

Research Article

Open Access

병저항성 GM(*OsCK1*)벼의 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 급성독성 평가

오성덕,¹ 이기종,^{1*} 박수윤,¹ 류태훈,¹ 서상재²

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ²경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

Acute Toxicity Evaluation to *Daphnia magna* of Disease Resistant(*OsCK1*) Rice

Sung-Dug Oh,¹ Kijong Lee,^{1*} Soo-Yun Park,¹ Tae-Hun Ryu¹ and Sang Jae Suh² (¹Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea, ²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

Received: 31 March 2014 / Revised: 14 April 2014 / Accepted: 1 May 2014

Copyright © 2014 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 *Oryza sativa* and *Streptomyces hygroscopicus* into the genome of the rice, Nakdongbyeo. With the potential problems of safeties, the evaluations on non-target organisms are essentially required for the environmental risk assessment of genetically modified (GM) crops. In the present study, we conducted the evaluation of acute toxicity on *Daphnia magna* that commonly used as a model organism in ecotoxicological studies for non-target organism evaluation.

METHODS AND RESULTS: Effect of acute toxicity to *Daphnia magna* by each concentration were investigated in the disease resistant (*OsCK1*) rice and non-genetically modified (non-GM) rice, Nakdongbyeo, as concentration (0, 1,000, 1,800, 3,240, 5,830, 10,500 and 20,000 mg/L). The *OsCK1* rice used for the test was confirmed to express

the *OsCK1/PAT* gene by the PCR(Polymerase chain reaction) and western blot analysis. Feeding test showed that no significant differences in cumulative immobility and abnormal response of *Daphnia magna* fed on *OsCK1* rice or non-GM rice. The 48hr-EC₅₀ values showed no difference between *OsCK1* rice (3,147.18 mg/L) and non-GM rice (3,596.27 mg/L).

CONCLUSION: This result suggested that there was no significant difference in toxicity to *Daphnia magna* between *OsCK1* rice and non-GM counterpart.

Key words: *Daphnia magna*, Disease resistant transgenic rice, Risk assessment

서론

생명공학(Genetically Modified, GM) 작물은 2013년에 1억 7,530만 헥타르가 재배되어 처음 상업적으로 재배되기 시작한 1996년보다 무려 100배 이상 증가하였고, 전 세계 36개국에서 27작물 336이벤트의 GM작물이 재배 승인된 것으로 농업생명공학 응용을 위한 국제서비스(ISAAA)는 보고하고 있다(James, 2013). GM작물은 작물 생산에 필요한 노동력과 농기계, 농약 등의 사용 절감에 따른 경제적인 이익뿐만

*교신저자(Corresponding author): Kijong Lee
Phone: +82-31-299-1142; Fax: +82-31-299-1122;
E-mail: leekjong@korea.kr

아니라(Owen, 2000), 기후 변화 등의 농업환경 변화에 지속 가능한 작물의 생산을 가능케 한다(Brookes and Barfoot, 2006). 그러나, GM작물이 재배되기 시작한 1996년부터 재배 면적의 증가와 함께, GM작물 재배 지역의 환경 및 생태계 위해성과 식품 섭취에 따른 인체 영향 및 안전성에 대한 우려도 여전히 제기되고 있다.

2013년까지 우리나라에서 상업적으로 재배가 승인된 생명공학작물은 없으나 농촌진흥청, 대학 및 기업에서 벼, 잔디, 고추, 감자, 배추, 토마토 등을 중심으로 다양한 기능의 유전자 도입이 시도되고 있으며, 기능이 검증된 일부 GM작물의 이벤트 계통들은 안전성평가를 통한 실용화를 진행하고 있다. GM작물들의 실용화 단계는 GM작물에 도입된 유전자의 발현에 의한 독성, 알레르기 및 영양 성분 등에 관한 식품안전성 평가 및 유전자이동성, 생태계 교란 등에 대한 환경위해성 평가를 수행해야하며 그 중에서도, 특히 도입 유전자 산물의 표적 및 비표적 생물체에 대한 영향 평가가 GM작물의 안전성 심사의 필수 항목으로 요구되고 있다(Oh et al., 2013; De Vries and Wackernagel, 2005).

Toriyama 등(1988)에 의해서 최초 형질전환체 벼(*Oryza sativa*)가 개발됨으로써 농업생명공학 분야에 큰 관심을 일으키며 연구가 시작되었으며(Toriyama et al., 1988), 미국, 일본, 중국, 인도 등에서 활발하게 GM벼 개발이 이루어지고 있다. 국내에서도 제초제저항성, 영양성분 강화, 해충저항성, 가뭄저항성 등의 다양한 기능의 유전자들이 도입된 GM벼의 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; Oh et al., 2013).

벼는 담수조건에서 생육하므로 GM벼의 실용화를 위한 환경위해성 평가 항목에서 일반적인 평가 대상인 나비목, 노린재목, 딱정벌레목 등의 대표적인 육상 곤충 이외에 물벼룩, 잉어, 미꾸리 등의 수서환경 비표적 생물체에 대한 평가도 이루어져야 한다. 최근 환경위해성 평가 항목인 비표적 수서생물종에 미치는 영향을 분석하기 위하여 해충저항성 Bt벼와 비타민 A강화벼가 물벼룩(*Daphnia magna*)에 미치는 영향이 분석되었고, 어류에 미치는 영향에 대한 위해성 평가가 보고되었다(Oh et al., 2011a; Oh et al., 2011b; Oh et al., 2012a; Oh et al., 2012c).

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 물벼룩을 대상으로 병저항성 GM벼에 대한 영향을 분석하였다. 병저항성 GM벼의 choline kinase (*OsCK1*) 유전자의 도입과 PAT 단백질 발현량을 확인한 후, 모본으로 사용된 낙동벼와 함께 환경위해성 평가 항목 중 수생 생물종인 물벼룩에 미치는 영향을 조사하였으며, 본 시험을 통해 국내 개발 GM작물의 환경위해성

자료 생산뿐만 아니라, GM벼의 환경위해성 연구 및 수서환경 생물체의 위해성평가 기준 설정을 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

병저항성 GM벼(event LS28 30-32-20-9-7)와 비형질전환 모품종인 낙동벼를 국립농업과학원 GMO 격리 포장(경기도 수원시 서둔동)에서 재배하고 잎과 줄기부위를 수확하여(출수기) 동결건조한 후(일신랩 FD8518, 한국), 분쇄기를 이용하여(한일전기, HMF-3100S, Korea) 분말화 하였다. 분쇄된 시료는 600 μ m의 표준망체(청계산업, 한국)를 통과시킨 후, 사육용수에 현탁하여 급성독성 분석용 시료로 이용하였다. 시험물질인 부형제를 수질오염공정시험기준(ES 04751.1)의 물벼룩을 이용한 급성독성시험법(2010)에 따라 조제된 배양액에 현탁시켜 조제하였다.

Genomic DNA 분리 및 PCR(Polymerase chain reaction) 검정

병저항성 GM벼와 낙동벼 시료를 각 1 g씩을 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(Polymerase chain reaction) 검정을 위하여 dNTP (10mM) 4 μ l, 10 X PCR buffer 4 μ l, 프라이머 각 20 μ M, f-Taq DNA polymerase 1 unit(Solgent, Korea), template genomic DNA 200 pg을 추가한 후 최종 반응 부피를 40 μ 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.

병저항성 GM(*OsCK1*)벼의 발현 단백질 검정

병저항성 GM벼에 choline kinase(*OsCK1*) 유전자와 함께 도입된 Phosphinothricin acetyltransferase(*PAT*) 유전자의 단백질 발현량을 확인하기 위하여 western blot 검정을 실시하였다. 병저항성 GM벼와 낙동벼 시료를 각 1 g씩을 취하고, 막자사발에서 액체질소와 함께 분말화 하였다. 분말화된 시료에 단백질 추출용액(0.5 M tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.7 M sucrose, 0.1 M KCl, protease inhibitor cocktail)

을 첨가한 후, 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 20분)하여 단백질을 분리, 추출한 후 bovine serum albumin(BSA)을 기준으로 protein assay reagent(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 추출한 단백질을 30 µg씩 10% SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) 겔에서 전기영동 후, nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Hercules, CA)에 전이하였다. 전이된 membrane을 blocking 용액(5% non-fat skim milk, 0.02% sodium azide, TBST용액)으로 실온에서 2시간 동안 블로킹한 후, PAT antibody(1차 항체, 1:1000)으로 4°C에서 12시간동안 처리하였고, anti-rabbit IgG-HRP antibody(2차 항체, 1:2000)로 4°C에서 12시간동안 처리하였다. 각 항체를 처리한 후, TBST 용액으로 10분간 4번씩 세척하였다. 면역 반응된 단백질은 ECL western blotting detection reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하여 검출하였다.

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).

급성독성 평가를 위한 물벼룩 배양 조건

물벼룩(*Daphnia magna*)은 수온 20±2°C, 500~1000 Lux 광조건 16시간, 암조건 8시간의 환경조건에서 사육하였으며, 먹이는 오전에 1회 *Chlorella vulgaris* (ATCC, Manassas, USA)를 공급하였다. 배양액은 pH 7.6~8.0, 경도는 160~180 mg CaCO₃/L, 알칼리도는 110~120 mg CaCO₃/L, 용존산소는 3.0 mg/L 이상 유지되도록 하여 사용하기 전 24시간 정도 폭기시켜 사용하였다. 수질의 경도는 한국산업규격 KSI3206의 Inductively coupled plasma emission spectroscopy에 의해, 알칼리도는 Standard method(21th edition, APHA, AWWA, WEF, USA)의 염산적정법에 의해 측정하였으며, 검사결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

물벼룩 급성독성 시험의 병저항성 GM(*OsCK1*)벼와 낙동벼 처리 조건

병저항성 GM벼와 낙동벼의 시료에 대한 유효농도 설정 예비시험결과, 48시간 EC₅₀값이 1,000.00~10,497.60 mg/L 범위 내에 있을 것으로 추정되어 1,000, 1,800, 3,240, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L의 농도에서 시험을 수행하였다. 시험용액은 조제된 시료를 0.100, 0.180, 0.324, 0.583, 1.050 및 2.000 g씩 정확히 칭량하여 100 mL의 배양액에 반복구당 각각 처리하여 시험용액으로 사용하였으며, 대조구로 시험용수인 배양액을 음성대조구로 설정하였다. 시험에는 생후 24시간이내의 비슷한 크기의 어린 물벼룩을 사용하였으며, 시험

개체수는 농도당 각 10마리씩, 3반복으로 처리하였다. 시험용액은 200 mL 용량의 곤충사육용기 (100 x 40 mm)에 100 mL를 처리하였으며, 노출환경은 사육조건과 동일한 수온 20±2°C를 유지하였다.

물벼룩 급성독성 분석을 위한 조사항목

물벼룩에 대한 급성독성여부를 규명하기 위하여 각 처리구에 대하여 24시간 경과 후 일반중독증상, 특이증상 및 유영저해 개체수 등을 분석하였다. 유영저해의 판정을 위해 시험용기를 조용히 움직이고 15초 후에 촉각 및 후복부 등은 움직이나 유영하지 못하는 것을 유영저해 물벼룩으로 간주하였다. 시험기간 중 시료 처리직후와 종료 시의 각 처리구에 대하여 pH 및 Dissolved oxygen(DO)를 조사하였으며, 수온은 24시간 간격으로 조사하였다. pH와 수온은 HANNA사의 pH meter를 사용하였고, DO는 ISTEK사의 DO-300L DO meter를 사용하여 측정하였다. EC₅₀ 산출 및 무영향농도(NOEC, No observed effect concentration)는 시험물질 처리 후 48시간의 유효성분에 대한 반수영향농도(EC₅₀) 및 95% 신뢰한계를 probit분석법에 의해 산출하였다. 무영향농도는 중독증상이 없고 유영저해가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

결과 및 고찰

병저항성 GM(*OsCK1*)벼의 분자생물학적 분석

전세계적으로 농업적 및 경제적인 이유로 다양한 유전자 변형(GM) 작물이 재배되고 있다. 국내에서도 주요 식량 작물인 벼를 대상으로 다양한 유전자가 도입된 GM작물들이 개발되고 있으며, 근래에 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 농업 환경 지표종인 비표적 생물체 물벼룩에 대한 독성평가를 실시하였다.

물벼룩 영향평가 시료로 사용된 병저항성 GM벼의 *OsCK1*와 *PAT*유전자의 삽입을 확인하기 위하여 PCR 분석용 특이 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 620 bp 밴드가 검출되었고, 비형질전환체인 낙동벼에서는 검출되지 않았다. *PAT*도 병저항성 GM벼에서만 445 bp 크기의 밴드가 검출되었고, 비형질전환체인 낙동벼에서는 검출되

지 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). 수서 환경의 비표적 생물체인 물벼룩에 미치는 영향을 평가하기 이전에 공시 재료인 낙동벼와 병저항성 GM벼의 *PAT* 단백질 발현 분석을 위해 western blot 검정을 실시하였다. GMO격리포장에서 재배한 병저항성 GM벼와 낙동벼에 대하여, 추출한 단백질을 SDS-PAGE 겔에서 전기영동 후, 전이된 nitrocellulose membrane에 *PAT* 항체를 이용하여 단백질 발현을 분석한 결과, 병저항성 GM벼에서만 21 kDa에 특이적으로 단백질 밴드가 검출되었으며, 대조구인 낙동벼에서는 단백질이 검출되지 않았다(Fig. 2). 병저항성 GM벼 시료의 *PAT* 단백질 발현량을 검증하고자 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하여 분석한 결과, $45.44 \pm 2.23 \mu\text{g/g}$ 수준의 *PAT* 단백질이 특이적으로 발현되었으며(Table 1), Kim 등(2013) 의한 해충저항성 Bt벼와 유사한 수준으로 병저항성 GM벼에서도 안정적으로 제초제 저항성 *PAT* 단백질이 발현되고 있으며, 이를 시료로 사용하여 물벼룩에 대한 급성독성 평가를 수행하기에 적합함을 확인할 수 있었다(Kim et al., 2013).

물벼룩 급성독성 시험용수의 수질변화

본 시험에 사용된 시험용수에 대한 시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 직전과 시험 종료시 수온, pH를 조사하였다. 시험기간 중 시험용수의 수온은 낙동벼 처리구에서는 평균 $20.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($20.4 \sim 21.2^\circ\text{C}$)이었고, 병저항성 GM벼(*OsCK1* rice)처리구에서는 평균 $21.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($20.5 \sim 21.5^\circ\text{C}$)로 측정되었다(Table 3). 각 시험농도에서 품종간 물벼룩의 사육 온도에 대한 t-test 검정결과 0, 1,000, 1,800, 3,240, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 48시간후에는 각각 *p* 값이 1, 0.27, 0.53, 0.09, 0.85, 0.76, 0.11이었다. 따라서 모든 처리농도에서 두 품종간 사육 온도에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$).

pH는 0시간(시험용수에 시료 현탁시) 처리조건에서 낙동벼 처리구는 평균 7.13(6.49~7.50), 병저항성 GM벼 처리구는 평균 7.06(6.46~7.42)로 측정되었다. 시험 48시간에서는

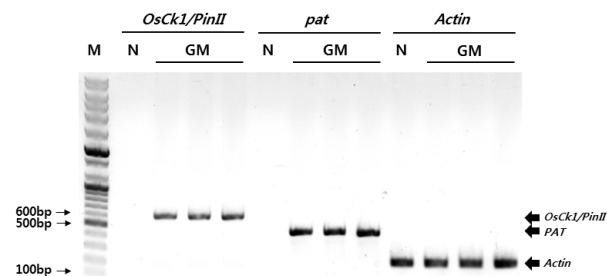


Fig. 1. Confirmation of the T-DNA genes on the Disease Resistant (*OsCK1*) rice and non-Genetically modified (non-GM) rice. M, 100bp DNA ladder; N, non-GM rice (Nakdong); GM, *OsCK1* rice LS28 30-32-20-9-7 lines

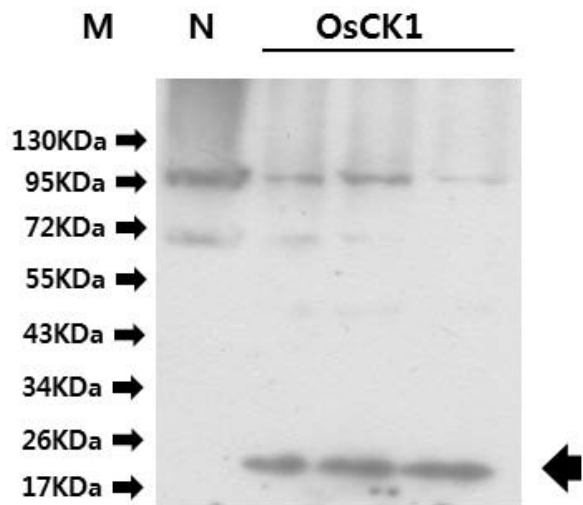


Fig. 2. Expression analysis of *PAT* at the Disease Resistant (*OsCK1*) rice and non-Genetically modified (non-GM) rice using western blot. Crude protein extracts were isolated from leaf tissue, separated on 10% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis), and then visualized through the immunoblotting process. M, Protein ladder; N, non-GM rice (Nakdong); *OsCK1*, *OsCK1* rice LS28 30-32-20-9-7 lines

Table 1. Primers list used for PCR(Polymerase chain reaction) analysis

Gene	Primer	Primer sequences	Product Size(bp)
<i>OsCK1</i> ¹⁾ <i>/PinII</i>	Forward	5'-TCAGGGGATTACCACG GGATTGGTT-3'	620
	Reverse	5'-CACATAACACACAACCTT TGATGCCACA-3'	
<i>PAT</i> ²⁾	Forward	5'-TCTGCACCATCGTCAAC CACTACAT-3'	445
	Reverse	5'-CTGAAGTCCAGCTGCCA GAAACCCA-3'	
<i>Actin</i>	Forward	5'-ATCACTGCCTTGCTCCT AGC-3'	137
	Reverse	5'-GTACTCAGCCTTGGCAA TCC-3'	

¹⁾*OsCK1*, *Oryza sativa choline kinase 1*;

²⁾*PAT*, Phosphinothricin acetyltransferase

Table 2. *PAT* protein levels ($\mu\text{g/g}$ Dry weight) in non-Genetically modified (non-GM) rice (Nakdong) and Disease Resistant (*OsCK1*) rice

Sample	<i>PAT</i> ¹⁾ Concentration ($\mu\text{g/g}$ Dry weight)
Nakdong	0 (N.D.)
<i>OsCK1</i> rice	45.44 ± 2.23 ²⁾

¹⁾*PAT*, Phosphinothricin acetyltransferase;

²⁾Values are the average \pm SD of triplicate measures

Table 3. Changes of water temperature (°C) during cumulative immobility tests of *Daphnia magna* in non-Genetically modified (non-GM) rice (Nakdong) and Disease Resistant (*OsCK1*) rice

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong		<i>OsCK1</i> rice	
	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr
0	21.8	21.1	21.8	21.1
1,000	21.6	21.0	21.6	20.9
1,800	21.6	20.9	21.5	20.8
3,240	21.6	21.0	21.8	21.3
5,830	21.5	20.8	21.5	20.8
10,500	21.6	20.9	21.5	20.9
20,000	21.5	20.7	21.6	21.1

¹⁾ Active ingredient, Nakdong; *OsCK1* rice 100%

Table 4. Changes of pH during cumulative immobility tests of *Daphnia magna* in non-Genetically modified (non-GM) rice (Nakdong) and Disease Resistant (*OsCK1*) rice

Concentration (mg/L) ¹⁾	Nakdong		<i>OsCK1</i> rice	
	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr
0	7.73	7.61	7.73	7.61
1,000	7.46	7.18	7.33	7.20
1,800	7.36	6.79	7.24	6.68
3,240	7.13	6.58	7.16	6.46
5,830	6.97	6.29	6.94	6.32
10,500	6.78	6.09	6.61	6.12
20,000	6.54	5.97	6.46	6.03

¹⁾ Active ingredient, Nakdong; *OsCK1* rice 100%

낙동벼는 평균 6.64(5.95~7.37), 병저항성 GM벼는 평균 6.63(6.03~7.25)로 측정되었다. 반면에 음성대조군(0 mg/L)의 0시간 처리에서는 평균 7.73과 48시간 7.61로 측정되었다. 이는 유기물 시료인 낙동벼와 병저항성 GM벼가 물벼룩의 호흡 등 생리 작용과 미생물에 의한 유기물 분해 작용에 의해 pH의 차이에 영향을 주었을 것으로 사료된다(Table 4). 각 시험농도에서 병저항성 GM벼와 낙동벼간 물벼룩의 시험용수 pH에 대한 t-test 검정결과 0, 1,000, 1,800, 3,240, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 48시간후에는 각각 p 값이 0.94, 0.69, 0.12, 0.09, 0.56, 0.51, 0.45이었다. 따라서 모든 처리농도에서 두 품종간 시험용수 pH에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$). 예비시험의 측정결과를 바탕으로 물벼룩 환경생태 독성시험 분석을 위하여 시험용수의 DO는 포화용존산소량의 60% 이하로 내려가는 것을 방지하기 위하여 24시간 간격으로 산소를 30분간 공급하였다. 시험기간 중 병저항성 GM벼와 낙동벼 간의 처리농도별 DO는 유의적인 차이가 없었다. 각 시험농도에서 품종간 물벼룩의 시험용수 DO값에 대한 t-test 검정결과 0, 1,000, 1,800, 3,240, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 48시간후

에는 각각 p 값이 0.78, 0.54, 0.55, 0.57, 0.51, 0.54, 0.67이었다. 따라서 모든 처리농도에서 두 품종간 사육 온도에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$).

병저항성 GM(*OsCK1*)벼와 낙동벼의 처리농도에 따른 물벼룩의 유영저해 변화

병저항성 GM벼와 낙동벼의 물벼룩 급성독성시험을 48시간 동안 지수식으로 농도당 노출 물벼룩 10마리에 대한 생사수를 관찰, 조사하였으며 총 3반복 실시하였다. 물벼룩은 유기 및 무기 독성물질에 민감하게 반응하므로, 독성 측정을 위해서는 일반적으로 24시간 및 48시간 후의 유영저해 측정이 이용된다(Kim *et al.*, 2010a).

낙동벼 처리구에서 1,000~20,000 mg/L의 시험농도에서 물벼룩 급성독성시험을 실시한 결과, 물질 처리 후, 24시간 경과시 1,000, 1,800, 3,240 mg/L 처리구에서는 유영저해 개체가 없었으나, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 24시간 경과시 각각의 농도에서 30, 66.6, 96.6%의 유영저해 개체가 관찰되었으며, 48시간 경과시 1,000 mg/L 처리구에서는 유영저해 개체가 없었으나 1,800, 3,240 및 5,830 mg/L 처리구에서는 33.3, 40, 56.6%의 유영저해 개체가 관찰되었다. 10,500과 20,000 mg/L 처리구에서는 48시간 후에 모두 100% 유영저해 개체로 관찰되었다. 병저항성 GM벼 처리구에서 1,000~20,000 mg/L의 시험농도에서 물벼룩 급성독성시험을 실시한 결과, 물질 처리 후 24시간 경과시 1,000, 1,800 mg/L 처리구에서는 유영저해개체가 없었으나, 3,240, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 각각의 농도에서 33.3, 43.3, 60, 70%의 유영저해 개체가 관찰되었으며, 48시간 경과시 1,000 mg/L 처리구에서는 낙동벼와 동일하게 유영저해 개체가 없었으나, 48시간 후에 1,800, 3,240, 5,830 mg/L 처리구에서 43.3, 53.3, 56.6%의 유영저해가 관찰되었다. 48시간 경과시에 10,500과 20,000 mg/L 처리구에서는 모두 100% 유영저해개체가 관찰되었다. 처리 기간 중 음성대조군(0 mg/L)과 병저항성 GM벼와 낙동벼의 1,000 mg/L 처리구에서는 일반 중독 증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다. 그러나, 병저항성 GM벼와 낙동벼의 1,000 mg/L 이상의 처리 농도 조건에서 일반 중독 증상인 수조 상단에서 유영하는 개체가 관찰되었다(Table 5). 각 시험농도에서 품종간 물벼룩의 유영저해 개체수의 t-test 검정결과, 5,830, 10,500 및 20,000 mg/L 처리구에서 24시간후에는 각각 p 값이 0.27, 0.56, 0.09로 병저항성 GM벼와 낙동벼간 평균 유영 개체수에는 차이가 없었으나, 3,240 mg/L 처리구에서 24시간 후의 유영저해 개체수는 두 품종간에 차이($p=0.02$)를 보여 병저항성 GM벼에서 다소 높게 나타났다. 반면 병저항성 GM벼와 낙동벼의 48시간 처리후의 p 값은 1,800, 3,240 및 5,830 mg/L 처리구에서 각각 0.46, 0.41, 1.00 이었으며 모든 처리농도에서 두 품종간 평균 유영 개체수에는 유의적인 차이가 없었다($p>0.05$). 따라서 3,240 mg/L 처리 24시간 후의 처리구를 제외하고 모든 처리구에서 두 품종간에는 유영저해 개체수의 차이는 없는 것으로 분석되었다. Oh 등

(2012b)이 비타민 A 강화벼의 물벼룩 급성독성을 실시하면서 낙동벼를 대조로 본 실험과 동일한 농도에서 실험하였으며, 그 결과 본 조사결과와 달리 낙동벼 3,240 mg/L 처리 24시간 후 5마리의 유영저해 개체가 조사되었으나, 그외의 처리구에서는 유사한 경향을 보였다. 특히 낙동벼 3,240 mg/L 처리 24시간 후의 유영저해 개체수는 본 조사의 병저항성 GM벼와 통계적 유의성($p=0.252$)이 없었으며, 또한 전반적으로 유기물인 낙동벼와 병저항성 GM벼의 처리 농도의 증가와 시간이 경과함에 따라 유영저해 개체의 변화가 유사한 경향을 보여, 특별히 병저항성 GM벼에 의하여 물벼룩의 일반중독에 영향을 미치지 않은 것으로 추정된다.

Table 5. Cumulative immobility of *Daphnia magna* in non-Genetically modified (non-GM) rice (Nakdong) and Disease Resistant (*OsCK1*) rice

Sample	Concentration (mg/L) ¹⁾	Number of daphnia	Number of immobilized daphnia		Immobility (%)	
			24h	48h	24h	48h
Nakdong	Control	30	0	0	0	0
	1,000	30	0	0	0	0
	1,800	30	0	10	0	33.3
	3,240	30	0	12	0	40.0
	5,830	30	9	17	30.0	56.6
	10,500	30	20	30	66.6	100
	20,000	30	29	30	96.6	100
<i>OsCK1</i> rice	Control	30	0	0	0	0
	1,000	30	0	0	0	0
	1,800	30	0	13	0	43.3
	3,240	30	10	16	33.3	53.3
	5,830	30	13	17	43.3	56.6
	10,500	30	18	30	60	100
	20,000	30	21	30	70	100

¹⁾ Active ingredient, Nakdong; *OsCK1* rice 100%

Table 6. EC₅₀(Effective concentration 50) values of *Daphnia magna* after 48 hours in non-Genetically modified (non-GM) rice (Nakdong) and Disease Resistant (*OsCK1*) rice

Test item	EC ₅₀ (mg/L) ¹⁾	NOEC(mg/L) ³⁾
Control	-	-
Nakdong	3,596.27 (1,889.99~6,603.35) ²⁾	1,000
<i>OsCK1</i> rice	3,147.18 (1,194.47~6,916.50)	1,000

¹⁾ Active ingredient, Nakdong; *OsCK1* rice 100%;

²⁾ 95% confidence limits; ³⁾ No observed effect concentration

병저항성 GM(*OsCK1*)벼와 낙동벼 급이에 따른 물벼룩의 급성독성

병저항성 GM벼와 낙동벼의 물벼룩 급성독성시험을 실시한 결과, 48시간-EC₅₀은 낙동벼는 3,596.27 mg/L (95% 신뢰한계 : 1,889.99~6,603.35 mg/L), 병저항성 GM벼는 3,147.18 mg/L (95% 신뢰한계 : 1,194.47~6,916.50 mg/L)로 병저항성 GM벼가 다소 높은 급성독성을 보였으나, 95% 신뢰한계 구간 내의 차이로 유의성은 없는 것으로 나타났다. 무영향 농도는 두 품종 모두 1,800 mg/L로 확인되었다(Table 6). 이는 *OsCK1*가 도입된 병저항성 GM벼가 일반벼인 낙동벼에 비해 물벼룩의 급성 독성 증대에 영향을 미치지 않는 것으로 보아, 병저항성 GM벼 및 낙동벼 모두 무영향 농도(NOEC)가 1,000 mg/L로 한계 농도를 설정할 수 있을 것이다. 따라서 *OsCK1*와 *PAT* 유전자가 형질전환된 병저항성 GM벼 및 낙동벼가 물벼룩에 미치는 영향 평가 결과, 상대적 동등성을 보였으며, 이는 *OsCK1*와 *PAT* 유전자의 단백질 노출이 물벼룩에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

Thomas 등(2010)의 *Cry1Ab* 유전자가 형질전환된 Bt 옥수수(MON810)에 대한 물벼룩 영향 평가 실험 결과, MON810과 모품종(비형질전환 옥수수)에서 처리 후 5일차 내에서의 생존률의 차이는 나타나지 않았으나, 42일간 장기 영향 평가 시에는 후세대에서의 성숙기간, 산란수, 세대진전 기간 등이 다소 차이가 있는 것으로 보고하였다(Thomas et al., 2010). 그러나 이 실험은 농도에 대한 기준 설정이 없이 단일농도에서만 시험이 수행되었으며, Lee 등(2007)의 실험 결과에서 제시된 중금속 및 농약에 대한 물벼룩의 EC₅₀과 LC₅₀값이 상당히 광범위하게 형성되어 물벼룩의 영향 평가 실험 시 처리 농도 등이 고려되어야 될 것으로 사료된다(Lee et al., 2007). 국내에서도 GM작물의 실용화와 GM작물의 수입량 증가에 따른 환경지표생물종별 기준 설정과 이에 대한 영향 평가의 필요성이 요구되고 있으며, 국내에서 개발된 GM작물인 해충저항성 Bt벼와 병저항성 GM벼를 잉어와 미꾸리에 대한 급성독성평가 결과, 모품종과 유의함을 확인하였다(Oh et al., 2011b; Oh et al., 2013). 또한, 국내 개발된 해충저항성 Bt벼와 비타민 A 강화벼에 대한 벼물바구미의 살충제 감수성 실험에서도 72시간-LC₅₀에 통계적으로 유의적 차이가 없는 것으로 보고되었다(Oh et al., 2012a; Oh et al., 2012b). 본 실험과 동일한 평가 생물종인 물벼룩에 대한 해충저항성 Bt벼와 비타민 A 강화벼의 영향 평가에서도 본 실험의 결과와 같이 모품종(낙동벼)과 유의적 차이가 없는 것으로 보고되었으나, 무영향 농도(NOEC)도 1,000과 1,800 mg/L로 제시되고 있다. 이는 Lee 등(2007)이 물벼룩의 영향 평가 실험 시 실험방법, 장소 및 조건의 차이가 있다는 보고와 같이 동일한 모품종임에도 불구하고 시료의 처리 조건뿐만 아니라 재배 연도와 지역적인 환경 요인을 고려하여 낙동벼에 대한 물벼룩의 무영향 농도를 1,000mg/L으로 설정할 수 있을 것으로 사료된다(Lee et al., 2007; Oh et al., 2011a; Oh et al., 2012c).

*OsCK1*와 *PAT* 유전자가 형질전환된 국내 개발된 병저항성 GM벼가 비표적 생물체인 물벼룩에 미치는 영향을 분석한 결과, 비형질전환 낙동벼와 동등함을 확인하였다. 따라서 낙동벼와 병저항성 GM벼가 농경지, 수로, 하천 등의 환경에 방출되었을 때 수서 생물체인 물벼룩에 미치는 환경-생물학적인 영향이 유사하다고 판단할 수 있다. 이러한 급성독성 관련 동등성뿐만 아니라 향후 병저항성 GM벼를 포함한 GM작물에 대한 환경위해성 평가요소 중 환경 지표생물종에 대한 급성독성 분석시 세대 진전에 따른 GM작물의 장기간 노출에 따른 생식 독성과 유전독성 분석을 위한 표준 가이드라인을 구축하여야 하며 본 실험결과는 이를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

결론

본 연구는 병저항성 *OsCK1* 유전자와 제초제저항성 *PAT* 유전자가 도입된 병저항성 GM벼에서 도입 유전자의 발현 검증과 수서환경의 비표적 생물체인 물벼룩에 미치는 영향을 확인하기 위해 수행되었다. 병저항성 GM벼에 도입된 *OsCK1*와 *PAT* 유전자의 PCR 분석 결과, 병저항성 GM벼에서만 특이적인 밴드가 검출되었으며, *PAT* 단백질을 발현을 western blot, ELISA 분석한 결과, 병저항성 GM벼에서만 발현되며, 발현량은 $45.44 \pm 2.23 \mu\text{g/g}$ 수준으로 검출되었고, 모품종인 낙동벼에서는 검출되지 않았다. 병저항성 GM벼와 낙동벼의 물벼룩에 대한 급성독성시험을 실시한 결과, 낙동벼의 48시간-EC₅₀는 3,596.27 mg/L (95% 신뢰한계 : 1,889.99 ~ 6,603.35 mg/L), 무영향농도(NOEC)는 1,000 mg/L 였고, 병저항성 GM벼는 3,147.18 mg/L (95% 신뢰한계 : 1,194.47 ~ 6,916.50 mg/L), 무영향농도(NOEC)는 1,000 mg/L 이었다. 따라서 병저항성 GM벼가 모품종인 낙동벼에 비교하여 물벼룩에 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

Acknowledgment

This study was carried out with the support of the "Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ00960901 2014)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic Korea.

References

- Brookes, G., Barfoot, P., 2006. Global impact of biotech crops: Socio-economic and environmental effects in the first ten years of commercial use. *AgBioForum* 9, 139-151.
- De Vries, J., Wackernagel, W., 2005. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil* 266, 91-104.
- 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 Biotechnol. J.* 8, 928-938.
- James, C., 2013. The global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. *ISAAA Brief No. 46*. ISAAA: Ithaca, NY.
- 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, K.Y., Kim, K.R., Lee, S.I., 2010a. Acute toxicity test for heavy metals using water fleas, *J Korean Wood Sci Technol* 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, 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., Sohn, S.I., Kwon, W.J., Kim, J.S., Lee, J.Y., Park, B.S., Kwon, S.J., Suh, S.C., Ryu, T.H., Park, J.S., Ahn, B.O., Cho, H.S., Suh, S.J., 2012a. Effect on insecticide susceptibility of *Lissorhoptrus oryzophilus* fed on *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Transgenic rice variety. *Korean J. Intl. Agric.* 24, 247-253.
- Oh, S.D., Lee, K.J., Park, S.Y., Ryu, T.H., Kim, J.K., Sohn,

- S.I., Kim, J.S., Ha, S.H., Park, J.S., Ahn, B.O., Cho, H.S., Suh, S.J., 2012b. Effect on insecticide susceptibility of *Lissorhoptrus oryzophilus* fed on Carotenoid-Biofortified rice variety. *Korean J. Environ Agric.* 31, 286-292.
- 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., 2012c. Molecular biological analysis of Carotenoid-Biofortified rice and its effect on *Daphnia magna* feeding. *Korean J. Intl. Agric.* 24, 477-484.
- Oh, S.D., Lee, K.J., Park, S.Y., Lee, D.Y., Sohn, S.I., Kim, M.Y., Ryu, T.H., 2013. Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on Disease Resistant(OsCK1) rice variety. *Korean J. Environ Agric.* 32, 231-239.
- 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.I., 2010. *CaMsrb2*, pepper methionine sulfoxide reductase B2, is a novel defense regulator against oxidative stress and pathogen attack. *Plant Physiol.* 154, 245-261.
- Owen, M.D.K., 2000. Current use of transgenic herbicide resistant soybean and corn in the USA, *Crop Prot.* 19, 765-771.
- 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. Molecular biological characteristics and analysis using the specific markers of leaf folder-resistant GM rice. *Plant Biotechnol.* 36, 115-123.
- Thomas, B., Traavik, T., Primicerio, R., 2010. Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize. *Ecotoxicology* 19, 419-430.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiyaa, H., Hinata, K., 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Nat. Biotechnol.* 6, 1072-1074.