

형질전환 제초제저항성 벼 밀양 204호의 농업적 특성

정응기¹, 이기환¹, 원용재², 박향미¹, 전남수¹, 최준호¹, 구연충¹, 한창덕³, 은무영⁴, 김태산⁴, 남민희^{1*}

¹작물과학원 영남농업연구소, ²작물과학원, ³경상대학교, ⁴농업생명공학연구원

Agronomic Characteristics of Transgenic Japonica Rice "Milyang 204" with Herbicide Resistance Gene (*bar*)

Eung-Gi Jeong¹, Gihwan Yi¹, Yong-Jea Won², Hyang-Mi Park¹, Nam-Soo Cheon¹, Jun-Ho Choi¹,
Yeon-Chung Ku¹, Chang-Deok Han³, Mu-Yeong Eun⁴, Tae-Sas Kim⁴, Min-Hee Nam^{1*}

¹Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang 627-803, Korea

²National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

³Division of Applied Life science, Plant Molecular Biology & Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

⁴National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT This study was conducted to investigate the major characteristics of genetically modified rice of "Milyang 204" originated from Dongjinbyeo compared to a non-transgenic rice varieties Dongjinbyeo and Junambyeo. Basta resistant transgenic rice lines carrying *bar* gene produced by the Yeongnam Agricultural Research Institute were evaluated for their agronomic characters. The transgenic Japonica rice of "Milyang 204" showed inferior phenotypic traits compared to a non-transgenic rice variety Dongjinbyeo and Junambyeo. On the basis of UPOV (Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetables) and NSMO (National Seed Management Office) the transgenic "Milyang 204" showed difference in some traits out of some agronomic traits, such as leaf color, angle of flag leaf, number of spikelets, culm length, white core and white belly compared to the non-transgenic varieties rice.

Key words: Basta, GMO, herbicide resistance, rice

서 론

최근 유전자조작기법을 통하여 특정 유전자가 형질전환 된 동·식물이나 미생물이 상업적으로 생산되어 식품으로 제조 유통됨에 따라 소비자들은 유전자변형생물체 (genetically modified organism: GMO)에 의한 환경 위해성이나 제조된 식품에 대한 안전성에 대하여 많은 관심을 가지게 되었다.

유전자 재조합 기술은 Cohan 등 (1973)이 포도상구균의

유전자를 대장균에 도입하는데 성공한 이후 미생물뿐만 아니라 동식물의 품종개량에도 폭 넓게 이용되어, 불과 20년 만인 1994년에는 숙성해도 물러지지 않은 토마토가 최초로 상품화되었고, 현재까지 90종 이상의 작물에서 유전자 재조합 기술을 이용한 형질전환체 생산이 보고되고 있다 (Kim, 2002). 이와 함께 *Agrobacterium* 및 직접적인 유전자 이전기법 (direct gene transfer) 등 각종 형질전환기법이 개발되어 왔으며, 제초제 저항성, 내충성, 내병성, 스트레스 저항성 등 많은 유용 유전자들이 재배종으로의 형질 전환이 추진되고 있다.

제초제 저항성 품종 개발은 잡초를 제어하기 위한 중요한 방법으로서 현재까지 제초제에 저항성인 여러가지 유

*Corresponding author Tel +82-55-1181 Fax +82-55-3059

E-mail: nammhee@rda.go.kr

전자 (*aroA*, *bar*, *bxn*, ALS, EPSP)가 개발되었고, *Salmonella typhimurium* 박테리아에서 분리된 *aroA*를 이용하여 담배 (Comai et al. 1985)와 *Populus* (Fillatti et al. 1987)로부터 *glyphosate*에 저항성인 형질전환체를 획득하였으며, *Streptomyces hygrosopicus*에서 분리된 제초제 phosphinothricin에 저항성인 *bar* 유전자를 이용하여 밀 (Nehra et al. 1994), 땅콩 (Brar et al. 1994), 감자 (Eliseu et al. 1994), 벼 (Datta et al., 1992) 등 많은 작물로부터 형질전환체가 생산되었다.

세계에서 상업적으로 재배되는 제초제저항성 주요작물은 콩, 옥수수, 면화, 유채 등이며, 이들은 전체 형질전환작물 재배면적의 72%를 차지하고 있다 (James, 2004). 그러나 벼의 경우 상업적으로 재배되지 않고 식품이나 환경위해성 평가 중이거나 개발단계로 *bar* 유전자가 이전된 제초제 저항성 벼 Koshihikari와 Gulfmont에 대해 포장검정 시험이 처음으로 보고되었으며 (Oard et al., 1996), 이들은 *glufosinate* 성분에 대해 저항성을 나타내며, Southern blot 및 Northern blot 결과 1개 또는 2-3개의 유전자가 이전되어 Mendel 유전을 하는 것으로 보고되었다. Won 등 (2004)은 *bar* 유전자가 형질전환된 벼를 국내 우량품종과 인공교배하고 약배양을 통하여 품종 조기개발 체계를 보고하였다. 특히 *glufosinate*는 광범위하게 적용되는 비선택적 제초제로서 대부분의 초본류와 잡초류에 광범위하게 이용되며 그 효과가 우수하고 토양에 떨어지면 빠르게 불활성화되어 토양내에 축적되지 않으며 이동성이 낮고 잡초류와 같은 식물체를 제외하고는 어떤 독성도 가지지 않는다 (KCPA, 2002).

Schuh 등 (1993)은 형질전환계통의 세대간 형태적인 차이가 크게 나타나지 않은 것으로 보고하였으나, 지금까지 포장에서 형질전환 작물에 대한 작물학적 특성 변이 및 교잡을 통한 품종육성에 대한 보고는 거의 없다. 국내외적으로 벼 형질전환기술을 통해 기내에서 외래 유전자가 이전된 형질전환체 생산이 본격적으로 이루어지고 있는 단계에 있으며, 이를 통해 형질전환 및 유전자발현 등 기초연구 및 품종육성을 위한 응용연구 등 많은 보고가 이루어져 왔다 (Lam, 1990; Dunwell and Paul, 1990).

바스타는 비선택적 제초제로서 주성분 bialaphos의 주된 물질인 phosphinothricin (PPT)이다. 형질전환에 의해 개발된 제초제 (basta) 저항성 벼 개발은 쌀의 지속적인 안전생산을 위한 양질품종의 육성과 직파재배 확대 등 한 차원 높은 생산비절감 재배기술 개발을 위하여 필연적이다. 따라서 작물과학원 영남농업연구소에서는 형질전환으로 육성한 제초제 저항성 벼 밀양 204호의 주요 농업적특성을 형질전환 모품종인 동진벼와 형질전환체를 인공교배한 주남벼를 대비품종으로 비교 검토하여 형질전환체를 이용한 벼 품종육성의 기초자료를 얻고자 본 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

본 시험은 작물과학원 영남농업연구소에서 형질전환으로 육성한 제초제 (basta) 저항성 벼 밀양 204호와 형질전환 모품종인 동진벼, 형질전환체와 인공교배한 주남벼를 대비품종으로 공시하였다. GM (Genetically Modified) 벼와 Non-GM 벼의 농업적특성은 작물과학원 (수원), 영남농업연구소 (밀양), 호남농업연구소 (익산)의 GMO 격리포장에서 조사하였다.

제초제 저항성 벼의 농업적 특성조사는 시험재료를 각 지역의 표준재배시기에 따라 파종하고 이앙하였으며, 본답 시비량은 질소-인산-加里를 11-4.5-5.7 kg/10a 사용하였다. 시험구배치는 난괴법 3반복으로 하였으며 기타 재배법은 영남농업연구소 표준재배법에 준하였다. 병해충검정이나 농업적 특성조사는 농촌진흥청 시험연구조사기준에 준하여 실시하였다(농진청, 1995).

쌀의 미질특성조사에서 현미모양은 현미길이에 대한 폭의 정도를 실측하였으며 쌀의 심복백 정도는 계급을 1~9까지하여 조사하였다. 아밀로스함량은 Juliano (1971)의 방법에 준해서 실시하였고, 알카리붕괴도는 1.7% KOH 용액에 쌀을 넣고 30°C에서 24시간 경과후 쌀의 퍼짐정도로 1~7까지 계급으로 조사하였다 (Little 등 1958).

결과 및 고찰

1. 육성경위

제초제저항성 벼 품종을 육성하고자 1998년 형질전환이 용이한 동진벼에 바스타저항성 유전자 (*bar*)를 *Agrobacterium* 매개하여 식물체내로 도입시켜 제초제 저항성 형질전환체를 양성하였다. 형질전환에 이용된 *bar*은 영국의 존인네스 연구센터에서 분양받은 것이며 운반체는 pSB-SU12로써 Trap Ds T-DNA 벡터와 동일한 backbone을 가지며 35S 프로모터를 사용하였다.

T₁ 세대에서 polymerase chain reaction (PCR) 분석과 비선택적 제초제인 상업용 basta를 권장농도인 0.3%로 희석하여 유묘에 엽면살포하여 저항성인 개체를 선발하여 1999년 동계에 단간 내도복 양질인 주남벼와 인공교배하였다. 2000년 하계에 F₁을 양성하고, 이들을 PCR 분석을 통하여 제초제 저항성 유전자 *bar* 도입을 확인하였다. 이후 유전적으로 형질을 조기에 고정하고자 약배양을 실시하여 얻어진 1,508 개체의 재분화 식물체를 '00/01 동계온실에서 증식하며 제초제 저항성 유전자가 도입된 169개체 (A₂)에서 채종하였다. 이들을 2001년 하계포장에 공시하여 농업적 형질이 우수한 42계통을 선발하고 미질 등 실내 검정을 통한

Year	'98	'99	'00	'00/'01	'01	'02	
Gen.	Transformation	Cross	F ₁	Anther culture	A ₁	A ₂	A ₃
	Dongjinbyeo <i>bar</i>		□□1	□□1	□□1	□□1	□□1
	□□1		□ :	□ :	□ :	□ :	□ :
	□ :	Junambyeo	□ :	□ :	□ :	□ :	□ :
	□ : →	X → YR23235 →	□ : →	□ : →	□ : →	→ □ :	→ □ :
	□ :	Dongjin <i>bar</i>	□ :	□ :	□ :	□ :	□□7
	□□20		□□23	□ :	□ :	□□42	↓
				□ :	□□169		□□□□□□□□□□
				□□1058			□ Milyang204□
							□□□□□□□□□□
No. of lines	(20)		(23)	169	42	7	

Fig. 1. Pedigree diagram of "Milyang 204" with herbicide resistance gene.

여 7계통을 선발하였다. 이들 계통은 2002년에 생산력 검정을 통하여 수량 등 주요 농업형질이 우수한 YR23235Acp79를 선발하여 "밀양 204호"로 계통명을 부여하였다 (Fig. 1).

2. 출수기

밀양 204호의 보통기 재배시 중·남부 평야지에서 파종 후 출수까지 평균일수는 106일로 대비품종인 동진벼나 주남벼 대비 1일 빨랐으나 3개 지역별로 통계적 유의성은 없었다. 밀양과 수원은 비슷한 경향이고 익산은 주남벼보다 빠르고 동진벼보다 늦었다 (Table 1). 이는 지역환경에 따라 벼의 출수형태가 다르다는 것을 알 수 있다. Oard 등 (1996)은 형질전환계통 T₂ 세대는 원품종에 비해 다양하게 분리한다고 보고하였고, Bashir 등 (2004)은 형질이 고정된 GM 벼와 Non-GM 벼의 포장시험에서 출수기는 모품종 보

다 빨라지는 경향이라고 보고하였다. 본시험에서는 모품종과 밀양 204호의 출수까지의 일수는 비슷했다. 이는 밀양 204호 전체 집단에서는 계통간 출수기 차이를 보이나 밀양 204호 선발시 인공교배 편친인 주남벼를 기준했기 때문으로 판단된다.

3. 잎과 줄기

밀양 204호의 잎은 녹색이고 길이와 너비는 보통이며 직립성이다. 벼키는 68cm로 단간인 주남벼와 비슷하며, 줄기의 굵기는 보통이나 도복에도 강하였다 (Table 2). Bashir 등 (2004)의 보고에 의하면 형질이 고정된 GM 벼은 원품종 (Basmati) 대비하여 간장이나 초형이 다르다고하였다. 본시험에서 밀양 204호는 동진벼보다 간장이 작고 초형도 직립으로 다르지만 인공교배 편친인 주남벼와는 비슷한 특성을 보였다.

Table 1. Days from seeding to heading of "Milyang 204".

Region	Milyang 204	Dongjinbyeo	Junambyeo	Seeding	Transplanting
Suweon	109 a	109 a	110 a	April 25	May 25
Milyang	103 a	105 a	104 a	April 30	May 28
Iksan	107 a	108 a	106 a	April 30	May 28
Mean	106 ± 1.2	107 ± 1.5	107 ± 1.3	-	-

Number with the same letter are not significantly different from each other according to DMRT.

Table 2. Leaf and culm characteristics of "Milyang 204".

Variety	Leaf				Culm		
	Color	Length	Width	Erectness	Length (cm)	Thickness	Lodging
Milyang 204	Green	Medium	Medium	Elect	68 a	Resistance	Resistance
Dongjinbyeo	Green	Medium	Medium	Semi-elect	84 b	Medium	Medium
Junambyeo	Dark green	Medium	Medium	Elect	67 a	Resistance	Resistance

Number with the same letter are not significantly different from each other according to DMRT.

4. 이삭과 벼알

밀양 204호의 이삭길이는 18cm로 주남벼나 동진벼보다 이삭길이는 짧았다. 착립밀도는 주남벼와 같이 조밀한 특성이고 벼알까락 길이는 없거나 매우 짧았다. 벼알 탈립성은 탈립이 잘 되는 동진벼에 비하여 탈립이 잘 안되는 편이었고, 부싯 및 영색은 황백색이었다. 이삭의 추출정도는 추출이 양호한 동진벼와 이삭 추출이 덜되는 주남벼의 중간정도인 보통이었다 (Table 3).

5. 수량관련 특성

밀양 204호는 보통기 재배에서 주당수수는 14개로 주남벼나 동진벼보다 많고 수당립수는 88개로 동진벼 대비 10개, 주남벼 대비 21개가 적었다. 그러나 등숙비율과 정현비율은 큰 차이가 없었으며, 현미의 천립중은 22.4g으로 주남벼보다 가벼운 편이다(Table 4). Bashir 등 (2004)과 Oard 등 (1996)은 형질전환벼와 원품종간의 수량관련요소 특성 조사에서 두 품종간에는 일정한 경향이 없었다고 보고한 바 있다. 본 시험에서도 모품종인 동진벼나 주남벼에 비하여 밀양 204호는 수량관련특성에서 어느 한 품종과 비슷한

경향을 보이지 않았다.

6. 미질특성

밀양 204호의 현미 입형은 동진벼와 비슷한 단원형이고 쌀의 심복백 정도도 동진벼나 주남벼 수준을 나타냈다. 아밀로스 함량이나 알카리붕괴도 등 이화학적 특성 역시 모품종과 비슷하였다 (Table 5). Bashir 등 (2004)은 형질전환벼와 모품종과의 쌀의 이화학적 특성인 아밀로스함량과 알카리붕괴도는 모품종과 비슷하다고 보고하여 본 시험과 유사한 결과였다.

7. 내병충성

잎도열병 발못자리 검정은 밀양과 상주에서 실시하였으며 밀양 204호와 대비품종 모두 잎도열병에는 저항성이 없었다. 그러나 줄무늬잎마름병과 흰잎마름병에는 모품종인 동진벼는 저항성이 없었으나 인공교배 편친인 주남벼는 저항성이었고 제초제저항성인 밀양 204호도 주남벼와 동일하게 저항성 반응을 보였다. 최근 영남지방 일부에서 발병이 빈번한 검은줄오갈병에는 포장에서 중정도의 저항성을 보

Table 3. Panicle and grain characteristics of "Milyang 204".

Variety	Panicle length (cm)	Shattering	Awn	Density of spikelets	Apiculus color	Glume color
Milyang 204	18	Hard	Rare	Crowded	Yellowish white	Yellowish white
Dongjinbyeo	20	Easy	Rare	Intermediate	Yellowish white	Yellowish white
Junambyeo	21	Hard	Rare	Crowded	Yellowish white	Yellowish white

Table 4. Yield components of "Milyang 204".

Variety	No. of panicles / hill	No. of Spikelts / panicle	Ratio of ripened grains (%)	Dehulling recovery (%) (Brown/Rough)	1,000 grain weight (Brown)
Milyang204	14 b	88 a	90.3 a	83.8 a	22.4 a
Dongjinbyeo	11 a	98 ab	92.5 a	83.6 a	25.0 a
Junambyeo	12 a	109 b	89.9 a	83.1 a	23.5 a

Number with the same letter are not significantly different from each other according to DMRT.

Table 5. Grain qualities of "Milyang 204".

Variety	Ratio of length/width	White center/belly (0~9)	Amylose content (%)	Alkali digestion value (0-7)	Palatability of cooked rice
Milyang204	1.74	2/0	20.0	6.5	Good
Dongjinbyeo	1.70	1/0	19.4	6.2	Good
Junambyeo	1.55	1/0	19.2	6.3	Good

Table 6. Reaction to major diseases and insect pests.

Variety	Reaction to leaf blast at nursery test (0-9)		Bacterial blight			Virus disease			Resistance to insects ^b		
	Milyang	Sangju	K ₁	K ₂	K ₃	Stripe	Dwarf	Black-streakeddwarf	BPH	WBPH	SBPH
Milyang204	7	6	R	R	R	R	M	S	S	S	S
Dongjinbyeo	7	7	S	S	S	R	MS	S	S	S	S
Junambyeo	7	7	R	R	R	R	M	S	S	S	S

^b BPH : Brown planthopper, WBPH : White-backed planthopper, SBPH : Small brown planthopper, R : Resistant, MR : Moderately resistant, S : Susceptible

Table 7. Yield performance of local adaptability test of milled rice.

Location	Milyang204 (A)	Dongjinbyeo (B)	Junambyeo (C)	Index	
	----- (t/ha) -----			(A/B)	(A/C)
Suweon	5.90 a	5.10 b	5.89 a	116	100
Iksan	5.04 b	5.11 b	5.54 a	99	91
Milyang	5.71 a	5.41 b	5.69 a	106	100
Mean	5.55	5.21	5.71	107	97

Number with the same letter are not significantly different from each other according to DMR test.

였으며 멸구류에 대한 저항성은 없었다 (Table 6).

8. 수량성

작물과학원 (수원), 영남농업연구소 (밀양), 호남농업연구소 (익산) 시험포장 3개소에서 지역적응성을 검토하기 위하여 밀양 204호를 시험한 결과, 평균 쌀수량이 5.55t/ha로 나타나 동진벼 대비 107%, 주남벼 대비 97%수준을 보였다 (Table 7). 지역별로는 수원과 밀양에서 대비 품종인 동진벼와 주남벼보다는 다소 높았으나 익산에서는 낮은 수준이었다. 또한 대비품종에 비해 간장이 작고 이삭길이가 짧아 개체간 작물생육량이 적은 것으로 보아 적응지역이 다를 것으로 판단된다. Yang 등 (2001)의 보고에서도 지역환경에 따라 품종의 적응성이 다르다고 보고하여 본 시험과 유사한 결과였다. GM 벼와 Non-GM 벼의 농업적 특성에 대한 조사는 앞으로 형질전환벼 품종육성에 기초자료가 될 것으로 판단되며 좀더 다양한 지역과 환경에서의 검토가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

밀양 204호는 작물과학원 영남농업연구소 생명공학연구팀이 직파적용 제초제저항성 벼 품종을 육성할 목적으로 '98년 *bar* 유전자를 동진벼에 아그로박테리움법으로 형질전환하여 제초제저항성 벼를 양성하였다. '98/'99년 동계

에 단간 내도복 양질인 주남벼를 인공교배하여 약배양 등 육종프로그램에 적용하여 우량계통을 선발하고 밀양 204호로 계통명을 부여하였다. GM 벼와 Non-GM 벼의 농업적 특성을 UPOV 및 국립종자관리소의 품종등록 기준에 따른 농업적특성 중 차이가 있었던 것은 엽색도, 지엽의 형태, 간장, 수당립수 등 이었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 작물유전체 기능연구사업단 (#CG1510)의 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

Brar DS, Cohen BA, Vick CL, Johnson GW (1994) Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea*) plant from elite cultivars utilizing ACCELL technology. *Plant J* 5: 745-753
 Comai L, Hiatt WR, Huang LJ, Rose R, Thompson G, Stalker D (1985) Introduction and expression in plants of a glyphosate resistant *aroA* gene isolated from *Salmonella typhimurium*. *NATO (USA)* 83: 479-487
 Cohan SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *National Acad Sci* 70: 3240-3244
 Datta SK, Datta K, Soltanifar N, Donn G, Potrykus I (1992)

- Herbicide-resistant indica rice plants from IRRI breeding line 72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol Biol* 20: 619-629
- Dunwell JM, Paul EM (1990) Impact of genetically modified crops in agriculture. *Outlook Agric* 19: 103-109
- Eliseu S, Figueiredo LFA, Monte-neshich DC (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv Mantiqueira) using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep* 13: 666-670
- Fillatti JJ, Kiser J, Rose R, Comai L (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio-technol* 5: 726-730
- James C (2004) Global status of commercialized biotech/GM crop. ISAAA Briefs No 32. pp 12
- Juliano BO (1971) A Simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Sci Today* 16: 334-338
- Kim SH (2002) A trend of GMO related patent registration in Korea. *Curr trend of Health Indus Develop* 14: 67-71
- Korea Crop Protection Association (2002) Agrochemicals use guide book. pp 911
- Lam E (1990) From footprint to function: an approach to study gene expression and regulatory factors in transgenic plants. In: Setlow JK (ed) *Genetic engineering: Principles and methods* 12. Plenum Press, New York, pp 73-86
- Little RR, Hilder GB, Dawson EH (1958) Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled rice. *Cereal Chem* 35: 111-126
- Nehra NS, Chobbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J* 5: 285-297
- Rural Development Administration 2000. *Agricultural Experimental Guidelines, Version 3*. Rural Development Administration, Suwon, Korea. pp 487-490
- Oard JH, Linscombe SD, Braverman MP, Jodari F, Blouin DC, Leech M, Kohli A, Vain P, Cooley JC, Christou P (1996) Development, field evaluation and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Mol Breed* 2: 359-368
- Schuh W, Nelson MR, Bigelow DM, Orum TV, Orth CE, Lynch PT, Eyles PS, Blackhall NW, Jones J, Cocking EC, Davey MR (1993) The phenotypic characterization of R₂ generation transgenic rice plants under field conditions. *Plant Sci* 89: 69-79
- Won YJ, Yi GH, Cho JH, Ko JM, Park HM, Han CD, Yang SJ, Kim SC, Nam MH (2004) Establishment of a new breeding scheme for rapid release of variety using *bar* gene transformed rice. *Kor J Plant Biotechnol* 31: 7-11
- Yang CI, Yang SJ, Jeong YP, Choi HC, Shin YB (2001) Genotype × environment interaction of rice yield in multi-location traits. *Kor J Crop Sci* 46: 453-458

(접수일자 2005년 3월 28일, 수리일자 2005년 4월 25일)