

Research Article

Open Access

비타민 A 강화벼 급이가 벼물바구미(*Lissorhoptrus oryzophilus*)의 살충제 감수성에 미치는 영향

오성덕,^{1†} 이기종,^{1†} 박수윤,¹ 류태훈,¹ 김재광,¹ 손수인,¹ 김진서,² 하선화,¹ 박종석,¹ 안병옥,¹ 조현석,¹ 서상재^{2*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ²경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Effect on Insecticide Susceptibility of *Lissorhoptrus oryzophilus* Fed on Carotenoid-Biofortified Rice Variety

Sung-Dug Oh,^{1†} Ki-Jong Lee,^{1†} Soo-Yun Park,¹ Tae-Hun Ryu,¹ Jae-Kwang Kim,¹ Soo-In Sohn,¹ Jinseo Kim,² Sun-Hwa Ha,¹ Jong-Sug Park,¹ Byung-Ohg Ahn,¹ Hyun-Suk Cho¹ and Sang-Jae Suh^{2*} (¹National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea, ²Division of Plant Biosciences, School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

Received: 7 July 2012 / Accepted: 21 September 2012
© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: The carotenoid-biofortified (PAC) rice was generated by inserting phytoene synthase (*Psy*) and carotene desaturase (*Crtl*) genes isolated from *Capsicum annuum* cv. *Nockwang* and *Pantoea ananatis* into the genome of a conventional variety of rice (Nakdongbyeo). In our present study, we studied the effects on insecticide susceptibility of Rice Water Weevil (*Lissorhoptrus oryzophilus*).

METHODS AND RESULTS: The *L. oryzophilus* were fed on carotenoid-biofortified (PAC) rice and its near non-genetically modified (GM) counterparts (Nakdongbyeo) under 25±1 °C, humidity of 60±5%, and photoperiod 16L: 8D for more than 60 days. Ten adults were soaked in the Clothianidin SC solution for 5 second in different concentrations, and were detected the mortalities after 24, 48 and 72 hours respectively. Every experiment was conducted with three replications. The cumulative mortalities of *L. oryzophilus* exposed to Clothianidin SC were similar between two types of feed administration.

CONCLUSION: The results of this study suggested that

carotenoid-biofortified rice might not affect the insecticide susceptibilities of *Lissorhoptrus oryzophilus*.

Key Words: Carotenoid-biofortified rice, Insecticide susceptibilities, *Lissorhoptrus oryzophilus*

서 론

생명공학(Genetically Modified, GM)작물은 1990년 중반부터 콩, 옥수수, 목화, 유채 등 주요 작물들이 제초제, 해충, 병저항성을 갖도록 개발되어 상업적으로 이용되기 시작하였다. 세계 인구 증가에 따른 식량 부족, 지구 온난화, 지구 환경의 변화에 따른 농경지 및 생산성 감소 등의 문제점 극복하는 수단으로 제시되고 있다. 전 세계적으로 GM작물은 빠른 속도로 실용화되어 그 재배면적이 해마다 급진적으로 증가하고 있는 추세이다. 2011년에는 전 세계적으로 GM작물의 재배면적은 29개국 1억 6천만 헥타르나 되며, 누적된 경작면적은 12억 5천만 헥타르에 이르고 있다(James, 2011).

생명공학작물의 상업적 재배를 위해서는 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉 도입 유전자들이 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성과 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 안전성이 입증되어야 한다(Nap *et al.*, 1992; de Vries and Wackernagel, 2004). 현재 국내에서도 다양한 종의 유용 GM작물들이 개발되고 있으며 안전성 평가를 통해 상업화를 위한 단계를 준비중에 있다(Woo *et al.*, 2006). 따라서 개발된 GM작물이 환

*교신저자(Corresponding author),
Phone: +82-53-950-7767; Fax: +82-53-950-6758;
E-mail: sjsuh@knu.ac.kr

† These authors contributed equally to this work.

경에 방출되어 재배되기 전에 환경에 미칠 수 있는 요인들에 대한 국내 검증 가이드라인 구축이 필요한 시점이다.

미국환경보호국(USEPA)에 의하면 제초제와 해충 저항성 등의 농업적 형질이 특화된 1세대 GM작물 중에서 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 작물은 환경이나 인간 건강에 어떠한 위해요소도 보이지 않는 것으로 보고하였다(Betz *et al.*, 2000; Mendelson *et al.*, 2003). 하지만 Bt작물의 방어 특이성뿐만 아니라 *Cry* 단백질의 표적 또는 비표적 생물체에 대한 작용 기작도 완벽하게 규명되고 있지 않은 실정이다(Crickmore, 2005; Bravo *et al.*, 2007), 더불어 GM작물이 광범위한 면적에서 경작되고 있음에도 불구하고 비표적 생물체에 미치는 영향을 과학적으로 분석한 보고가 아직 미비한 편이다. 따라서 환경 위해성 평가 요소 중 재배 포장과 주변 환경의 생물종에 대한 직간접적인 영향 평가에 대한 체계적인 입증에 필요하다(Oh *et al.*, 2011a, Sohn *et al.*, 2010).

쌀은 전 세계 인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 에너지원이 되는 작물이나, 일반적으로 도정과정을 거쳐 백미로 섭취하며 백미의 경우 Fe, Zn, 비타민 A와 비타민 E 등의 여러 가지 필수 미량영양소가 부족하다(Juliano and Bechtel, 1985). 쌀의 영양학적 품질을 향상시키기 위한 방법으로 유전 공학기술이 도입되었으며, 쌀의 배유에 프로비타민 A인 베타-카로틴(β -carotene)을 생성하는 유전자변형 쌀인 일명 황금쌀(Golden Rice)이 비타민 A 결핍을 극복하기 위한 방안으로 개발되었다. 황금쌀은 *Japonica* 쌀 품종에 수선화(*Narcissus pseudonarcissus*) 유래의 phytoene synthase (*Psy*) 유전자와 세균 *Erwinia uredovora* 유래의 carotene desaturase (*CrtI*) 유전자를 도입하여 최초로 재조합되었으며(Ye *et al.*, 2000), 이어서 *Indica* 쌀 품종에도 적용되었다(Hoa *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2003). 그 후 옥수수 *Psy* 유전자를 선택하여 최초 개발된 황금쌀에 비해 carotenoid 함량이 약 20배 정도 증가된 제2세대 황금쌀이 개발되었다(Paine *et al.*, 2005). 국내에서는 고추(*Capsicum annuum*)의 카로티노이드(carotenoid) 대사관련 다중유전자 동시발현기술에 의해 쌀의 배유부위에 발현시킨, 베타-카로틴 생합성 벼(비타민 A 강화벼)를 개발하였다(Ha *et al.*, 2010).

GM작물에 도입된 유전자의 발현단백질은 복잡한 유기화합물 상태로 존재하며, 이 발현물질들 상호간의 작용에 대한 예측을 위해서는 GM작물내의 발현단백질이 생물체의 신진대사, 번식의 감소, 생체 기능의 상실이나 치사 등에 미치는 영향을 분석함으로써 유해성을 검사하는 환경생물 독성시험(생물검정)이 생태계 측면에서 합리적인 방법으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2010a). 환경생물 독성시험에는 매우 다양한 생물종이 이용되는데 무척추동물로는 물벼룩(*Daphnia magna*), 열새우류(*Gammarus* spp.), 완미운충류(*Brachionus* spp.), 어류로는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 제브라피쉬(*Brachydanio rerio*), 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 잉어(*Cyprinus carpio*) 그리고 조류로는 *Selenastrum*, *Chlorella*, *microcystis*, *Navicula* 등이 일반적으로 이용되고 있다(Versteeg *et al.*, 1997).

최근 해충저항성 Bt벼가 독성평가용 환경생물종인 무척추동물(물벼룩: *Daphnia magna*)과 어류(미꾸리: *Misgurnus anguillicaudatus*, 잉어: *Cyprinus carpio*)에 미치는 영향 및 벼의 해충으로 벼물바구미(*Lissorhoptrus oryzophilus*)의 살충제 감수성에 대한 영향이 보고되었으며, 해충과 익충을 포함하는 다양한 서식지의 환경생물종들에 미치는 직·간접적인 영향에 대한 필요성이 제기된 바 있다(Kim *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011a; Oh *et al.*, 2011b, Oh *et al.*, 2012).

따라서 본 시험에서는 GM벼에 대한 환경생물종의 생물독성시험을 위해서 비타민A 강화벼의 *Psy*와 *CrtI* 유전자의 도입과 카로티노이드 발현량을 분석한 후, 모본으로 사용된 낙동벼와 함께 농경지의 벼를 가해하는 해충인 벼물바구미(*Lissorhoptrus oryzophilus*)를 대상으로 비타민A 강화벼에 의한 직간접적인 영향 분석을 수행하였으며, 그 중에서 GM벼를 섭식시킴으로서 살충제 감수성에 미치는 영향을 일차적으로 분석하였다. 벼물바구미는 미국 미시시피강 상류가 원산지로 캐나다, 도미니카, 일본 등에서 발생하고 있으며, 우리나라에서는 1988년에 경남 하동에서 처음 발견된 이후 지금은 전국적으로 발생하고 있는 우리나라 대표적인 농경지의 벼를 가해하는 해충이다. 또한, 본 시험을 통해 국내 개발 GM작물의 안전성 자료 생산뿐만 아니라, 재배지에 서식하는 생물종에 대한 GM벼의 환경 위해성 영향 평가 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

Genomic DNA 분리 및 Southern blot 검정

비타민A 강화벼와 낙동벼 식물체 시료를 각 1 g씩을 취하고, 막자사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE)을 이용하여 260/280 nm 값이 1.8–2.0 사이인 추출액을 실험에 이용하였다. 비타민A 강화벼의 도입유전자 특성 확인을 위해서 Southern blot을 수행하였으며, 방법은 추출한 genomic DNA 5 μ g를 제한효소 *Xba*I 으로 처리하여 절단하고 1% 한천 겔 상에서 전기 영동한 다음 denaturation 과정을 수행하였다. 이후 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, Uppsala, Sweden)에 겔의 DNA를 전이시키고, membrane의 DNA 단편들을 UV-crosslink (1200 \times μ J/cm²)로 고정화한 후 hybridization buffer (0.5 M Na₂PO₄ pH 7.2, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/mL salmon sperm testicle DNA)로 1시간 동안 pre-hybridization하였다. Hybridization은 Random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하였고, radioactive probe인 α -32 ³²P로 labeling하여, 65 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 동안 hybridization 하였다. Probe는 specific primer를 이용하여 *Psy*와 *Crt I* 유전자를 PCR로 증폭한 후 elution 하여 사용하였다. Hybridization이 끝난 membrane은 washing solution (1st solution, 2X SSC,

0.1% SDS; 2nd solution, 1X SSC, 0.1% SDS; 3rd solution, 0.2X SSC, 0.1% SDS)으로 세척한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-2000; Fuji Photo film, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

도입유전자 단백질 발현 확인

Bar 유전자의 발현 확인을 위하여 ImmunoStrip 검정 (lateral strip test)을 실시하였다. 시료를 추출액과 함께 마쇄하여 단백질을 추출한 후, *bar* 유전자의 발현을 Trait LL Test Strip(Strategic Diagnostics Inc, Newark, DE)를 이용하여 ImmunoStrip 검정을 수행하였다(Oh *et al.*, 2011a).

카로티노이드 분석

*Psy*와 *Cra* 유전자의 발현을 통한 최종 산물인 종자 내의 카로티노이드 함량을 확인을 위하여 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 실시하여 분석하였다. 카로티노이드의 추출과 측정은 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 Kim 등의 분석법과 동일하게 수행하였다(Kim *et al.*, 2010c). 비타민 A 강화벼와 낙동벼의 현미 시료 0.3g에 0.1% ascorbic acid 을 함유한 에탄올 (w/v), 3ml를 넣고, 85°C 항온수조에 5분간 처리하여 카로티노이드를 추출하였다. 여기에 80% potassium hydroxide, 120 μ l를 넣고, 85°C 항온수조에 10분간 처리하여 비누화한 후, 즉시 실온으로 냉각하였다. 냉각 후, 탈이온수 1.5ml와 내부 표준물질로 25 μ g/ml 농도의 β -Apo-8'-carotenal 50 μ l과 hexane 1.5ml을 넣고 섞어준 후, 원심분리(1200 g, 5분)하여 카로티노이드를 추출하였다. Hexane을 이용한 카로티노이드 추출은 2번 수행하였다. 추출액은 질소가스를 이용하여 건조시킨 후, dichloromethane/metanol(50:50, v/v)에 다시 녹여 HPLC로 분석하였다. 카로티노이드는 photodiode array 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC (Massy, France)를 사용하여 450 nm 검출과장에서 측정하였다. 컬럼은 C₃₀ YMC column (250 × 4.6 mm, 3 μ m; Waters Corporation, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 용매 A는 10 mM ammonium acetate를 함유한 92 % methanol, 용매 B는 methyl *tert*-butyl ether를 사용하였다. 용매구배는 A:83%, B:17%로 시작하여, 23분에 A: 70%, B: 30%, 29분에 A: 59%, B: 41%, 35분에 A: 30%, B: 70%, 40분에 A: 30%, B: 70%, 44분에 A: 83%, B:17%, 55분에 A: 83%, B:17%로 하여 분석하였다. 용매 유속은 1 ml/min로, 컬럼 온도는 40°C로 고정하였다. Lutein, α -carotene, β -carotene, zeaxanthin (CaroteNature; Lupsingen, Switzerland)의 표준용액을 이용하여 얻은 검량선으로부터 카로티노이드를 정량하였고, 내부 표준물질로는 β -Apo-8'-carotenal (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)을 사용하였다.

벼물바구미 채집 및 배양 조건

벼물바구미(*Lissorhoptus oryophilus*)는 경북 군위군 소재 경북대학교 부속 포장에서 비타민A 강화벼와 낙동벼 포장에서 각각 2011년 7월 초순 성충을 채집하여, 사육실에서 사육하여 사용하였다. 실험곤충의 사육을 위해 기주로 사용된

벼는 비타민A 강화벼와 낙동벼이며, 과중후 14일 이상 경과한 묘를 플라스틱 사육상자 (50cm×60cm×45cm)에 넣고 각각의 포장에서 채집된 벼물바구미 성충을 집중하여 온도 25±1°C, 습도 60±5%, 광주기 16L:8D로 사육하였다. 사육하는 동안 기주인 벼는 수시로 충분히 공급하였으며, 공시충인 벼물바구미는 각 시험 벼에서 60일 이상 먹이인 벼 잎을 충분히 급이한 후 시험에 이용하였다.

벼물바구미에 대한 시료 처리조건

GM벼인 비타민A 강화벼에 의한 벼물바구미에 대한 직간접적 환경 생물독성을 분석하는 일환으로 살충제 감수성의 변화를 분석하였다. 분석방법은 비타민A 강화벼에서 비표적 해충인 벼물바구미를 대상으로 GM벼인 비타민A 강화벼를 60일 이상 충분히 급이한 후 살충제에 대한 감수성의 차이를 비교하였으며, 대조구로는 비타민A 강화벼의 모본으로 사용된 낙동벼를 이용하였다.

살충 감수성시험에 사용된 물질은 벼물바구미 성충 전용 살충제인 Clothianidin 액상수화제(유효성분함량 8%)이며, 시험농도는 본 실험에 앞서 72시간 동안 예비실험한 결과 72시간-LC₅₀값이 유효성분 0.008~0.032mg/L 범위 내에 있을 것으로 추정되어, 살충성 시험을 유효성분 0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.128mg/L의 농도에서 실시하였으며, 시험용액의 조제는 시험물질 정확히 칭량하여 1L의 증류수에 넣고 녹여 시험용액(Test solution)으로 사용하였다. 생물검정법은 FAO(1974)의 방법을 약간 변형한 총체침지법(body dipping method)을 사용하였으며, 비타민A 강화벼와 낙동벼에서 사육한 벼물바구미 중 크기가 비슷한 성충을 흡충관으로 10마리씩 흡충하여 각각 그물망에 넣고 5초간 동시에 시험용액에 침지하였으며, 침지된 공시충은 바로 filter paper로 여액을 제거하였다. 이들 공시충은 각각 해당 벼 잎을 넣은 200mL 용량의 곤충사육용기(Insect Breeding Dish, 100x40mm)로 옮겨, 온도 25±1°C, 습도 60±5%, 광주기 16L:8D 조건의 항온실내에 72시간동안 보관하면서 24시간 간격(24h, 48h, 72h)으로 사충율을 조사하였다. 이때 벼 잎은 수시로 새로 갈아 주었다. 시험 약제를 처리하지 않은 벼물바구미 성충을 대조구로 설정하였으며, 모든 시험은 농도당 각 10마리씩 3반복 처리하여 조사하였다.

시험계의 관찰 항목

벼물바구미에 대한 간접적 환경 생물독성여부를 규명하기 위하여 시험 살충제 처리 72시간 후의 일반중독증상과 특이증상 등을 관찰하였다. LC₅₀산출은 시험물질 처리 후 72시간의 유효성분에 대한 반수치사농도 (LC₅₀) 및 95% 신뢰한계를 probit 분석법에 의해 산출하였다.

결과 및 고찰

비타민A 강화벼의 분자생물학적 분석

독성평가에 이용된 비타민A 강화벼는 카로티노이드(carotenoid)

대사관련 유전자인 고추(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에서 분리된 phytoene synthase(*Psy*)와 세균 *Pantoea ananatis*에서 분리된 carotene desaturase(*CrtI*) 유전자를 동시발현 기술을 이용하여 낙동벼에 도입하여 개발되었으며(Ha *et al.*, 2010), 형질전환체 종자의 배유부위에서 베타-카로틴의 함량이 모품종인 낙동벼에 비해 약 9배 증가됨을 확인하였다. 종자의 배유부위에서 베타-카로틴이 증가된 비타민A 강화벼 이벤트(event PAC 4-2-1-1-12-1-1, T7세대)와 비형질전환 낙동벼를 비표적 생물체에 대한 독성평가를 실시하였다.

분석에 사용된 시료에서 *Psy*와 *CrtI* 유전자들의 삽입을 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시한 결과, 비타민 A 강화벼(PAC 4-2-1-1-12-1-1)에서는 12kb의 단일 밴드만 검출되었고, 비형질전환체인 낙동벼에서는 밴드가 검출되지 않았다. 이는 *Psy*와 *CrtI* 유전자가 본 실험에 사용된 비타민 A 강화벼에 one-copy로 도입되었고, 도입 유전자가 T7세대 까지 안정적으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 1). Probe로 이용한 *Psy*와 *CrtI* DNA 유전자는 검정하기 위하여 pGEM T-easy vector에 삽입하여 염기서열을 분석한 결과 운반체 제작에 사용된 *Psy*와 *CrtI* 유전자의 상동성이 각각 100% 동일함을 확인하였다(data 생략).

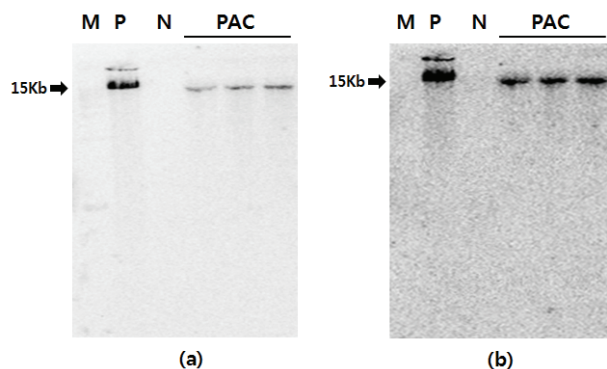


Fig. 1. Southern blot analysis of carotenoid-biofortified rice (PAC) rice. Genomic DNA was digested with *Xho* I for one-cut site followed by hybridization to *Psy* (A) and *CrtI* (B). M: 2.5kb DNA ladder, P: positive control, N: non-GM rice (Nakdong), PAC: carotenoid-biofortified rice PAC 4-2-1-1-12-1-1 lines.

비타민A 강화벼에서 Bar 단백질의 발현을 검정하기 위하여 항체를 이용한 lateral flow strip test (LFST)분석을 실시하였다. GMO격리포장에서 재배한 비타민A 강화벼와 낙동벼에 대하여, Bar 단백질 확인용 항체가 표지되어 있는 immunostrip을 이용하여 단백질 발현을 분석한 결과, 비타민A 강화벼에서만 특이적으로 단백질이 발현되었으며, 대조구인 낙동벼에서는 단백질이 발현되지 않았다(Fig. 2). 또한 비타민A 강화벼에서 종자 특이적인 프로모터인 *Glb*에 의해서 발현되는 *Psy*와 *CrtI*의 단백질 발현 산물인 카로티노이드는 HPLC법을 이용하여 포장내의 수확한 종자에서 분석한 결과, 비타민A 강화벼에서는 lutein은 0.72 ± 0.06 $\mu\text{g/g}$, zeaxanthin은 0.30 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$, α -carotene은 0.37 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$, β -carotene

은 1.43 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ 로 모품종인 낙동벼에 비해 zeaxanthin과 α -carotene은 검출되었으며, lutein과 β -carotene은 각각 3.1배와 8.9배 함량이 증가됨을 확인하였다(Table. 1). 이는 2009년 GMO 격리포장(군위)에서 재배한 비타민A 강화벼의 T6세대(event PAC 4-2-1-1-12-1)인 종자에서 카로티노이드 검출량(lutein 0.51 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$, zeaxanthin 0.23 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$, α -carotene은 0.42 ± 0.11 $\mu\text{g/g}$, β -carotene은 1.65 ± 0.64 $\mu\text{g/g}$)과 유사하여, 세대별로 안정적으로 도입 유전자의 단백질이 안정적으로 발현됨을 확인할 수 있었다(data 생략).

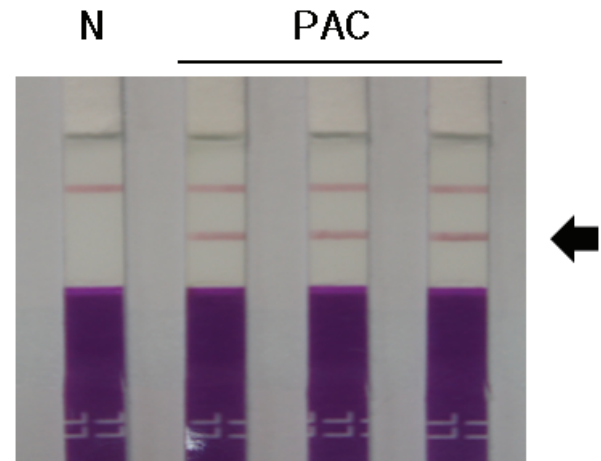


Fig. 2. Confirmation of genes expression for carotenoid-biofortified (PAC) rice by using immunostrip. Immunostrip tests for the PAT detection, N: non-GM rice; Nakdong, PAC: carotenoid-biofortified rice PAC 4-2-1-1-12-1-1 lines.

Table 1. Seed carotenoid content and composition of carotenoid-biofortified (PAC) and Nakdong rices

Carotenoid content	Nakdong	PAC
Lutein	0.23 ± 0.08	0.72 ± 0.06
Zeaxanthin	nd ¹⁾	0.30 ± 0.01
α -Carotene	nd	0.37 ± 0.05
β -Carotene	0.16 ± 0.03	1.43 ± 0.16

Data are expressed as mean ($\mu\text{g/g}$ dry weight) SD from three independent

¹⁾ nd; not detected

비타민A 강화벼의 벼물바구미에 대한 급성 독성 시험

비타민A 강화벼와 낙동벼의 시료 농도별 벼물바구미(각 처리별 30마리)를 대상으로 72시간 동안 생사수, 일반중독증상, 특이 증상 등을 조사하였다. 낙동벼 처리구에서 72시간 경과시 유효농도 0.004, 0.008, 0.016mg/L 처리구에서는 각 농도당 3.3%, 23.3%, 50%의 사충율을 보였고, 0.032, 0.064mg/L 처리구에서는 63.3%, 73.3%의 사충율이 관찰되었다. 유효농도 0.128mg/L 처리구에서는 24, 48, 72시간후 사충율이 93.3%이상 관찰되었다. 시험기간 중 대조군에서는 일반중독 증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다. 비타민A 강화벼 처리

구에서는 72시간 후 유효농도 0.004, 0.008, 0.01mg/L 처리구에서는 각 농도당 6.7%, 30.0%, 56.7%의 사충율을 보였고, 0.032, 0.064mg/L 처리구에서 72시간 경과시 각각의 농도

에서 66.7%, 76.7%의 사충율이 관찰되었다. 유효농도 0.128mg/L 처리구에서는 24, 48, 72시간 후 86.7%, 93.3%, 96.7%의 사충율이 관찰되었다(Table 2).

Table 2. Cumulative immobilities of *Lissorhoptrus oryzophilus* on Clothianidin SC in Nakdong and carotenoid- biofortified (PAC) rices

Sample	Concentration (mg/L) ¹⁾	Number of immobilized weevil												Total mortality (%)		
		24h				48h				72h				24h	48h	72h
		Ex.1	Ex.2	Ex.3	Total	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Total	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Total			
Nakdong	0	0 ²⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
	0.004	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	3.3	3.3	3.3
	0.008	2	1	1	4	2	1	2	5	4	1	2	7	13.3	16.7	23.3
	0.016	5	3	3	11	5	4	4	13	6	5	4	15	36.7	43.3	50.0
	0.032	5	5	6	16	6	5	7	18	7	5	7	19	53.3	60.0	63.3
	0.064	6	6	7	19	6	6	7	19	7	8	7	22	63.3	63.3	73.3
	0.128	10	10	8	28	10	10	9	29	10	10	10	30	93.3	96.7	100.0
PAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
	0.004	0	0	1	1	0	1	1	2	0	1	1	2	3.3	6.7	6.7
	0.008	2	2	2	6	3	2	2	7	3	3	3	9	20.0	23.3	30.0
	0.016	5	3	4	12	5	4	4	13	6	6	5	17	40.0	43.3	56.7
	0.032	7	7	4	18	8	7	4	19	7	7	6	20	60.0	63.3	66.7
	0.064	8	7	6	21	9	7	7	23	8	8	7	23	70.0	76.7	76.7
	0.128	9	8	9	26	10	9	9	28	9	10	10	29	86.7	93.3	96.7

¹⁾ Active ingredient.

²⁾ 10 Rices Water Weeviles were treated in each experiment.

비타민A 강화벼의 벼물바구미에 대한 반수 치사 농도

비타민A 강화벼와 낙동벼의 벼물바구미 급성독성시험을 실시한 결과, 낙동벼의 72시간-LC₅₀은 유효농도 0.021mg/L, 95% 신뢰한계는 0.016~0.026mg/L, 비타민A 강화벼의 72시간-LC₅₀은 0.018mg/L, 95% 신뢰한계는 0.013~0.023mg/L으로 나타났다(Table 3). 이는 72시간-LC₅₀은 낙동벼에서 다소 높았지만 비타민A 강화벼 72시간-LC₅₀이 낙동벼의 95% 신뢰한계 내에 포함되어, 두 품종의 LC₅₀값에 유의성이 없는 것으로 판단되었다.

Table 3. LC₅₀ values on Clothianidin SC in Nakdong and carotenoid-biofortified (PAC) rices

Test item	LC50(mg/L) ¹⁾		
	24 h	48 h	72 h
Control	-	-	-
Nakdong			0.021 (0.016~0.026) ²⁾
PAC			0.018 (0.013~0.023)

¹⁾ Active ingredient.

²⁾ 95% confidence limits.

국내외적으로 아직까지 GM작물에 대한 재배지 주변 환경 지표생물에 대한 영향 평가는 미비한 편이다. 국내에서도 생명공학작물의 실용화와 해외에 판매되는 생명공학작물의 수입량 증가에 따른 환경지표생물종별 기준 설정과 이에 대한 영향 평가의 필요성이 요구되어, 국내에서 개발된 해충저항성 Bt 벼에 대한 농경지의 환경지표생물종들에 대한 영향 평가가 보고되었다(Oh et al., 2011a; Oh et al., 2011b). 수생환경의 잉어(*Cyprinus carpio*)와 미꾸라지(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 급성독성평가 수행한 결과에서 모품종인 낙동벼와 해충저항성 Bt벼에서 48시간 및 96시간-LC₅₀에서 동등함을 확인하였으며(Oh et al., 2011b), 벼물바구미의 살충제 감수성 실험에서도 72시간-LC₅₀에 통계적으로 유의적 차이가 없는 것으로 보고되었고(Oh et al., 2012). 본 실험과 동일한 농업 환경 지표생물종인 물벼룩에서 급성독성시험 결과에서도 본 실험과 같이 차이가 없는 것으로 보고되었다(Oh et al., 2011a). 국외에서는 Thomas 등(Thomas et al., 2010)의 *Cry1Ab* 유전자를 형질전환한 Bt 옥수수(MON810)의 급성독성 실험 결과에서 MON810과 비형질전환 옥수수의 처리 5일차 내에서의 생존률의 차이는 나타나지 않았으나, 42일간 장기영향 평가 시에는 후세대에서의 성숙기간, 산란수, 세대진전시기 등에 따라 차이가 나타남을 보고하였다. 그러나 이 실험은 농도

에 대한 기준 설정이 없이 단일농도에서만 시험이 수행되었으며, Lee 등(Lee et al., 2007)의 실험 결과에서 제시된 중금속 및 농약에 대한 물벼룩의 EC₅₀과 LC₅₀값이 상당히 광범위하게 형성되어 물벼룩의 영향 평가 실험 시 실험방법, 장소 및 조건의 차이가 있다는 보고와 같이 처리 농도 등이 고려되어야 될 것으로 사료된다.

본 연구를 통해서 *Psy*와 *Cra* 유전자가 형질전환된 비타민A 강화벼가 벼물바구미에 미치는 영향을 분석한 결과, 72시간-LC₅₀은 0.018mg/L로 측정되었고, 이는 낙동벼의 72시간-LC₅₀ 0.021mg/L로 통계적 유의차가 없는 것으로 나타났다. 따라서 낙동벼와 비타민A 강화벼가 농경지, 수로 등의 환경에 방출되었을 때 벼물바구미에 미치는 환경-생물학적인 영향이 동일하다고 판단할 수 있다. 비타민A 강화벼와 낙동벼의 급이에 따른 단일세대 벼물바구미의 살충제에 대한 감수성을 간접적 방법으로 확인하였으나, 이는 향후에 직접적인 영향 평가를 위하여 비타민A 강화벼 급이에 따른 벼물바구미의 세대진전에 따른 산란수, 부화율, 성숙도 등의 비형질전환체인 낙동벼와 비교 분석하는 실험도 추가적으로 실시하여 후대 안전성 실험을 보완하여야 할 것이다. 국내 개발된 GM벼의 환경위해성 평가 중에 환경 지표종에 대한 영향 평가를 위해서는 생태영향 평가와 생식, 유전독성 분석을 통한 안전성 평가 표준 가이드라인을 구축하여야 하며 본 실험 결과는 이를 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

요 약

비타민A 강화벼와 낙동벼의 벼물바구미(*Lissorhoptrus oryzophilus*)에 대한 성충 전용살충제 Clothianidin 액상수화제의 살충제 감수성 시험을 실시한 결과, 비타민A 강화벼에서 72시간-LC₅₀은 유효농도 0.018mg/L (95% 신뢰한계는 0.013~0.023mg/L)이었으며, Bt벼의 모본으로 대조로 사용한 낙동벼의 72시간-LC₅₀은 유효농도 0.021mg/L(95% 신뢰한계는 0.016~0.026mg/L)이었다. 72시간-LC₅₀은 낙동벼에서 다소 높았지만, 해충저항성 Bt벼 72시간-LC₅₀이 낙동벼의 95% 신뢰한계 내에 포함되어, 두 품종의 LC₅₀값에 유의성이 없는 것으로 판단된다.

감사의 글

This study was carried out with the support of the "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ008484)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic Korea.

참고문헌

Bravo A, Gill SS, Soberon M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon* 49, 423-435.

Crickmore N., 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects, *Trends Microbiology* 13, 347-350.

Datta K, Baisakh N., Oliva N., Torrizo L., Abrigo E., Tan J., Rai M., Rehana S., Al-Babili S., Beyer P., 2003. Bioengineered "golden" indica rice cultivars with β -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems, *Plant Biotech J.* 1, 81-90.

De Vries J., Wackernagel W., 2004. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants, *Plant and Soil* 266, 91-104.

FAO, 1974. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Plant Protection Bulletin*, pp.112-116. FAO.

Ha S.H., Liang Y.S., Jung H.R., Ahn M.J., Suh S.C., Kweon S.J., Kim D.H., Kim Y.M., Kim J.K., 2010. Application of Two Bicistronic Systems Involving 2A and IRES Sequences to the Biosynthesis of Carotenoids in Rice Endosperm, *Plant Biotechnology Journal* 8, 928-938.

Hoa T., Al-Babili S., Schaub P., Potrykus I., Beyer P., 2003. Golden Indica and Japonica rice lines amenable to deregulation, *Plant Physiol.* 133, 161-169.

James C., 2011. The global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. ISAAA Briefs 43.

Juliano B.O., Bechtel D.B., 1985. *The rice grain and its gross composition. In Rice Chemistry and Technology*, pp.37-50, Juliano B.O. AACC, Inc., St. Paul, MN, USA.

Kim K.Y., Kim K.R., Lee S.I., 2010a. Acute toxicity test for heavy metals using water fleas, *J Korean Wood Sci & Tech.* 18, 37-47.

Kim H.J., Lee S.M., Kim J.K., Ryu T.H., Suh S.C., Cho H.S., 2010b. Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea, *J Agric Food Chem.* 58, 10906-10910.

Kim J.K., Lee S.Y., Chu S.M., Lim S.H., Suh S.C., Lee Y.T., Cho H.S., Ha S.H., 2010c. Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 58, 12804-12809.

Lee C.W., Ryu J.Y., Lim K.W., 2007. Acute Toxicity

- Test of Agricultural Chemicals to Water Fleas, *J Environ Sci.* 16, 55–63.
- Nap J.P., Bijvoet J., Stiekema W.J., 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants, *Transgenic Res.* 1, 239–249.
- Oh S.D., Shin H.C., Sohn S.I., Lee K.J., Kim H.J., Ryu T.H., Lee J.Y., Park B.S., Kweon S.J., Suh S.C., Park J.S., 2011a. Evaluation and assessment of biosafety for Bt-transgenic rice : Responses of *Daphnia magna* fed on Bt-transgenic rice variety, *J. Appl. Biol. Chem.* 54, 296-302.
- Oh S.D., Lee D.Y., Sohn S.I., Lee K.J., Ryu T.H., Lee J.Y., Park B.S., Kweon S.J., Suh S.C., Park J.S., 2011b. Risk assessment and evaluation of Bt-transgenic rice : Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on Bt-transgenic rice variety, *Korean J. Intl. Agri.* 23, 570-577.
- Oh S.D., Lee K.J., Sohn S.I., Kwon Y.J., Kim J.S., Lee J.Y., Park B.S., Kweon S.J., Suh S.C., Ryu T.H., Park J.S., Ahn B.O., Cho H.S., Suh S.J., 2012. Effect on insecticide susceptibility of *Lissorhoptrus oryzophilus* Fed on *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Transgenic Rice Variety, *Korean J. Intl. Agri.* 24, 247-253.
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R., 2005. Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content, *Nat Biotechnol.* 23, 482-487.
- Sohn S.I., Oh Y.J., Oh S.D., Kim M.K., Ryu T.H., Lee K.J., Suh S.C., Baek H.J., Park J.S., 2010. Molecular analysis of microbial community in soils cultivating Bt chinese cabbage, *Korean Environ Agri.* 29, 293–299.
- Thomas Bøhn, Terje Traavik, Raul Primicerio, 2010. Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize, *Ecotoxicology* 19, 419-430.
- Versteeg D.J., Stalmans M., Janssen C., 1997. Ceriodaphnia and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species, *Chemosphere* 34, 869-892.
- Woo H.J., Lim S.H., Lee K.J., Won S.Y., Kim T.S., Cho H.S., Jin Y.M., 2006. Current development status on the genetically modified crops in Korea, *Korean J Intl Agric.* 18, 221-229.
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I., 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm, *Science* 5, 287-303.