

Research Article

Open Access

## 병저항성 GM(OsCK1)벼가 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*) 및 잉어(*Cyprinus carpio*)에 미치는 영향

오성덕, 이기종\*, 박수윤, 이대용,<sup>1</sup> 손수인, 김민영, 류태훈

농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>1</sup>한국화학융합시험연구원

### Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* Fed on Disease Resistant(OsCK1) Rice Variety

Sung-Dug Oh, Kijong Lee,\* Soo-Yun Park, Dae-Yong Lee,<sup>1</sup> Soo-In Sohn, Min-Young Kim and Tae-Hun Ryu (National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea, <sup>1</sup>Korea Testing & Research Institute, Kimpo, 415-871, Korea)

Received: 28 August 2013 / Revised: 12 September 2013 / Accepted: 23 September 2013

© 2013 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

**BACKGROUND:** The disease resistant (OsCK1) rice was generated by inserting choline kinase (*CKI*) and phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*) genes isolated from *Oriza sativa* and *Streptomyces hygrosopicus* into the genome of rice (Nakdongbyeo). With the potential problems of safety, the non-target organism evaluation is required as an essential element for the environmental risk assessment of genetically modified (GM) crops. In present study, we studied the effects on survival of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio*, commonly used as a model organism in ecotoxicological studies.

**METHODS AND RESULTS:** The *M. anguillicaudatus* and *C. carpio* were fed on disease resistant (OsCK1) rice and non-genetically modified (non-GM) rice (Nakdongbyeo) to 0, 10, 100, 1,000 and 5,000 mg/L, as treatment concentration respectively. The OsCK1 rice used for the test was confirmed to have the *OsCKI/PAT* gene

expression by the PCR and ELISA analysis. Feeding test showed that no significant differences in cumulative immobility and abnormal response of *M. anguillicaudatus* and *C. carpio* fed on between OsCK1 rice and non-GM rice. The 96hr-LC<sub>50</sub> values showed no difference between OsCK1 rice (>5,000 mg/L) and non-GM rice (>5,000 mg/L).

**CONCLUSION(S):** The results of this study suggested that there was no significant difference in toxicity for *M. anguillicaudatus* and *C. carpio* between OsCK1 rice and non-GM counterparts.

**Key words:** *Cyprinus carpio*, Disease resistant transgenic rice, *Misgurnus anguillicaudatus*, Risk assessment

#### 서론

유전자변형(Genetically Modified, GM) 작물은 2012년에 1억 7,300만 헥타르가 재배되어 처음 상업적인 재배해인 1996년보다 무려 100배가 증가하였고, 25작물 196품목의 GM작물이 상업화 승인된 것으로 국제생명공학응용정보서비스(ISAAA)는 보고하고 있다(James, 2012). 그러나, GM작

\*교신저자(Corresponding author)

Phone: +82-31-299-1142; Fax: +82-31-299-1122;

E-mail: leekjong@korea.kr

물 재배를 통하여 식품 및 사료가 재배되기 시작한 1996년부터 재배면적의 증가와 함께, 환경과 인체에 미칠 영향에 대한 우려도 꾸준히 제기되고 있는 실정이다.

국내에서는 아직 상업화적으로 재배가 승인된 GM작물은 없으나 벼, 감자, 콩, 배추, 고추, 토마토, 들깨 등을 중심으로 다양한 기능의 유전자 도입이 시도되어 왔으며, 이중 일부 GM작물의 이벤트 계통들에 대한 안전성평가를 통한 실용화 연구를 수행하고 있다(Shin *et al.*, 2010). 더불어, 국내 개발 GM작물의 상업화는 2020년을 목표로 하고 있어, GM작물의 환경위해성과 식품안전성 평가는 더욱 필수 요건이 되고 있다(Lee *et al.*, 2010). 이에 개발된 GM작물에 도입된 유전자의 발현에 의한 독성, 알레르기 및 영양 성분 평가 등에 관한 식품안전성 및 환경에 미치는 잠재적 위험성, 유전자 이동성, 생태계 교란 등에 대한 환경위해성 중에서도, 특히 도입 유전자 산물의 표적 및 비표적 생물체에 미치는 영향에 대한 검증 가이드라인 구축의 필요성이 대두되고 있다(Oh *et al.*, 2012; de Vries and Wackernagel, 2005).

GM벼의 개발은 미국, 일본, 중국, 인도 및 우리나라에서 활발하게 이루어지고 있다. 벼 형질전환체는 Toriyama 등 (1988)에 의해서 최초 개발됨으로써 농업생명공학 분야에 큰 관심을 일으키며 연구가 시작되었다(Toriyama *et al.*, 1988). 국내에서는 제초제저항성, 영양성분 강화, 해충저항성, 가뭄저항성 등의 다양한 기능이 도입된 벼(*Oryza sativa*)를 대상으로 생명공학작물의 개발이 집중적으로 이루어지고 있다(Jung *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010). Lee 등(2007)은 벼 유래의 Choline kinase 유전자(*OsCK1*)를 과발현하여 벼도열병과 벼흰잎마름병에 저항성을 나타내는 병저항성 GM벼를 개발하였고, 이를 실용화하기 위하여 환경위해성 평가 연구를 수행하고 있다(Lee *et al.*, 2007).

벼는 한국을 비롯하여 동남아시아 국가의 주요 농산물 중 하나로 재배면적이나 생산량 및 소비량에 있어서 가장 우위를 차지하고 있다. 벼는 담수조건에서 생육하므로 GM벼의 실용화를 위한 환경위해성 평가 항목에서 일반적인 평가 대상인 나비목, 노린재목, 딱정벌레목 등의 대표 곤충 이외에 물벼룩, 잉어, 미꾸리 등의 수서환경 비표적생물체에 대한 평가도 이루어져야 한다. 최근 환경위해성 평가 항목인 비표적 수서생물종에 미치는 영향을 분석하기 위하여 해충저항성 Bt 벼가 물벼룩(*Daphnia magna*)에 미치는 영향이 분석되었고, 어류에 미치는 영향에 대한 위해성 평가가 보고되었다(Oh *et al.*, 2011a; Oh *et al.*, 2011b). 수서생물종 중 어류에 대한 환경 생물 독성시험을 평가하기 위한 시험종 선택에 있어서 생태학적 및 실험 방법론적 문제뿐만 아니라 비용과 시험종 공급 등 현실적인 문제를 고려하여(위해성 물질에 대한 감수성, 다양한 독성물질에 대한 독성 성적 확보 유무, 광범위한 지역에 서식, 1년 이내의 단기간에 생활사 독성시험 가능) 미꾸리, 잉어, 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 자브라피쉬(*Brachydanio rerio*) 등이 일반적으로 사용되어져 왔다(Versteeg *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2010a). 본 실험에서는

GM벼에 대한 어류의 환경위해성 평가를 분석하기 위하여 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)와 잉어(*Cyprinus carpio*)를 시험종으로 선정하였다

본 시험에서는 병저항성 GM벼에 대한 환경 생물 독성시험을 위해서 환경생물 독성 시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2010-29호)에 명시된 환경생태독성 시험 생물로서 가장 널리 사용되는 생물검정 재료인 미꾸리와 잉어를 대상으로 병저항성 GM벼에 대한 영향을 분석하였다. 병저항성 GM벼의 choline kinase (*CK1*) 유전자의 도입과 PAT 단백질 발현량을 확인한 후, 모본으로 사용된 낙동벼와 함께 환경위해성 평가 항목 중 수생 생물종인 미꾸리와 잉어에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 시험을 통해 국내 개발 GM작물의 안전성 자료 생산뿐만 아니라, 유전자 변형 벼의 환경위해성 연구 및 비표적 생물체의 위해성평가 가이드라인을 구축을 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 제조

병저항성 GM벼(event LS28 30-32-20-9-7)와 비형질전환 모품종인 낙동벼를 GMO 격리 포장(경기도 수원시 서둔동)에서 재배하고 잎과 줄기부위를 수확하여(출수기) 동결건조한 후(일신랩 FD8518, 한국) 분쇄기를 이용하여(한일전기, HMF-3100S, 한국) 분말화 하였다. 분쇄된 시료는 600  $\mu$ m의 표준망체(청계산업, 한국)를 통과시킨 후, 사육용수에 현탁하여 급성독성 분석용 시료로 이용하였다.

### Genomic DNA 분리 및 PCR 검정.

병저항성 GM벼와 낙동벼 시료를 각 1 g 씩을 취하고, 막자사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 DNeasy plant kit (Qiagen, CA, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA)을 이용하여 260/280 nm 값이 1.8~2.0 사이인 추출액을 실험에 이용하였다. 식물 형질전환용 운반체의 유전정보를 바탕으로 *OsCK1/PinII*, *PAT*, *Actin* 유전자 확인용 프라이머를 제작하였다(Table 1). PCR 검정을 위하여 dNTP(10mM) 4  $\mu$ l, 10X PCR buffer 4  $\mu$ l, 프라이머 각 20  $\mu$ M, f-Taq DNA polymerase 1 unit(Solgent, 한국), template genomic DNA 200 pg를 추가한 후 최종 반응 부피를 40  $\mu$ l로 하였다. PCR 반응은 PTC-100 Thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 1 cycle(95 $^{\circ}$ C, 5분), 35 cycle(95 $^{\circ}$ C, 30초 - 55 $^{\circ}$ C, 30초 - 72 $^{\circ}$ C, 30초), 1 cycle(72 $^{\circ}$ C, 5분)반응을 순차적으로 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 UV조사로 확인하였으며 Gel Extraction kit (Qiagen, 28704)를 이용하여 정제하고 pGEM T-easy vector (Promega Madison, USA)에 삽입하여 정확한 염기서열 정보를 확인하였다.

Table 1. Primers list used for PCR analysis

Gene	Primer	Primer sequences	Product Size(bp)
<i>OsCK1/PinII</i>	Forward	5'-AGTCCCCTAATGGTGGCCCTAACCAA-3'	625
	Reverse	5'-TTAATGTGTATTGTGTGTTGAAAC-3'	
<i>PAT</i>	Forward	5'-TCAAATCTCGGTGACGGG-3'	466
	Reverse	5'-CGAGACAAGCACGGTCAAC-3'	
<i>Actin</i>	Forward	5'-ATCACTGCCTTGCTCCTAGC-3'	137
	Reverse	5'-GTACTCAGCCTTGGCAATCC-3'	

### 병저항성 GM벼의 발현 단백질 검정

*PAT* 유전자의 발현 확인을 위하여 Immunostrip 검정 (lateral strip test)을 실시하였다. 시료를 추출액과 함께 마쇄하여 단백질을 추출한 후, *PAT* 유전자의 발현을 Trait LL Test Strip(Strategic Diagnostics Inc, Newark, DE)를 이용하여 Immunostrip 검정을 수행하였다(Oh *et al.*, 2011a). *PAT* 단백질의 농도를 정량하기 위하여 각 시료들을 마쇄한 후 PBST용액과 함께 균질화 한 후 저온처리(얼음에서 5분) 및 원심분리(5,000 g, 5분)하여 단백질을 분리, 추출한 후 *PAT*/bar ELISA kits (EnviroLogix LibertyLink, Portland, USA)를 이용하여 ELISA분석을 실시하였다. 모든 시료들은 상온에서 2시간 반응한 후 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Scientific)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(Kim *et al.*, 2010b).

### 공시 어류 배양 조건

독성분석용 비표적 생물체인 미꾸리는 대한농산(전라북도 남원시 송동면, 한국)에서, 잉어는 오창 양어장(충청북도 청원군, 한국)에서 각각 구입하여 배양하였다. 미꾸리는 1,000 L 용량의 장방형 수조(환경독성실험동 담수어사육실)에서 수온 21~25°C, 광조건 16시간, 암조건 8시간의 조건으로 배양하였으며, 오전에 1회 미꾸리용 탐밀(제일사료, 한국)을 먹이로 매일 공급하였다. 잉어는 1,000 L 용량의 장방형 수조에서 수온 20~24°C, 광조건 16시간, 암조건 8시간의 조건으로 배양하였으며, 오전에 1회 잉어용 고품사료(세화사료, 한국)를 먹이로 매일 공급하였다. 어류 사육실의 온도 및 배양수조의 수온은 자동온도측정기에 의하여 매 30분마다 측정하여 시험에 영향을 미칠 정도의 변동이 없음을 확인하였다. 배양에 사용된 용수는 전처리필터(1.0 µm)와 세균제거 필터(0.2 µm)를 통과시킨 지하수를 저수조에서 24시간 이상 폭기시킨 후 사용하였다. 수질의 측정은 한국화학융합시험연구원 헬스케어 연구소의 표준작업순서(SOPs)에 따라 6개월에 1회 한국화학융합시험연구원에서 먹는 물 수질 분석기준에 따라 분석하였으며, 검사 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

### 공시 어류에 대한 시료 처리 조건

병저항성 GM벼와 낙동벼의 시료를 각각 0, 10, 100, 1,000 및 5,000 mg/L의 농도로 시험용수에 현탁 처리하였으

며, 24, 48, 72, 96시간 마다 공시어종인 미꾸리와 잉어에 미치는 영향을 관찰하였다. 시료의 각 농도에 대하여 탁도(2100AN model, HACH)를 측정하였다. 병저항성 GM벼와 낙동벼의 농도별 시험 결과를 분석한 후, 최종 농도로 5,000 mg/L에서 한계시험(limit test)을 수행하였다. 시험용액의 조제는 시험물질 10 g을 정확히 측정하여 12.5 L의 시험용 수조에 넣고 시험용수를 전량 10 L가 되도록 추가한 후 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시켜 시험용액으로 사용하였다. 음성대조구(무처리)는 시험용수인 지하수를 사용하였으며, 양성대조구는 Pentachlorophenol sodium salt (Fluka, USA)를 양성대조물질로 하여 잉어에서는 0.06, 0.08, 0.12, 0.16 및 0.23 mg/L의 설정농도(nominal concentration)와 미꾸리에서는 0.10, 0.16, 0.26, 0.41 및 0.66 mg/L의 설정농도로 적용하여 사용하였다. 미꾸리에 대한 노출실험은 23.5 L 용량의 원통형 유리수조(38cm H × 28cm φ)에 20 L의 시험용액에서 실시하였으며, 각각 10마리씩을 처리하였다. 잉어는 12.5 L 용량의 원통형 유리수조(28cm H × 24cm φ)에 10L의 시험용액에서 실시하였으며, 각각 10마리씩을 처리하였다. 시험개시 24시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여는 중단하였다.

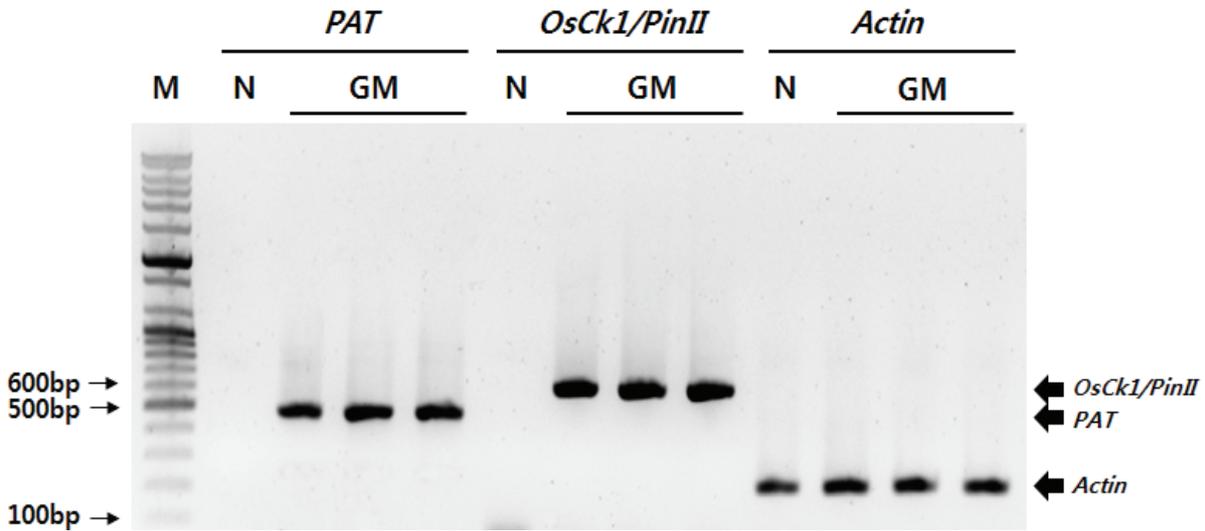
### 급성독성분석을 위한 조사항목

공시 어류의 일반증상 및 치사수 관찰은 모든 시험 수조에 대하여 처리 12, 24, 48, 72 및 96시간 경과 후 일반중독증상, 특이증상 및 치사유무 관찰을 실시하였다. 각 처리에 대하여, 미꾸리와 잉어를 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사어로 판단하였다. 시험기간 중 모든 수조에 대하여 1일 1회 수온, pH(PP-15 pH meter, Sartorius), DO(Orion 4 Star DO meter, Thermo Scientific)를 측정하였다. LC<sub>50</sub>산출 및 NOEC는 시험물질 처리 후 48 및 96시간 경과 후 치사개체가 없었으므로 반수 치사농도(LC<sub>50</sub>) 및 신뢰한계는 산출하지 않았다. 무영향농도(NOEC)는 중독증상이 없고 치사어가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 병저항성 GM벼의 분자생물학적 분석

농업적, 환경적, 경제적 및 사회적인 이익으로 유전자변형

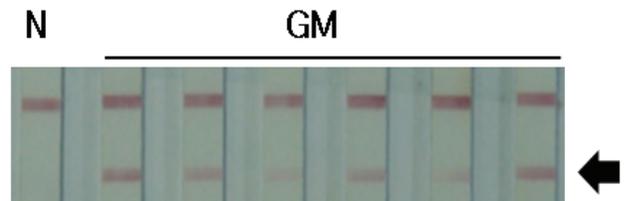


**Fig. 1.** Confirmation of the T-DNA genes on the OsCK1 rice and non-GM rice. M: 100bp DNA ladder, N: non-GM rice; Nakdong, GM: OsCK1 rice LS28 30-32-20-9-7 lines.

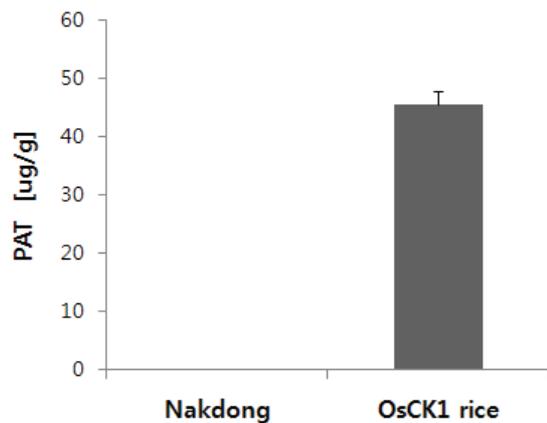
(GM) 작물이 점점 더 많은 국가에서 재배되고 있다. 국내에서도 주요 작물을 대상으로 유용 GM작물이 개발되고 있으며, 벼 유래의 Choline kinase 유전자(*OsCK1*)를 과발현시켜 벼도열병과 벼흰잎마름병에 저항성을 나타내는 병저항성 GM벼가 개발되었다(Lee *et al.*, 2007). 벼 유래의 병저항성 유전자인 Choline kinase (*OsCK1*)와 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 제초제저항성 유전자인 phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*)가 도입된 병저항성 GM (OsCK1)벼 이벤트(event LS28 30-32-20-9-7)와 비형질전환 낙동벼를 수원 GM격리포장에서 재배한 후 비표적 생물체인 잉어와 미꾸리에 대한 독성평가를 실시하였다.

비표적 생물체 독성 평가 시료로 사용된 병저항성 GM벼로부터 *OsCK1*와 *PAT* 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 PCR 분석용 특이적인 프라이머를 제작하였다. *OsCK1* 유전자는 벼 유래 유전자이므로 내재된 *CK1* 유전자와 구별하기 위하여 T-DNA 제작시에 사용된 종결 유전자인 *PinII*와 결합된 형태로 검출되도록 프라이머를 제작하였고, 음성 대조군으로 벼 내재유전자 검출 프라이머는 *Actin* 유전자의 염기로부터 제작하였다(Table 1). PCR 분석 결과, *OsCK1/PinII*는 병저항성 GM벼에서만 625 bp 밴드가 검출되었고, 비형질전환체인 낙동벼에서는 검출되지 않았다. *PAT*도 병저항성 GM벼에서만 466 bp 크기의 밴드가 검출되었고, 비형질전환체인 낙동벼에서는 검출되지 않았다. 반면에 벼 내재유전자인 *Actin*은 비형질전환체인 낙동벼와 병저항성 GM벼 모두에서 137 bp 밴드가 검출되었다. 이는 본 실험에 사용된 병저항성 GM벼에 *OsCK1*와 *PAT* 유전자가 도입되었고, 안정적으로 유지되고 있음을 확인하였다(Fig. 1).

병저항성 GM벼에서 *Bar* 유전자(*PAT*) 단백질의 발현을 검정하기 위하여 항체를 이용한 lateral flow strip test (LFST)분석을 실시하였다. 분석에 사용된 병저항성 GM벼와 낙동벼의 시료에 대하여, *PAT* 단백질 확인용 항체가 표지되



**Fig. 2.** Confirmation of *PAT* expression for OsCK1 rice by using immunostrip. Immunostrip tests for the *PAT* detection. N: non-GM rice; Nakdong, GM: OsCK1 rice LS28 30-32-20-9-7 lines.



**Fig. 3.** *PAT* protein Levels ( $\mu\text{g/g}$  Dry weight) in non-GM rice (Nakdong) and OsCK1 rice. Values are the Mean $\pm$ SD of triplicate measures.

어 있는 immunostrip을 이용하여 단백질 발현을 분석한 결과, 병저항성 GM벼에서만 특이적으로 단백질이 발현되었으며, 대조구인 낙동벼에서는 발현되지 않았다(Fig. 2). 또한 병저항성 GM벼에서의 *PAT* 단백질 발현량을 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하여 분석한 결과, 45.44

$\pm 2.23 \mu\text{g/g}$  수준의 PAT 단백질이 특이적으로 발현되었으며 낙동벼에서는 발현되지 않음을 확인하였다(Fig. 3). 이는 해충저항성 BT벼에서 발현되는 비슷한 수준으로 병저항성 GM벼에서도 안정적으로 PAT 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었다(Kim *et al.*, 2013).

### 병저항성 GM벼의 어류에 대한 처리 농도 검정

병저항성 GM벼와 낙동벼의 미꾸리 및 잉어에 대한 급성독성 여부를 처리 농도별로 분석하기 위해 각 시료를 0, 10, 100, 1000 및 5,000 mg/L의 농도로 시험용수에 현탁 처리하였으며 각각 24, 48, 72, 및 96시간 마다 독성여부를 분석하였다. 96시간 동안 지수식으로 실시하여 각 농도 별 노출된 어류 10마리에 대한 생사 수 및 일반중독증상을 측정한 결과, 96시간 후 최고 처리농도인 5,000 mg/L 조건에서 미꾸리와 잉어 모두 치사여부가 관찰되지 않았다(Table 2). 각 시료의 0, 10, 100, 1000 및 5,000 mg/L 처리 농도별 탁도를 측정된 결과, 평균 3.42, 6.23, 40.76, 261.8, 2,214 NTU로 측정되었다. 이를 기반으로, 병저항성 GM벼의 어류에 대한 급성독성 시험의 최종 농도로 5,000 mg/L로 설정하여 한계시험을 수행하였다.

### 시료처리용 시험용수의 수질변화 검정

잉어와 미꾸리에 대한 환경생물 독성 생물검정은 기존의 시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2010-29호)에 명시된 독성조사법을 바탕으로 하였는데, 유기 및 무기 독성물질에 모두 민감하게 반응하고 농약의 독성 측정을 위하여 일반적으로 24 또는 48시간이 요구된다. 본 시험에서는 처리기간(24, 48, 72, 96시간) 동안 시험용수의 수질검사를 1일 1회 모든 수조에 대하여 pH, DO (Dissolved Oxygen) 및 수온을 조사하였다. 또한, 시험 기간 동안에 DO 측정결과 48시간 경과 후 DO가 포화용존산소량의 60% 이하로 내려갈 것이 예상되는 예비결과를 바탕으로 매 24시간 간격으로 약 1시간 동안 병저항성 GM벼와 낙동벼 처리구 및 음성 대조구에 산소를 공급하여 주었다. 시험기간 중 배양 수조내 pH는 분석결과, 미꾸리 처리구의 경우, 낙동벼와 병저항성 GM벼에 대하여 각각 평균  $7.27 \pm 0.69$  (7.17~7.34) 및  $7.32 \pm 0.15$  (7.04~7.42)이었으며, 잉어 처리구의 경우 각각 평균  $7.31 \pm 0.06$  (7.29~7.40) 및 평균  $7.21 \pm 0.16$  (6.91~7.31)로 측정되었다(Table 3). 처리 수조내의 DO 분석결과 미꾸리 처리구에서는 낙동벼와 병저항성 GM벼에 대하여 각각 평균  $6.58 \pm 0.45$  mg/L (6.19~7.33mg/L) 및  $6.49 \pm 0.57$  mg/L (6.07~7.49 mg/L)이었으며, 잉어 처리구에서 각각 평균  $6.55 \pm 0.62$  mg/L (6.02~7.55 mg/L) 및  $6.82 \pm 0.66$  mg/L (6.06~7.63 mg/L)이었다(Table 4). 처리 수조내의 수온변화의 경우 미꾸리 처리구에서 낙동벼 및 병저항성 GM벼에 대하여 각각 평균  $22.98 \pm 0.44$  °C 및  $22.88 \pm 0.33$  °C 수준을 보였고, 잉어 처리구에서는 각각 평균  $22.98 \pm 0.28$  °C 및  $22.76 \pm 0.27$  °C 수준을 보여 처리구간에 큰 차이가 없음을 보였다(Table 5). 미꾸리와 잉어에 대한 낙동벼와 병저항성 GM벼의 처리

에 따른 pH 및 수온의 변화를 분석한 결과 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 각 처리구의 DO 수준이 음성대조구에 비해서는 감소하는 경향을 보였다.

DO수준의 경우, 미꾸리의 음성대조구에서  $7.44 \pm 0.44$  mg/L (7.05~8.22 mg/L) 수준이었고 낙동벼( $6.58 \pm 0.45$  mg/L)와 병저항성 GM벼( $6.49 \pm 0.57$  mg/L) 처리구에서는 감소 경향을 보였고, 잉어의 경우도 음성대조구( $7.39 \pm 0.41$  mg/L)에 비하여 낙동벼( $6.55 \pm 0.62$  mg/L)와 병저항성 GM벼( $6.82 \pm 0.66$  mg/L) 처리구에서 감소하는 경향을 보였다. 이와 같이 음성대조구에 비해 낙동벼 및 병저항성 GM벼 처리구에서 DO가 감소한 이유는 처리구의 시료가 유기물이며, 대상 생물체인 미꾸리와 잉어의 생리작용(호흡 등)과 유기물 분해 작용 등의 영향을 받은 것으로 판단되었다.

### 병저항성 GM벼의 어류에 대한 급성독성시험

병저항성 GM벼와 낙동벼에 의한 미꾸리와 잉어의 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였으며, 각 농도 별 노출 어류 10마리에 대한 생사수, 일반중독증상, 체중 및 전장을 관찰하여 측정하였다. 병저항성 GM벼와 낙동벼의 처리시 각 농도별(0, 10, 100, 1000 및 5,000 mg/L) 처리시간(24, 48, 72, 96시간)에 따른 치사여부 분석 실험결과 최고농도인 5,000 mg/L에서 미꾸리 및 잉어 모두 치사여부를 보이지 않았다(Table 2).

Oh 등(2012)은 해충저항성 Bt벼에 대한 어류 영향 평가 시에 최대 1,000 mg/L 농도로 설정하여 실험을 수행하였으며(Oh *et al.*, 2012), 이는 일반적으로 최대위해농도(MHD, Maximum Hazard Dose)로 GM작물이 발현하는 목표 단백질의 최대농도인 포장기대농도(Expected Environment Concentration)의 10배(미국 환경보호청 기준)수준에서 설정한 것이나, 정확한 96hr-LC<sub>50</sub>을 예측할 수 없었다. Kim 등(2007)은 어류의 탁수에 대한 영향 평가 시에 탁수 200 NTU 수준에서 48시간 노출시에 아가미 주름의 표면적을 감소시켜 장기간에 걸친 영향시 어류의 호흡에 지장을 초래할 수 있다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2007). 어류의 아가미는 수중 속에서 효율적인 가스교환을 할 수 있는 체조직 중 가장 섬세하게 적응된 조직학적 구조를 갖고 있으며, 서식하는 환경에 직접 노출되어 있기 때문에 각종 유해인자의 침입과 이들에 의한 손상을 쉽게 받을 수 있는 곳이며, 이는 수중에 독성물질이 함유되거나 탁수와 같은 수환경의 급격한 변화와 같은 환경 스트레스를 받게 되면 아가미가 조직학적으로 곤봉화(club-shaped) 되거나 새변(gill lamellae)은 두꺼운 상피층을 이루게 되어, CO<sub>2</sub> 교환을 저하로 인해 호흡면적의 손실과 호흡기능의 악화가 나타날 수 있다(Ferguson 1989; Shin *et al.*, 2011).

본 실험에서는 병저항성 GM벼가 어류에 직접적인 영향을 줄 수 있는 최고 농도로 5,000 mg/L를 설정하여 실험을 수행하였다. 이는 포장기대농도(EEC)의 100배 이상의 농도이고, 시험용수의 탁도가 1,000 mg/L(261 NTU)의 8.5배인 2,214 NTU 수준으로 실험어종인 미꾸리와 잉어의 생육환경

**Table 2. Cumulative immobility of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* in the range-finding test**

Sample	Concentration (mg/L)	Number of fish	Number of dead fish				Mortality (%)	
			24h	48h	72h	96h	48h	96h
Loach	non-GM rice	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0
		1000	0	0	0	0	0	0
		5000	0	0	0	0	0	0
	OsCK1 rice	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0
		1000	0	0	0	0	0	0
		5000	0	0	0	0	0	0
Carp	non-GM rice	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0
		1000	0	0	0	0	0	0
		5000	0	0	0	0	0	0
	OsCK1 rice	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0
		1000	0	0	0	0	0	0
		5000	0	0	0	0	0	0

**Table 3. Changes of pH**

Sample	Concentration (mg/L)	0h	24h	48h	72h	96h	
Loach	non-GM rice	0	7.41	7.13	7.04	7.26	7.27
		5000	7.30	7.17	7.25	7.33	7.34
	OsCK1 rice	0	7.41	7.13	7.04	7.26	7.27
		5000	7.35	7.04	7.42	7.39	7.40
Carp	non-GM rice	0	7.42	7.45	7.21	7.28	7.03
		5000	7.33	7.40	7.29	7.34	7.22
	OsCK1 rice	0	7.42	7.45	7.21	7.28	7.03
		5000	7.30	7.31	7.27	6.91	7.27

**Table 4. Changes of DO**

Sample	Concentration (mg/L)	0h	24h	48h	72h	96h	
Loach	non-GM rice	0	8.22	7.28	7.05	7.38	7.27
		5000	7.33	6.33	6.75	6.19	6.31
	OsCK1 rice	0	8.22	7.28	7.05	7.38	7.27
		5000	7.49	6.28	6.04	6.43	6.22
Carp	non-GM rice	0	8.11	7.20	7.41	7.18	7.09
		5000	7.55	6.58	6.56	6.02	6.04
	OsCK1 rice	0	8.11	7.20	7.41	7.18	7.09
		5000	7.63	7.07	7.17	6.21	6.06

**Table 5. Changes of water temperature**

Sample	Concentration (mg/L)	0h	24h	48h	72h	96h	
		Loach	non-GM rice	0	22.5	23.3	22.6
	5000	22.5	23.3	22.5	23.4	23.2	
	OsCK1 rice	0	22.5	23.3	22.6	23.3	23.1
	5000	22.5	22.9	22.6	23.1	23.3	
Carp	non-GM rice	0	22.8	22.9	22.4	22.8	23.1
	5000	22.5	23.2	23.0	23.2	23.0	
	OsCK1 rice	0	22.8	22.9	22.4	22.8	23.1
	5000	22.6	22.9	22.4	22.8	23.1	

**Table 6. Cumulative immobility of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* in the limit test**

Sample	Concentration (mg/L)	Number of fish	Number of dead fish				Mortality (%)		
			24h	48h	72h	96h	48h	96h	
Loach	non-GM rice	0	10	0	0	0	0	0	0
		5000	10	0	0	0	0	0	0
	OsCK1 rice	0	10	0	0	0	0	0	0
		5000	10	0	0	0	0	0	0
Carp	non-GM rice	0	10	0	0	0	0	0	0
		5000	10	0	0	0	0	0	0
	OsCK1 rice	0	10	0	0	0	0	0	0
		5000	10	0	0	0	0	0	0

**Table 7. Abnormal response of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* in the limit test**

Sample	Concentration (mg/L)	Abnormal reponse				
		24h	48h	72h	96h	
Loach	non-GM rice	0	NOR <sup>1)</sup>	NOR	NOR	NOR
		5000	NOR	NOR	NOR	NOR
	OsCK1 rice	0	NOR	NOR	NOR	NOR
		5000	NOR	NOR	NOR	NOR
Carp	non-GM rice	0	NOR	NOR	NOR	NOR
		5000	NOR	NOR	NOR	NOR
	OsCK1 rice	0	NOR	NOR	NOR	NOR
		5000	NOR	NOR	NOR	NOR

1) Abbreviation for abnormal response.  
NOR : normal.

**Table 8. LC<sub>50</sub> values**

Test item	LC <sub>50</sub> (mg/L) <sup>2)</sup>		NOEC <sup>4)</sup> (mg/L)	Body Weight (g)	Total length (cm)
	48h	96h			
Control	-	-	-	1.93±0.12	7.78±0.33
Loach	0.21 (0.17~0.26) <sup>3)</sup>	0.20 (0.17~0.25)	-	1.71±0.10	7.71±0.15
non-GM rice	>5000	>5000	5000	1.93±0.08	7.90±0.25
OsCK1 rice	>5000	>5000	5000	1.95±0.11	7.82±0.19
Control	-	-	-	0.99±0.10	3.91±0.15
Carp	0.14 (0.115~0.161)	0.11 (0.092~0.126)	-	0.85±0.04	3.40±0.09
non-GM rice	>5000	>5000	5000	0.98±0.11	3.92±0.23
OsCK1 rice	>5000	>5000	5000	0.98±0.08	3.93±0.16

- 1) Pentachlorophenol sodium salt.
- 2) Median lethal concentration.
- 3) 95 % confidence limits.
- 4) No observed effect concentration.

에 제약 요인으로 작용할 수 있을 것이며, GM작물의 어류에 대한 영향 평가 실험중에 최고 농도로 실험한 것이다.

5,000 mg/L 수준에서 낙동벼와 병저항성 GM벼의 한계 시험(limit test)을 수행한 결과, 96시간 경과 시까지 각 처리구에서 미꾸리와 잉어에 치사어가 관찰되지 않았다(Table 6). 또한 시험 기간 중 음성대조구 및 처리구간에 일반중독증상 또는 특이증상은 관찰되지 않았다(Table 7). 처리에 따른 체중 및 전장에 대한 분석 결과, 미꾸리 실험에서 낙동벼 처리구는  $1.93 \pm 0.08$  g 및  $7.90 \pm 0.25$  cm 였으며, 병저항성 GM벼 처리구는  $1.95 \pm 0.11$  g 및  $7.82 \pm 0.19$  cm로 측정되었다. 잉어의 경우, 낙동벼 처리구는  $0.98 \pm 0.11$  g 및  $3.92 \pm 0.23$  cm 이었고, 병저항성 GM벼 처리구는  $0.98 \pm 0.08$  g 및  $3.93 \pm 0.16$  cm 수준을 보였다(Table 8). 무영양농도 분석의 경우, 시험기간중 낙동벼와 병저항성 GM벼에 의한 중독증상을 보이지 않았고 최대농도(5,000 mg/L)조건에서 96시간 경과시까지 치사어가 발생하지 않았다. 따라서 낙동벼와 병저항성 GM벼에 의한 미꾸리와 잉어의 급성독성 시험의 96시간-LC<sub>50</sub> 값은 5,000 mg/L 이상인 것으로 추정하였다.

이번 어류에 대한 영향 평가는 Kim 등(2007)이 보고한 탁도 200 NTU 보다 약 11배 이상 높은 5,000 mg/L (2,214 NTU)수준에서 수행되었음에도 96시간 급성 독성 평가에 따른 이상 증후는 발견되지 않았다. 그러나, Kim 등(2007)의 보고에 따르면 장기간의 영향 평가는 어류의 아가미 조직에 영향을 미칠 수 있기 때문에 향후, 어류의 아가미, 신장 등의 이상 유무 검정을 포함한 조직학적 검사 및 혈액학적 항목이 평가 요소에 반영될 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 통해서 *OsCK1*와 *PAT* 유전자가 형질전환된 병저항성 GM벼가 비표적 생물체인 미꾸리와 잉어에 미치는 영향을 분석한 결과, 비형질전환 낙동벼와 동등함을 확인하였다. 따라서 낙동벼와 병저항성 GM벼가 농경지, 수로, 하천 등의 환경에 방출되었을 때 비표적 생물체인 어류에 미치는 환경-생물학적인 영향이 유사하다고 판단할 수 있다. 또한 본 실험에서 적용되었던 급성독성영향 뿐만 아니라 GM작물 환경위해성 평가를 위해서는 생태영향 평가와 생식, 유전독성 분석을 통한 안전성평가 표준 가이드라인을 구축하여야 하며 본 실험결과는 이를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 요 약

본 연구는 병저항성 *OsCK1* 유전자와 제초제저항성 *PAT* 유전자가 도입된 병저항성 GM벼에서 도입 유전자의 발현 검출과 수서환경의 비표적 생물체인 잉어와 미꾸리에 미치는 영향을 확인하기 위해 수행되었다. 병저항성 GM벼에 도입된 *OsCK1*와 *PAT* 유전자의 PCR 분석 결과, 병저항성 GM벼에서만 특이적인 밴드가 검출되었으며, *PAT* 단백질 발현량을 ELISA 분석한 결과, 병저항성 GM벼에서만  $45.44 \pm 2.23$   $\mu\text{g/g}$  수준으로 검출되었고, 모품종인 낙동벼에서는 검출되지 않았다. 병저항성 GM벼와 낙동벼의 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)와 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성

독성시험을 실시한 결과, 48시간 및 96시간-LC<sub>50</sub> 은 5,000 mg/L 이상으로 나타났다. 48시간 및 96시간 무영양농도 (NOEC)는 5,000 mg/L이었다. 급성독성 시험기간 중 병저항성 GM벼와 낙동벼간의 pH, DO, 수온, 체중 및 전장에 대한 유의적인 결과는 나타나지 않았다.

## Acknowledgment

This study was carried out with the support of the "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ00960901 2013)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic Korea.

## References

- De Vries J., Wackernagel W., 2005. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants, *Plant and Soil* 266, 91-104.
- Ferguson, H.W., 1989. Gill and pseudobranchs In: Systemic pathology of fish, *Iowa State University press/ames*. 11-40.
- 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.
- James, C., 2012. The global status of commercialized biotech/GM crops: 2012, *ISAAA Briefs* 44.
- Jung, S., Lee, Y., YANG, K., Lee, S.B., Jang, S.M., Ha, S.B., BACK, K., 2004. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance, *Plant Cell Environ.* 27, 1436-1446.
- Kim, J.H., Seo J.W., Na, Y.E., An, K.G., 2007. Ecological health assessments on turbidwater in the downstream after a construction of Yongdam Dam, *Korean LJ. Limnol.* 40, 130-142.
- 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, *Food Sci. Biotechnol.* 22, 195-200.
- Kim, H.J., Lee, S.M., Kim, J.K., Ryu, T.H., Suh, S.C., Cho, H.S., 2013. Quantification of mCry1Ac1 and PAT

- Proteins over time in genetically modified pepper developed in Korea, *Food Chem.* 58, 10906–10910.
- Lee, H.S., Ryu, T.H., Jung, H.Y., Park, S.K., Park, G.H., Sohn, J.K., Kim, K.M., 2010. Characteristics of agronomy to vitamin A strengthening rice at large scale GMO field, *Korean J. Breed. Sci.* 42, 56-60.
- Lee, J.S., Suh, S.C., Lee, Y.H., Kim, Y.H., Heo, S.K., 2007. OsCK1 gene from *Oryza sativa*, expression vector comprising the gene, transformants transformed with the vector and production method of the transformants, Korean Patent No. 100682129.
- 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., Park, S.Y., Sohn, S.I., Ryu, T.H., Kim, J.K., Kim, J.S., Ahn, H.I., Ha, S.H., Park, J.S., Ahn, B.O., Cho, H.S., Suh, S.J., 2012. Molecular Biological Analysis of Carotenoid-Biofortified Rice and Its Effect on *Daphnia magna* Feeding, *Korean J. Intl. Agri.* 24, 477-484.
- Oh, S.K., Baek, K.H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Park, J.M., Cho, H.S., Kim, E.A., Lee, S., Choi, D., 2010. CaMsrb2, pepper methionine sulfoxide reductase B2, is a novel defense regulator against oxidative stress and pathogen attack, *Plant Physiol.* 154, 245-261.
- Shin, K.S., Lee, S.M., Lim, S.H., Woo, H.J., Cho, H.S., Lee, K.R., Lee, M.C., Kweon, S.J., Suh, S.C., 2009. Research articles : Molecular biological characteristics and analysis using the specific markers of leaf folder-resistant GM rice, *Plant Biotechnology* 36, 115-123.
- Shin, K.S., Woo, H.J., Lee, K.J., Kim, K.H., Kweon, S.J., Suh, S.C., 2010. Detection of high  $\alpha$ -tocopherol GM perilla developed in Korea, *J Intl Agri.* 22, 399-405.
- Shin, M.J., Lee, J.E., Seo, E.W., 2011. Changes of gill structure and identification of genes by Muddy water exposure in *Cyprinus carpio*, *Korea J. Limnol.* 44, 95-101.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiyaa, H., Hinata, K., 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts, *Nat Biotechnol* 6, 1072-1074.
- 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.