individuals. By using the corresponding $F_{2:3}$ seedlings, mean resistance level, against the blast isolate, ‘93-072’, for each genotype categories revealed by DNA markers. A and B are homozygous for ‘Suwon506’ and ‘Milyang 23’ allele types, respectively, and H indicates heterozygous progenies at the tested locus

^wThe significance levels corresponding to each F -value are indicated with asterisk; *** $P<0.0001$, ** $P<0.01$, and * $P<0.05$

^vAdditive effect (Add), and degree of dominance (DeD) were then estimated at the declared loci: $Add=(Bmean-Amean)/2$ and $DeD=Do/Add$, where A and B are homozygous F_2 individuals for ‘Suwon506’ and ‘Milyang 23’, H is heterozygous individuals at the tested locus, and $Do(dominant\ effect) = Hmean-(Bmean+Amean)/2$

이는 S10704에서 추정된 고도로 유의한 통계량($F = 23.5$, $R^2 = 0.278$)과 함께, 도열병 저항성 유전자를 포함하는 야생벼 *O. minuta*의 염색체 절편이 ‘화성’으로 이입되어 ‘수원506호’가 육성되었다는 객관적인 증거로 생각된다. 그러나 S10704의 상, 하위에 배치된 RM101($F = 29.6$, $R^2 = 0.327$)과 RM1337($F = 31.6$, $R^2 = 0.341$)에서 추정된 더욱 유의한 통계량들은 S10704를 도열병 저항성 유전자가 위치하는 ‘최근접 부위’라는 결론과 상충되었다. 이와 같이 S10704에서 추정된 통계량이 약간 낮아진 것은 ‘RM101-S10704’ 및 ‘S10704-RM1337’ 등 두 영역에서 교차(cross over)에 의해 저항성인 ‘수원506

호’의 유전자형 빈도가 약간 감소했기 때문으로 여겨진다 (Table 3). 반면에 상기 3개 분자마커들에서 각각 추정된 상가적 효과들은 0.94~1.01로 실용적인 차이가 거의 없었다 (Table 3). ‘목표유전자위’에 대한 보다 면밀한 분자생물학적 분석을 위해서는 상기 3개 유전자위가 모두 헤테로인 F_2 개체들이 세대 진전된 규모 있는 ‘추가분리집단’에 대한 유전분석이 필요할 것으로 판단되었다. 현재 6개 $F_{2.3}$ 계통군에서 임의 선정된 1,000 여 개체들에 대한 유전자형 판정과 각 개체에서 수확된 $F_{2.4}$ 종자를 이용한 표현형 평가작업이 진행 중이다.

Fig. 2. Histograms of mean resistance level of $F_{2.3}$ seedlings derived from the 125 fertile F_2 individuals of ‘Suweon506’ × ‘Milyang 23’. The descriptive statistics on the performance of 125 $F_{2.3}$ lines, over-all mean, standard deviation, skewness, and kurtosis are 1.67, 1.25, 0.63, and -0.45, respectively. The resistance levels of the parental lines, ‘Suweon506’ and ‘Milyang23’, and the recurrent parent, ‘Hwaseong’, were also evaluated along with the $F_{2.3}$ lines. The mean resistance levels, based on 20 times observations, of those three lines, are presented in parenthesis.

Fig. 3. Partial gel image showing segregation pattern of a STS marker, S10704 within F_2 progeny lines derived from the cross between ‘Suweon506’ and ‘Milyang23’. The PCR products were cleaved by an endonuclease, *Hinf* I (G^A NTC) to detect latent polymorphism, where the paternal allele type, ‘Milyang23’ cleaved into two fragments. Among F_2 progeny lines, A and B are homozygous for ‘Suweon506’ and ‘Milyang 23’ allele types, respectively, H is for heterozygous progenies at the locus tagged by S10704. M indicates a DNA size ladder, 2-Log(New England Biolabs, USA). Note that the different allele type between ‘Hwaseong’ and ‘Suweon506’ is also strongly suggests the introgression event of the *O. minuta*’s DNA segment nearby the S10704 locus of ‘Hwaseong’.

e-Landing을 이용한 목표유전자위에 대응하는 벼 유전체 탐색

연관지도에 포함된 각 분자마커에 대해 *e*-Landing을 수행한 결과(Table 2, Physical information), 12번 염색체의 RM101-S10704-RM1337에 대응하는 벼 유전체 정보는 8.8~11.9 Mbp 사이로 제한되었다(Fig. 4). 해당 영역은 약 3.1 Mbp 크기로 31개의 BAC 혹은 PAC 클론들로 이루어져 있었다. 12번 염색체 중단에는 *Pi-6(t)*, *Pi12(t)*, *Pi-21(t)*, *Pi31(t)*, *Pi-32(t)*, *Pi-41*, *Pi-157*, *Pita*, *Pi-ta2* 및 *Pi-tq6* 등 적어도 9개의 저항성 유전자들이 위치하는 것으로 보고 되었으나 (Sallaud et al. 2003, Yang et al. 2009), 야생벼 *O. minuta*에서 유래한 도열병 저항성 유전자는 보고된 바 없다. 앞으로 추가분리집단에 대한 유전분석을 통하여 ‘수원506호’의 도열병 저항성 유전자위를 보다 정밀하게 탐색하고 해당부위를 포함하는 BAC 혹은 PAC 클론의 전사부위(open reading frame; ORF) 정보를 활용하여 기존에 보고된 도열병 저항성 유전자들과의 유전적 관련성에 대한 판정이 필요하다.

본 연구에서 재배벼(AA)인 ‘화성’의 12번 염색체 중단 부분에 이입된 야생벼 *O. minuta* (BBCC)의 염색체 단편은 ‘수원506호’에서 확인된 STS 마커 S10704의 이질적 유전자형으로 인해 증명되었다(Fig. 3). 반면에 도열병 저항성 주동유전자위에 대한 연관지도 밀도를 높여주기 위해서 검토되었던 30여 개의 분자마커들과 더불어(자료 미제시), S10704에 근접하는 RM101 및 RM1337 등에서 확인된 ‘수원506호’와 ‘화성’간 동일한 유전자형들은 이입된 *O. minuta*의 염색체 절편과 ‘화성’의 대응영역 간 상당한 수준의 ‘상동성’(highly conserved micro-colinearity)이 유지됨을 강하게 시사하였다. Wang et al. (2005)은 중간교잡을 통해 재배벼로 이입된 야생벼의 염색체 단편의 물리적 위치가 재배벼의 게놈구조에 의해 크게 지배된다고 제시한 바 있다. 이러한 현상은 *O. australiensis* (EE 게놈)로부터 유래한 벼멸구 저항성 유전자 *Bph18* (Jena et al. 2006) 및 도열병 저항성 유전자 *Pi40* (Jeung et al. 2007)과 *O. minuta*에서 유래한 도열병 저항성 유전자 *Pi9* (Liu et al. 2002) 등에서도 확인된 바 있다.

Fig. 4. High density linkage map for the target region on rice chromosome 12, harboring the blast resistant gene originated from a wild relative, *O. minuta*. A. Linkage map skeleton of the chromosome 12. Ten DNA markers (9 SSRs and 1 STS) were used to narrow down the putative location. Markers were applied based on *F*-statistics from single-locus ANOVA results (see Table 3). B. High resolution map for the target region surrounded by DNA markers was determined through *e*-Landings. Based on the primer sequence information of SSR markers, the corresponding 3.1 Mbp virtual contig composed of BAC or PAC clones was determined.

적 요

야생벼는 재배벼의 병해충 저항성과 불량환경 적응성 등을 제고할 수 있는 유용한 유전자원으로 평가되고 있다. 농촌진흥청 국립식량과학원에서 국내육성 자포니카 벼 품종인 ‘화성’과 야생벼 *O. minuta* (BBCC 계통; Acc.=101141)간의 중간교잡을 통하여 흰잎마름병과 도열병에 저항성인 ‘수원506호’를 육성하였으며, 본 계통에 대한 야생벼 유래 도열병 저항성 유전자의 유전자상 구명 및 유전자위 표지에 대한 연구 결과는 다음과 같다.

1. 반복친인 ‘화성’에 높은 친화성을 발현하는 6개 도열병 군주 검정에서 ‘수원506호’는 반복친 ‘화성’과 5개 비교품종들과 다른 저항성 반응을 보여 이들과 다른 야생벼 유래 도열병 저항성 유전자를 보유하는 것으로 판단되었다.
2. 분자마커의 유전자형과 도열병 저항성 간의 연관성평가를 수행한 결과, ‘수원506호’의 도열병 저항성에 관여하는 주동유전자위는 12번염색체 중단의 RM101-S10704-RM1337 좌위에 위치하는 것으로 추정되었다.
3. STS 마커 S10704에서 확인된 ‘화성’과 ‘수원506호’의 이질적인 유전자형은 해당부위에 야생벼 *O. minuta*의 염색체 단편이 이입되었다는 것을 증명하였다.
4. 이 좌위는 적어도 9개의 도열병 저항성 유전자들이 위치하는 것으로 보고된 바 있는데, 추후 정밀분석을 통해 ‘수원506호’의 도열병 저항성 유전자위와 기 보고된 유전자들과의 관계를 분석할 계획이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 PJ00816)의 지원으로 수행된 결과이며, 이에 감사 드립니다.

References

1. Bonman JM, Wang GL, Mackill DJ, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 4: 1421-1434.
2. Brar DS, Khush GS. 1997. Alien introgression in rice. *Plant Mol. Biol.* 35: 35-47.
3. Cho YC, Kwon SW, Choi IS, Lee SK, Jeon JS, Oh MK, Roh JH, Hwang HG, Yang SJ, Kim YG. 2007. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 10: 265-276.
4. Huang CL, Hwang SY, Chiang YC, Lin TP. 2008. Molecular evolution of the *Pi-ta* gene resistant to rice blast in wild rice (*Oryza rufipogon*). *Genetics* 179: 1527-1538.
5. Jena KK, Jeung JU, Lee JH, Choi HC, Brar DS. 2006. High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112: 288-297.
6. Jeung JU, Hwang HG, Moon HP, Jena KK. 2005. Fingerprinting template japonica and tropical indica rice genotypes by comparative analysis of DNA markers. *Euphytica* 146: 239-251.
7. Jeung JU, Heu SG, Shin MS, Vera Cruz CM, Jena KK. 2006. Dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* populations in Korea and their relationship to known bacterial blight resistance genes. *Phytopathology* 96: 867-875.
8. Jeung JU, Kim BR, Cho YC, Han SS, Moo HP, Lee YT, Jena KK. 2007. A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 115: 1163-1177.
9. Jeung JU, Roh TH, Kang KH, Jeong JM, Kim MK, Kim YG. 2011a. Genetic analysis on the bacterial blight resistance of Suweon497, a rice breeding line developed through wide hybridization. *Korean J. Breed. Sci.* 43: 81-91.
10. Jeung JU, Roh TH, Kang KH, Shin YS, Kim YG. 2011b. Genetic analysis on the bacterial blight resistance gene from a wild relative, *Oryza minuta*. *Korean J. Crop Sci.* 56: 124-133.
11. Kang KH, Seo JP, Jeon YH, Jeung JU, Lee YT. 2007. Development of elite lines with disease and insect resistance through wide hybridization in rice. *Treat Crop Res.* 8: 89-104.
12. Kim BR, Roh JH, Choi SH, Ahn SW, Han SS. 2004. Durability of rice cultivars to blast in Korea by sequential planting method. *Korean J. Breed. Sci.* 36: 350-356.
13. Kim CK. 1994. Blast management in high input, high

- yield potential, temperature rice ecosystems, rice blast disease. IRRI and CAB international walling ford UK. pp.451-463.
14. Kim DM, Ju HG, Yang P, Han SS, Roh JH, Ahn SN. 2011a. Mapping and race specific reaction of the resistance gene *Pi45(t)* in rice. Korean J. Breed. Sci. 43: 42-49.
 15. Kim DM, Ju HG, Kang JW, Han SS, Ahn SN. 2011b. A new rice variety 'Hwaweon 4' with durable resistance to rice blast. Korean J. Breed. Sci. 43: 620-624.
 16. Liu G, Lu G, Zeng L, Wang GL. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. Mol. Genet. Genomics. 267: 472-480.
 17. McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9: 257-279.
 18. Murray M, Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acid Res. 8: 4321.
 19. Noh TH, Lee DK, Kang MH, Shin MS, and Na SY. 2003. Identification of new race of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in Korea. Phytopathology 93: S66.
 20. Rahman ML, Chu SH, Choi MS, Qiao YL, Jiang W, Piao R, Khanam S. Cho YI, Jeung JU, Jena KK, Koh HJ. 2007. Identification of QTLs for some agronomic traits in rice using an introgression line from *Oryza minuta*. Mol. Cells 24: 16-26.
 21. Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Notteghem J.-L. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. Theor. Appl. Genet. 106: 794-803.
 22. SAS Institute. 2000. SAS Language and Procedure: Usage, Release & 01. SAS Institute, Cary, NC, USA
 23. Shim HS, Hong SJ, Yeh WH, Han SS, Sung JM. 2005. Damage analysis of rice panicle blast on disease occurrence time and severity. Plant Pathol. J. 21: 87-92.
 24. Yang Q, Lin F, Wang L, Pan Q. 2009. Identification and mapping of *Pi41*, a major gene conferring resistance to rice blast in the *Oryza sativa* subsp. *indica* reference cultivar, 93-11. Theor. Appl. Genet. 118: 1027-1034.
 25. Wang YM, Dong ZY, Zhang ZJ, Lin XY, Shen Y, Zhou D, Liu B. 2005. Extensive de novo genomic variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). Genetics 170: 1945-1956.