

PLANT&FOREST

Risk assessment and evaluation of epidermal growth factor (EGF) transgenic soybean: responses of *Cyprinus carpio* fed on EGF transgenic soybean

Sung-Dug Oh^{1*}, Seok-Ki Min², Jae Kwang Kim³, Jung-Ho Park⁴, Chang-Gi Kim⁴, Soo Yun Park¹

¹Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju 54874, Korea

²Korea Testing & Research Institute, Hwasun 58141, Korea

³Division of Life Sciences, College of Life Sciences and Bioengineering, Incheon National University, Incheon 22012, Korea

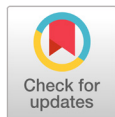
⁴Bio-evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongju 28116, Korea

*Corresponding author: ohbaboh@korea.kr

Abstract

The epidermal growth factor (EGF) transgenic soybean was developed and biosynthesis of human epidermal growth factor (hEGF) in soybean seeds was confirmed. Also, EGF transgenic soybean were found to contain a herbicide resistance selectable marker by introduction of phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*) gene from the *Streptomyces hygroscopicus*. For biosafety assessment, the EGF transgenic soybean expressing the EGF biosynthesis gene *EGF* and herbicide resistant gene *PAT* was tested to determine effects on survival of *Cyprinus carpio*, commonly used as a model organism in ecotoxicological studies. *C. carpio* was fed 100% ground soybean suspension, EGF soybean or non-genetically modified (GM) counterpart soybean (Gwangan). Gene expression of EGF soybean was confirmed by PCR and ELISA to have *EGF/PAT*. Feeding test showed that no significant differences in cumulative immobility or abnormal response between *C. carpio* samples fed on EGF soybean and non-GM counterpart soybean. The 48 h-EC₅₀ values of the EGF and non-GM soybean were 1,688 mg·L⁻¹ (95% confidence limits: 1,585 - 1,798 mg·L⁻¹) and 1,575 mg·L⁻¹ (95% confidence limits: 1,433 - 1,731 mg·L⁻¹), respectively. The soybean NOEC (no observed effect concentration) value for *C. carpio* was suggested to be 625 mg·L⁻¹. We concluded that there was no significant difference in toxicity for non-target organisms (*C. carpio*) between the EGF soybean and non-GM counterparts.

Keywords: *Cyprinus carpio*, genetically modified (GM) soybean, risk assessment



OPEN ACCESS

Citation: Oh SD, Min SK, Kim JK, Park JH, Kim CG, Park SY. 2020. Risk assessment and evaluation of epidermal growth factor (EGF) transgenic soybean: responses of *Cyprinus carpio* fed on EGF transgenic soybean. Korean Journal of Agricultural Science 47:815-827. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200068>

Received: September 09, 2020

Revised: October 01, 2020

Accepted: October 06, 2020

Copyright: © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

유전자변형(genetically modified, GM)작물은 기후변화 등의 농업 환경 변화로 인한 미래의 식량문제를 해결할 수 있는 대안으로 떠오르고 있으며, 적은 생산비용과 노동력으로 농산물의 수확량을 증진시킬 수 있어 1996년 상업적으로 이용되기 시작한 이래 지난 25년간 급속한 증가세를 보이고 있다. GM작물 재배면적은 2018년 기준으로 1억 9,170만 헥타르로 상업적인 재배가 시작된 1996년보다 무려 113배 이상 증가하였고, 26개국에서 재배되고 있으며, GM콩은 전 세계 GM작물 면적의 50% 인 9,590만 헥타르의 면적에서 재배되고 있다(ISAAA, 2019). 우리나라도 식용 또는 사료 생산을 위해 옥수수, 대두, 면실 등 많은 양의 GM곡물이 수입되고 있으며, 2018년 농업식품용으로 수입 승인된 GMO (genetically modified organism)는 23.5억달러, 1,021만톤이며, 이중 GM콩이 105만톤으로 전체 수입량의 10.3%를 차지하고 있다(KBCH, 2019). 현재까지 국내에서 상업적 목적으로 재배 승인된 GM작물은 없으나, 국공립연구소, 대학 및 기업에서 벼, 대두, 잔디, 고추 및 화훼 등의 다양한 유용 GM작물들이 개발되고 있으며, 기능과 안전성이 입증된 라스베라트를 생합성 벼는 산업용으로 승인되었으며, 제초제저항성 옹성불임 잔디, 바이러스 내병성 고추 등이 안전성 평가 및 실용화 단계에 도달해 있다(Oh et al., 2015; Oh et al., 2018; KBCH, 2019). 또한, 가뭄, 염 등 환경스트레스 저항성 GM콩(Kim et al., 2017; Park et al., 2019), 기능성 성분 강화 GM콩(Kim et al., 2012; Kwon et al., 2017) 등 다양한 GM콩의 개발 및 안전성 평가가 수행되고 있다(Oh et al., 2020).

GM작물 실용화를 위해 필수적으로 요구되는 안전성 평가는 크게 두가지로 구분할 수 있다. 첫번째로 농경지에 재배되기 이전에 농업환경에 미치는 잠재적 위해성, 즉 GMO에 도입된 유전자들에 의한 농업 환경생물종의 영향과 잡초화 가능성 및 농업환경 생태계 교란 등에 대한 환경위해성 평가가 수행되어야 하고, 두번째로 영양 성분 분석, 알레르기 및 독성 평가 등의 식품안전성 평가가 이루어져야 한다(Oh et al., 2014a; Lee et al., 2015; Oh et al., 2020). GM작물의 실용화를 위한 환경위해성 평가 항목에서 일반적인 평가 대상인 나비목, 노린재목, 딱정벌레목 등의 재배지의 곤충상 조사 이외에 물벼룩, 잉어, 미꾸리 등의 농업환경생물종에 대한 평가도 이루어져야 한다. 최근 GM작물의 환경위해성 평가 항목인 수서환경 농업환경생물종의 위해성 평가를 분석하기 위하여 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 해충저항성 Bt벼가 미치는 영향이 분석되었고, 어류에 미치는 영향에 대한 위해성 평가가 보고되었다(Oh et al., 2011a; Oh et al., 2011b). 수서환경 생물종 중 어류에 대한 환경 생물 독성시험을 평가하기 위한 시험생물종 선택에 있어서 실험 방법론 및 생태학적 문제뿐만 아니라 시험생물종 공급과 분석 비용 등 현실적인 문제와 생물종 적합성(다양한 독성물질의 독성 평가 성적 확보 유무, 위해물질에 대한 감수성, 광범위한 서식 지역, 단기간 생활사 독성시험 가능)를 고려하여 잉어(*Cyprinus carpio*), 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 제브라피쉬(*Brachydanio rerio*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 등이 일반적으로 이용되어져 왔다(Versteeg et al., 1997; Kim et al., 2010).

국내에서는 GM작물의 안전성 평가 중에서 농업환경 생물 종에 대한 위해 영향 평가는 국내 개발된 해충저항성 Bt벼, 비타민 A 강화벼, 레스베라트를 생합성 GM벼 등에서 대해서 보고되고 있으며, 특히 벼는 담수조건에 생육하므로 수서생물상인 물벼룩(*Daphnia magna*), 미꾸리(*M. anguillicaudatus*), 잉어(*C. carpio*) 등에 대한 평가가 수행되고 있다(Oh et al., 2012; Moon et al., 2013; Oh et al., 2014b; Oh et al., 2014c). 본 실험에서는 GM 콩에 대한 어류의 환경 위해성 평가를 분석하기 위하여 잉어(*C. carpio*)를 시험종으로 선정하였다

본 연구에서는 인간 유래 epidermal growth factor (EGF) 유전자가 광안콩에 형질전환된 화장품 소재용 EGF 형질전환콩(Kakembo et al., 2017)이 잉어에 미치는 급성 독성 여부를 분석하기 위하여 EGF와 phosphinothricin acetyltransferase (PAT) 유전자의 도입 유무와 단백질 발현량을 확인한 후, 비형질전환콩인 광안콩과 함께 환경위해성 평가 항목 중 수생 생물종인 잉어에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 통해 EGF 형질전환콩에 대한 농업환경생물종에 대한 영향성을 평가하여, GM콩의 상용화 및 생산자와 소비자에게 신뢰성 있는 안전성 데이터를 확보하여 국내 개발 GM콩의 조기 실용화 실현에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

시료 제조

본 실험에 이용한 EGF 형질전환콩은 아그로박테리움 형질전환법을 사용하여 모품종인 광안콩에 인간 EGF 유전자를 도입하여 개발한 것이다. β -conglycinin 프로모터를 이용하여 EGF 유전자가 종자 특이적으로 발현되며, 제초제저항성 유전자인 PAT가 도입되어 글루포시네이트 제초제(바스타)에 대한 저항성을 지니고 있다.

국립농업과학원 LMO (living modified organisms) 격리 포장(2018년, 전라북도 전주시, RDA-가AB-2013-041)에서 비형질전환 모품종인 광안콩과 EGF 형질전환콩을 재배 및 육성하였으며, R6 발단 단계에서 줄기와 잎, 꼬투리 및 종자(시료비중 10%)를 수확하고 동결건조기(FD8518, ILSINBioBase, Yangju, Korea)를 이용하여 건조한 후, 분쇄기(HMF-3500SS, Hanil Electric, Seoul, Korea)를 이용하여 분말화하였다. 분말 시료는 600 μ m 표준망체(Chunggye sang gong sa, Seoul, Korea)를 이용하여 시료 선별된 후, 사육용수에 현탁하여 잉어의 급성독성 분석용 시료로 이용하였다.

게놈 DNA 추출 및 polymerase chain reaction (PCR) 검정

광안콩과 EGF 형질전환콩 식물체와 종자의 시료 각 1 g씩을 막자사발을 이용하여 분말화한 후, DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, USA)을 이용하여 EGF 형질전환콩과 광안콩의 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC, USA)를 사용하여 DNA 정량 분석을 하였으며, 260/280 nm의 수치가 1.8 - 2.0 사이인 genomic DNA 시료를 PCR 분석 실험에 이용하였다. EGF 형질전환콩에 도입된 T-DNA의 유전정보를 기반으로 EGF, Lectin, Bar (Phosphinothricin acetyltransferase, PAT) 유전자 검정용 프라이머를 제작하였다(Table 1). PCR 분석을 위하여 광안콩과 EGF 형질전환콩의 genomic DNA 20 ng에 프라이머 20 pM, 2X Hottaq PCR master mix 10 μ L (Cellsafe, Yongin, Korea)을 첨가한 후 최종 반응 용량을 20 μ L로 하였다. PCR 반응조건은 94°C 5분 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건에서 30 사이클로 증폭한 후, 72°C에서 5분간 반응하였고, C1000™ Thermal cycler (Bio-rad, foster, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 유전자들의 PCR 산물은 1% 아가로스겔에서 100 V, 25분간 전기영동한 후 분석하였다.

Table 1. Results of weight prediction model for strawberry of three cultivars.

Gene	Primer	Primer sequences	Product size (bp)
EGF	Forward	5'-ATCTCGGCCAGGTTTTCAT-3'	179
	Reverse	5'-AGGCGTACTTATCGAGAGCC-3	
PAT	Forward	5'-TCAACCACTACATCGAGACAAGC-3	105
	Reverse	5'-GATAGCGCTCCCGCAGAC-3'	
Lectin	Forward	5'-TGCCGAAGCAACCAAAACATGATCCT-3'	414
	Reverse	5'-TGATGGATCTGATAGAATTGACGTT-3'	

EGF, epidermal growth factor gene; PAT, phosphinothricin acetyltransferase gene.

EGF 형질전환콩의 목적 단백질 발현 분석

PAT 유전자의 발현 검정을 위하여 immunostrip 검정 (lateral strip test)을 실시하였다. EGF 형질전환콩과 광안콩의 시료에 추출용액을 넣고 분쇄하여 단백질을 용출하고, *PAT* 유전자의 단백질 발현을 Trait LL Test Strip (Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA)을 이용하여 발현 분석을 수행하였다. EGF 형질전환콩과 광안콩의 EGF 단백질의 발현 농도를 분석하기 위하여 분쇄된 시료들과 PBST용액을 첨가하고 균질화한 후, 얼음에서 5분간 처리하였다. 시료 용액을 5,000 g에서 5분간 원심분리한 후, 단백질을 분리 추출하여 EGF ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)분석을 수행하였다. 모든 시료들은 상온에서 2시간 반응한 후 ELISA reader (Epoch, Bio-Tek, winooski, VT, USA)를 이용하여 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

잉어(*C. carpio*) 배양 조건

급성독성분석용 생물종인 잉어(*C. carpio*)는 오창양어장(Ochang, Korea)에서 구입한 후, 한국화학융합시험연구원(Hwasun, Korea)에서 사육 및 배양된 것을 이용하였다. 잉어는 20 L 용량의 장방형 유리 수조에서 수온 20 - 24°C, 암조건 8시간(24:00 - 08:00), 광조건 16시간(08:00 - 24:00) 조도 300 - 600 Lux의 조건으로 배양하였으며, 먹이로는 탐밀(제일사료, 한국)을 오전에 1회 1 g씩, 매일 공급하였다. 잉어 사육실의 온도와 배양수조의 수온은 자동온도측정기에 의하여 매 30분마다 측정하였고, 시험에 영향을 있을 정도의 수온과 온도의 변화가 없음을 확인하였다. 잉어의 배양에 사용된 시험 용수는 수돗물을 전처리필터(1.0 µm)와 세균제거 필터(0.2 µm)로 여과시킨 후 저수조에 48시간 이상 폭기시킨 후 이용하였다. 시험 용수 수질은 한국화학융합시험연구원에서 환경부 고시 먹는물 수질공정시험기준에 따라 분석하였으며(TAK-2018-184933, 2019-01-08, Annex 2), 수질 분석 결과 시험에 영향을 주는 요인은 없었다.

잉어에 대한 시료 처리조건

EGF 형질전환콩과 광안콩의 시료에 대한 예비시험 결과 1,000, 5,000, 10,000, 20,000 mg·L⁻¹의 시험농도(설정농도)에서 각각 0, 100, 100, 100%의 치사 개체가 관찰되었다. 본 시험의 농도는 0, 313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 mg·L⁻¹ (설정농도)로 설정하였으며, 시험 물질의 처리 농도별로 3반복으로 수행하였다. 시험 용액 처리후 24, 48, 72 및 96시간 마다 시험 어종인 잉어에 미치는 영향들을 측정하였다. 시험 용액의 제조는 시험물질 0, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 g을 정확히 측정하여 20 L의 수조에 넣고 시험용액이 10 L가 되도록 시험용수를 추가한 후 완전히 현탁될 때까지 교반시킨 후에 시험용액으로 사용하였다. 무처리구인 음성대조구는 시험용수인 수돗물을 사용하였으며, 양성대조구는 담수 어류 급성독성시험에 사용되는 대조 물질 중 사용금지 물질로 지정된 PCP-Na를 대체하는 물질인 3, 5-dichlorophenol (Sigma-aldrich, St. Louis, USA)을 양성대조물질로 하여 잉어 처리시에는 0.06, 0.08, 0.12, 0.16 및 0.23 mg·L⁻¹의 설정농도(nominal concentration)로 적용하였다(Bae et al, 2018). 잉어의 노출 실험은 원통형 유리수조(용량 20 L, 38 cm H × 28 cm φ)에 시험용액을 10 L을 처리하여 수행하였으며, 처리군별로 10마리씩 3반복으로 처리하였으며, 시험개시 24시간 전부터 시험 종료 시까지 잉어의 먹이 공급을 중단하였다. 또한, 시험 기간 동안 매 24시간 간격으로 약 1시간 동안 각 처리수조에 산소를 충분히 공급하여 주었다.

급성 독성 분석을 위한 조사 항목

EGF 형질전환콩과 광안콩의 잉어에 대한 급성 독성을 확인하기 위하여 치사수 및 일반증상 관찰은 모든 시험 수조에서 시험개시 24, 48, 72 및 96시간 경과 후에 중독증상, 특이증상 및 치사 유무를 관찰하였으며, 치사의 판정은 시험계를 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 간주하였다. 급성 독성 실험은 농촌진흥청 고시 제2019-5호 (2019-03-21) [별표 13]의 13-1-1. 담수어류급성독성시험에 따라 수행되었으며, 본 시험 중 상기 기준에 규정되지 않은 경우는 한국화학융합시험연구원(화순)의 표준작업지침서에 따라 시험을 실시하였다. 시험 기간 중 모든 잉어 사육 수조에 대하여 수온, pH와 DO (dissolved oxygen)를 매일 1회 측정하였다. pH와 DO 및 수온은 WTW 사의 Multi 9430 (WTW, Weilheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시험 종료 후 잉어의 체중과 전장을 측정하였다. 반수치사농도(Lethal concentration 50, LC₅₀)산출은 시험 결과를 바탕으로 CETIS (Version 1.9.3.0, Tidepool Scientific Software, Mckinleyville, USA) 프로그램을 이용하여 계산하였다. 시험물질 처리 후 48시간 및 96시간 LC₅₀ (95% 신뢰한계)은 Probit method와 Trimmed Spearman-Krber method를 적용하여, LC₅₀을 산출하였다. 무영향농도(NOEC, no observed effect concentration)는 중독 증상이 없고 치사체가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

Results and Discussion

EGF 형질전환콩의 분자생물학적 분석

잉어 급성 독성 평가에 이용된 화장품 소재용 EGF 형질전환콩은 종자 특이 발현을 위해서 β -conglycinin 프로모터를 이용하여 인간 유래 EGF 유전자를 광안콩에 도입하여 개발되었다(Kakembo et al., 2017). 화장품 소재용 EGF 형질전환콩과 모품종인 광안콩을 LMO 격리포장(2018, Jeonju, Korea)에서 재배한 후 어류생물종인 잉어에 대한 급성독성평가를 실시하였다.

잉어 급성 독성 평가에 사용된 EGF 형질전환콩의 시료에 대한 EGF 유전자의 도입을 검정하기 위하여 PCR 분석을 실시한 결과 EGF 형질전환콩에서만 179 bp 크기의 밴드가 검출됨을 확인하였으며, 비형질전환콩인 광안콩에서는 밴드가 미검출되었다. 제초저항성 PAT 유전자에서도 EGF 형질전환콩에서만 105 bp 크기의 PCR 산물이 보였으며 광안콩에서는 미검출되었다. 또한, 콩의 내재 유전자인 lectin 유전자 분석에서는 EGF 형질전환콩과 비형질전환콩인 광안콩 모두에서 414 bp 크기의 PCR 산물이 검출되었다. PCR 분석 결과, 본 실험의 잉어 급성 독성 평가에 사용된 EGF 형질전환콩에 EGF와 PAT 유전자가 도입되었고, 도입된 유전자가 안정적으로 식물체에서 유지되고 있음을 확인하였다(Fig. 1).

EGF 형질전환콩에서 PAT 단백질의 발현을 확인하기 위하여 PAT 항체를 이용한 immunostrip 분석을 실시하였다. 잉어 급성독성 실험에 사용된 광안콩과 EGF 형질전환콩의 시료들을 PAT immunostrip을 이용하여 PAT 단백질 발현을 분석한 결과, PAT 단백질은 EGF 형질전환콩에서만 특이적으로 검출되었고, 비형질전환콩인인 광안콩에서는 PAT 단백질이 검출되지 않았다(Fig. 2). 또한, ELISA 분석을 통하여 잉어 급성 독성 평가용 시료들의 EGF 단백질을 분석한 결과 광안콩에서는 검출되지 않았으며, EGF 형질전환콩에서만 17.1 ± 3.2 ng·g⁻¹ 수준의 EGF 단백질이 검출되었다(Fig. 3).

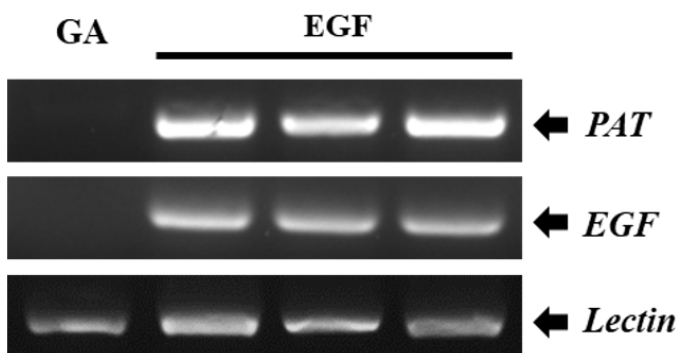


Fig. 1. Confirmation of the T-DNA genes on the non-genetically modified (GM) soybean and EGF transgenic soybean. GA, non-genetically modified soybean (Gwangang); EGF, EGF transgenic soybean; *PAT*, phosphinothricin acetyltransferase gene; *EGF*, epidermal growth factor gene.

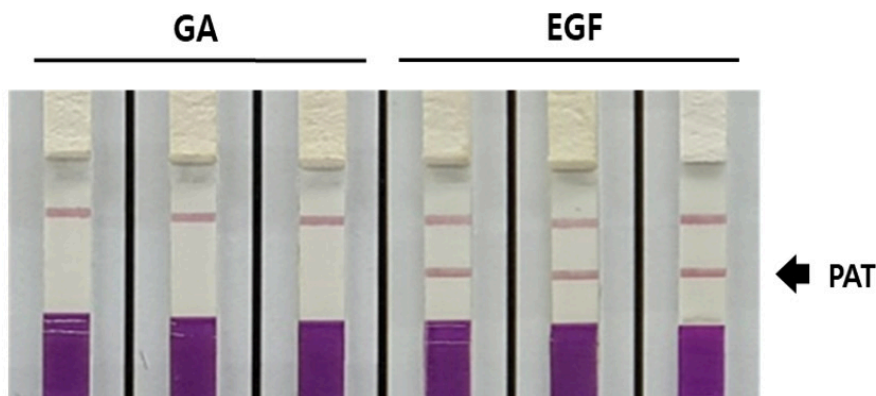


Fig. 2. Confirmation of genes expression for EGF transgenic soybean by using immunostrip tests for the *PAT* detection. GA, non-genetically modified soybean (Gwangang); EGF, EGF transgenic soybean; *PAT*, phosphinothricin acetyltransferase gene; *EGF*, epidermal growth factor gene.

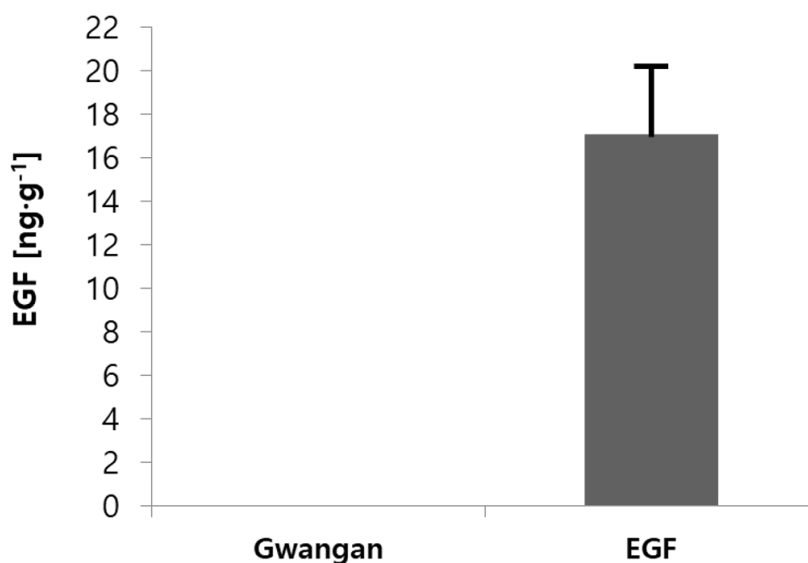


Fig. 3. EGF protein levels (ng·g⁻¹ dry weight) in non-genetically modified soybean (Gwangang) and EGF transgenic soybean. Values are the average \pm SD of triplicate measures. *EGF*, epidermal growth factor gene.

시료처리용 시험용수의 수질변화 검정

광안콩과 EGF 형질전환콩의 잉어 급성 독성 시험 처리 기간 동안 모든 처리구의 수조에 대하여 수온, DO 및 pH 등 시험 용액의 수질 검사를 1일 1회씩 실시하였다. 광안콩과 EGF 형질전환콩에 대한 잉어 급성 독성 평가 처리기간 중 시험용수의 pH는 음성대조구(무처리군)에서 7.82 ± 0.03 (7.76 - 7.87) 수준이었다. 광안콩과 EGF 형질전환콩을 313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 mg·L⁻¹의 농도로 처리한 후 각 농도별 처리구의 pH를 측정된 결과, 광안콩 처리구의 pH는 각각 7.53 ± 0.04 , 7.49 ± 0.04 , 7.46 ± 0.03 , 7.43 ± 0.04 및 7.40 ± 0.03 로 측정되었으며, EGF 형질전환콩에서는 각각 7.63 ± 0.02 , 7.55 ± 0.02 , 7.44 ± 0.02 , 7.40 ± 0.02 및 7.34 ± 0.03 로 측정되어 두 콩 품종의 시료 처리 농도가 높아짐에 따라 pH도 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 313 mg·L⁻¹ 처리구의 96시간에서 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 p값이 0.02으로 분석되었으나, 313 mg·L⁻¹ 처리구의 96시간을 제외하고 모든 처리구에서 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 pH에는 통계적인 유의적 차이는 없었다($p > 0.05$). DO는 음성대조구에서 7.87 ± 0.25 (7.50 - 8.26) 이었으며, EGF 형질전환콩의 313, 625 및 1,250 mg·L⁻¹ 처리구에서는 각각 5.74 ± 1.30 , 5.53 ± 1.39 및 5.56 ± 1.40 로 측정되었으며, 광안의 313, 625 및 1,250 mg·L⁻¹ 처리구에서는 각각 5.54 ± 1.42 , 5.55 ± 1.40 및 5.47 ± 1.44 로 측정되어 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 통계적인 유의적 차이는 없었다(Table 3). 이와 같이 음성대조구에 비해 광안콩과 EGF 형질전환콩 처리구에서 DO가 감소한 이유는 처리구의 시료가 유기물이며, 대상 생물체인 잉어의 호흡 등의 생리작용과 유기물 분해 작용 등의 영향을 받은 것으로 사료된다. 수온은 광안콩과 EGF 형질전환콩에 대하여 각각 $22.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ($22.2 - 22.8^{\circ}\text{C}$)와 $22.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ($22.2 - 22.7^{\circ}\text{C}$)로 일정하게 유지되었다. 환경생물 독성시험 방법과 기준(농촌진흥청 고시 제 2019-5호)에서 제시된 담수어류독성평가 시험 방법의 적정 수온인 20 - 25°C 수준 내에서 시험 용수의 수온이 유지되었다(Table 4). 본 실험에서 잉어 시험 용수의 DO, 온도, pH 등은 잉어 급성 독성 실험의 영향 요소로 작용하지 않았음을 확인하였다.

Table 2. Changes of pH during cumulative mortality tests of *Cyprinus carpio* in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Concentration (mg·L ⁻¹)	pH After treatment time				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Gwangan					
0	7.81 ± 0.03^z	7.81 ± 0.03	7.82 ± 0.02	7.81 ± 0.02	7.81 ± 0.02
313	7.56 ± 0.05	7.54 ± 0.04	7.53 ± 0.05	7.50 ± 0.05	7.52 ± 0.03
625	7.54 ± 0.02	7.52 ± 0.02	7.50 ± 0.04	7.45 ± 0.04	7.45 ± 0.05
1,250	7.47 ± 0.03	7.46 ± 0.04	7.46 ± 0.03	7.45 ± 0.03	7.43 ± 0.02
2,500	7.46 ± 0.06	7.42 ± 0.01	7.42 ± 0.05	7.40 ± 0.02	N.A.
5,000	7.40 ± 0.02	7.40 ± 0.04	N.A.	N.A.	N.A.
EGF					
0	7.87 ± 0.03	7.81 ± 0.03	7.80 ± 0.05	7.81 ± 0.03	7.81 ± 0.03
313	7.62 ± 0.02	7.62 ± 0.05	7.64 ± 0.02	7.60 ± 0.04	7.65 ± 0.05
625	7.57 ± 0.01	7.57 ± 0.03	7.56 ± 0.02	7.52 ± 0.03	7.55 ± 0.04
1,250	7.45 ± 0.02	7.43 ± 0.03	7.42 ± 0.02	7.45 ± 0.03	7.44 ± 0.01
2,500	7.42 ± 0.02	7.40 ± 0.02	7.38 ± 0.02	7.37 ± 0.00	N.A.
5,000	7.37 ± 0.02	7.32 ± 0.03	N.A.	N.A.	N.A.

N.A., not applicable.

^z Mean \pm standard deviation.

Table 3. Changes of DO (dissolved oxygen) during cumulative mortality tests of *Cyprinus carpio* in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Concentration (mg·L ⁻¹)	DO After treatment time				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Gwangan					
0	8.23 ± 0.02 ^z	7.59 ± 0.36	7.81 ± 0.10	7.67 ± 0.27	7.76 ± 0.09
313	8.26 ± 0.02	5.11 ± 0.16	4.83 ± 0.10	4.67 ± 0.19	4.86 ± 0.05
625	8.24 ± 0.02	4.97 ± 0.06	4.93 ± 0.25	4.82 ± 0.02	4.78 ± 0.13
1,250	8.24 ± 0.04	4.83 ± 0.07	4.83 ± 0.07	4.86 ± 0.05	4.62 ± 0.03
2,500	8.26 ± 0.02	5.08 ± 0.07	5.08 ± 0.07	4.87 ± 0.04	N.A.
5,000	8.19 ± 0.02	5.18 ± 0.08	N.A.	N.A.	N.A.
EGF					
0	8.23 ± 0.03	7.90 ± 0.06	7.82 ± 0.09	7.72 ± 0.08	7.93 ± 0.03
313	8.23 ± 0.02	5.24 ± 0.03	5.14 ± 0.14	5.03 ± 0.11	5.07 ± 0.16
625	8.20 ± 0.02	4.75 ± 0.13	5.03 ± 0.02	4.88 ± 0.08	4.81 ± 0.18
1,250	8.26 ± 0.02	4.79 ± 0.14	5.02 ± 0.02	4.94 ± 0.02	4.79 ± 0.15
2,500	8.18 ± 0.03	4.88 ± 0.10	4.91 ± 0.04	4.98 ± 0.00	N.A.
5,000	8.18 ± 0.02	4.83 ± 0.06	N.A.	N.A.	N.A.

N.A., not applicable.

^z Mean ± standard deviation.**Table 4.** Changes of water temperature (°C) during cumulative mortality tests of *Cyprinus carpio* in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Concentration (mg·L ⁻¹)	°C After treatment time				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Gwangan					
0	22.6 ± 0.2 ^z	22.4 ± 0.1	22.5 ± 0.2	22.3 ± 0.1	22.6 ± 0.2
313	8.26 ± 0.02	22.5 ± 0.1	22.6 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.5 ± 0.2
625	8.24 ± 0.02	22.4 ± 0.1	22.6 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.5 ± 0.1
1,250	8.24 ± 0.04	22.5 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.4 ± 0.2	22.5 ± 0.1
2,500	8.26 ± 0.02	22.4 ± 0.2	22.6 ± 0.1	22.4 ± 0.2	N.A.
5,000	8.19 ± 0.02	22.5 ± 0.1	N.A.	N.A.	N.A.
EGF					
0	8.23 ± 0.03	22.7 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.4 ± 0.1
313	8.23 ± 0.02	22.5 ± 0.1	22.3 ± 0.1	22.5 ± 0.2	22.5 ± 0.2
625	8.20 ± 0.02	22.6 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.5 ± 0.2
1,250	8.26 ± 0.02	22.5 ± 0.1	22.5 ± 0.0	22.5 ± 0.1	22.5 ± 0.1
2,500	8.18 ± 0.03	22.4 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.6 ± 0.0	N.A.
5,000	8.18 ± 0.02	22.4 ± 0.1	N.A.	N.A.	N.A.

N.A., not applicable.

^z Mean ± standard deviation.

EGF 형질전환콩과 광안콩의 처리 농도별 잉어 치사 개체 분석

담수어류의 대표적인 환경생물 독성 시험종인 잉어는 급성 독성 평가를 위해서는 일반적으로 48 및 96 시간 후의 치사 개체에 대한 평가가 수행된다(Bae et al., 2018). 이에 EGF 형질전환콩과 광안콩의 처리시 각 농도별(0, 313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 mg·L⁻¹) 처리시간(24, 48, 72, 96시간)에 따른 잉어에 대한 일반중독증상 및 치사 개체수를 조사하였다. 광안콩 처리구에서 313 - 5,000 mg·L⁻¹의 시험농도에서 잉어 급성독성시험을 실시한 결과, 48시간 경과시 313, 625 mg·L⁻¹처리구에서는 치사 개체가 없었으나, 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 48시간 경과시 각각의 농도에서 6.6, 80%의 치사 개체가 관찰되었으며, 96시간 경과시 313, 625 mg·L⁻¹처리구에서는 치사 개체가 없었으나, 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 16.6, 100%의 치사가 관찰되었다. 5,000 mg·L⁻¹처리구에서는 48시간, 96시간 후에 모두 100% 치사로 관찰되었다. EGF 형질전환콩 처리구에서 313 - 5,000 mg·L⁻¹의 시험농도에서 잉어 급성 독성 시험을 실시한 결과, 313, 625 mg·L⁻¹처리구에서는 48시간과 96시간 후에 치사 개체가 없었으나, 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 각각의 농도에서 6.6, 96.6%의 치사 개체가 관찰되었으며, 96시간 경과시 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 13.3, 100%의 치사 개체가 관찰되었다. 48시간과 96시간 경과시에 5,000 mg·L⁻¹처리구에서는 모두 100% 치사됨을 확인하였다. 처리 기간 중 음성대조군(0 mg·L⁻¹), 광안콩과 EGF 형질전환콩의 313, 625 mg·L⁻¹처리구에서는 특이 증상 및 일반중독증상은 관찰되지 않았다. 그러나, 광안콩과 EGF 형질전환콩의 1,250 mg·L⁻¹이상의 처리 농도 조건에서 일반중독증상인 아가미 호흡이 중단된 개체와 치사 개체가 관찰되었다(Table 5). 광안콩과 EGF 형질전환콩의 각 시험농도에서 잉어 치사 개체수의 t-test 검정결과 24시간후의 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서는 각각 p값이 1, 0.51으로 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 치사 개체수에서 통계적인 유의차는 없었다. 48시간 처리후의 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 p값은 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 각각 1, 0.18 이었으며, 72시간 처리후의 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 p값은 1,250, 2,500 mg·L⁻¹처리구에서 각각 0.37, 0.37 로 분석되었다. 또한, 96시간 처리후의 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 p값은 1,250 mg·L⁻¹처리구에서 0.51 이었으며, 모든 처리농도에서 광안콩과 EGF 형질전환콩간의 치사 개체수에는 통계적으로 유의적인 차이가 없었다(p > 0.05). 실험 결과를 종합하면, 모품종인 광안콩과 EGF 형질전환콩의 치사 개체수에는 통계적으로 유의한 차이는 없는 것으로 분석되었다. 이와 같은 결과는 국내 개발된 비타민 A강화벼, 병저항성 GM벼 및 가뭄저항성 GM벼의 잉어 급성독성 결과에서도 유사한 경향을 보였다(Moon et al., 2013; Oh et al., 2013; Oh et al., 2015). 또한, 전반적으로 유기물인 광안콩과 EGF 형질전환콩 시료의 처리 시간과 농도가 증가함에 따른 치사 개체수는 유사한 경향을 보였으며, EGF 형질전환콩의 처리가 잉어의 일반 중독에 미치는 영향은 광안콩과 차이가 없음을 확인하였다. 광안콩과 EGF 형질전환콩의 96시간 처리 실험 종료 후에 잉어의 체중 및 전장을 분석한 결과, 광안콩에서는 0.79 ± 0.06 g 및 3.7 ± 0.1 cm, EGF 형질전환콩은 0.81 ± 0.08 g 및 3.8 ± 0.2 cm 로 측정되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 6).

Table 5. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio* in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Concentration (mg·L ⁻¹)	Number of fish	Number of dead fish				Mortality (%)	
		24 h	48 h	72 h	96 h	48 h	96 h
Gwangan							
Control	30	0	0	0	0	0	0
313	30	0	0	0	0	0	0
625	30	0	0	0	0	0	0
1,250	30	1	2	4	5	6.6	16.6
2,500	30	22	24	29	30	80	100
5,000	30	30	30	30	30	100	100
EGF							
Control	30	0	0	0	0	0	0
313	30	0	0	0	0	0	0
625	30	0	0	0	0	0	0
1,250	30	1	2	3	4	6.6	13.3
2,500	30	23	29	30	30	96.6	100
5,000	30	30	30	30	30	100	100

Table 6. Body weight and total length of *Cyprinus carpio* after 96 hours in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Test item	Body weight (g)	Total length (cm)
3,5-dichlorophenol (reference substance)	0.49 ± 0.05 ^z	3.1 ± 0.2
Control ^y	0.80 ± 0.07	3.8 ± 0.1
Gwangan	0.79 ± 0.06	3.7 ± 0.1
EGF	0.81 ± 0.08	3.8 ± 0.2

^y Test water.

^z Mean ± standard deviation.

EGF 형질전환콩과 광안콩의 급이에 의한 잉어에 대한 급성독성

광안콩과 EGF 형질전환콩의 잉어 급성 독성시험을 수행한 결과, 48시간-LC₅₀은 광안콩은 1,947 mg·L⁻¹, EGF 형질전환콩에서는 1,727 mg·L⁻¹로 분석되었으며, 96시간-LC₅₀은 광안콩 1,575 mg·L⁻¹ (95% 신뢰한계: 1,433 - 1,731 mg·L⁻¹), EGF 형질전환콩은 1,688 mg·L⁻¹ (95% 신뢰한계: 1,585 - 1,798 mg·L⁻¹)로 EGF 형질전환콩이 광안콩에 비해 다소 낮은 독성을 보였으나, 95% 신뢰한계 구간 내의 차이로 유의성은 없는 것으로 나타났다(Table 7). 무영향농도 (NOEC)는 광안콩과 EGF 형질전환콩의 두 품종에서 625 mg·L⁻¹으로 확인되었다(Table 5).

Table 7. LC₅₀ (lethal concentration 50) values of *Cyprinus carpio* after 48 and 96 hours in non-genetically modified soybean (Gwangan) and epidermal growth factor gene (EGF) transgenic soybean.

Test item	LC50 (mg·L ⁻¹)	
	48 h	96 h
3,5-dichlorophenol (reference substance)	1.986 (1.793 - 2.200) ^z	1.609 (1.491 - 1.736)
Gwangan	1,947 (1,709 - 2,210)	1,575 (1,433 - 1,731)
EGF	1,727 (1,598 - 1,867)	1,688 (1,585 - 1,798)

^z 95% confidence interval.

이는 *PAT*와 *EGF* 유전자가 도입된 EGF 형질전환콩과 대조구인 광안콩의 잉어에 미치는 영향은 차이가 없음을 나타내며, *PAT*와 *EGF* 단백질에 의한 잉어에 부정적인 영향을 미치지 않음을 시사한다.

국외 GMO의 수입량 증가와 국내 GM작물의 개발과 연구에 따른 농경지 주변의 농업환경 생물종에 대한 위해성 평가의 필요성이 요구되고 있다. 작물 경작지 주변 환경의 서식 생물종에 미치는 잠재적인 위해성 평가는 GM작물 실용화에 중요한 요소이며, 국내에서는 가뭄저항성(Agb0103)벼와 모뎀종에 대한 잉어 영향 평가를 수행한 결과, 잉어의 이상 증상 유무, 치사율에 차이가 없는 것으로 보고되었다(Oh et al., 2015). 이는 Oh et al. (2011a)의 해충저항성 Bt벼의 환경위해성 평가와 Moon et al. (2013)의 레스베라트롤 생합성벼의 환경위해성 평가에 관한 연구에서 보고한 어류의 실험 결과와 유사하였다(Oh et al., 2011a; Moon et al., 2013). 또한, 국내 개발 GM작물인 병저항성 GM벼와 비타민 A 강화벼에 대한 잉어의 영향 평가 결과에서도 모뎀종과 통계적으로 유의한 차이가 없음이 보고되었다(Oh et al., 2013; Oh et al., 2014c).

본 실험의 어류에 대한 영향 평가는 Kim et al. (2007)이 보고한 국내의 담수 환경에서 최고 탁도 200 NTU 보다 다소 높은 $625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (277 NTU)수준에서는 96시간 급성 독성 평가에 따른 잉어의 이상 증상이나 치사 개체가 발견되지 않았으나, Kim et al. (2007)의 보고에 따르면 장기간의 영향 평가에 따른 어류의 아가미 조직에 영향을 미칠 수 있으므로 향후, GM작물에 대한 어류의 위해성 평가시에는 잉어의 아가미, 신장 등의 이상 유무 검정을 포함한 조직학적 검사와 혈액학적 평가 요소 등이 포함되어야 할 것으로 사료된다(Kim et al., 2007).

본 연구를 통해서 *EGF*와 *PAT* 유전자가 형질 전환된 EGF 형질전환콩이 비표적 생물체인 잉어에 미치는 영향을 분석한 결과, 모뎀종인 광안콩과 시험 조건에서 차이가 없음을 확인하였고, 이는 광안콩과 EGF 형질전환콩이 농경지, 수로, 하천 등의 환경에 방출되었을 때 수서 생물체인 잉어에 미치는 생물학적인 영향이 동일하다고 판단할 수 있다. 또한 본 실험에서 적용되었던 생물종의 급성독성 영향뿐만 아니라 국내 개발 GM콩 환경위해성 평가를 위해서는 농업환경생물종의 생식, 유전독성 분석 및 농업생태영향 평가를 통한 안전성평가 기준과 평가 가이드라인을 구축하여야 하며, 본 실험 결과는 이를 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Conclusion

본 연구는 인간(Human) 유래 *EGF* 유전자를 광안콩에 도입시킨 화장품 소재용 EGF 형질전환콩의 환경위해성 평가와 심사서 작성에 대한 기초 자료를 제공하고자 EGF 형질전환콩에 도입된 유전자의 발현 검증 및 어류 생물종인 잉어에 미치는 영향을 모뎀종인 광안콩과 비교 분석을 수행하였다. EGF 형질전환콩에 도입된 *PAT*와 *EGF* 유전자의 PCR 검정 결과, EGF 형질전환콩에서만 두 유전자가 검출되었으며, ELISA 방법으로 EGF 단백질 발현을 분석한 결과, EGF 형질전환콩에서만 $17.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 수준으로 발현됨을 확인하였다. 비형질전환콩인 광안콩과 EGF 형질전환콩의 잉어에 대한 급성독성시험을 수행한 결과, 광안콩은 96시간- EC_{50} 은 $1,575 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (95% 신뢰한계: $1,433 - 1,731 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 무영향농도는 $625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었으며, EGF 형질전환콩의 96시간- LC_{50} 은 $1,688 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (95% 신뢰한계: $1,585 - 1,798 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 무영향 농도(NOEC)는 $625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 분석되었다. 잉어의 급성독성 시험기간 중 광안콩과 EGF 형질전환콩 간의 체중, 전장, 수온, DO 및 pH에 대한 유의적인 차이는 없었으며, 잉어의 급성독성에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았으며, 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: PJ01368603)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

Authors Information

Sung-Dug Oh, <https://orcid.org/0000-0001-8574-6773>

Seok-Ki Min, Korea Testing & Research Institute, Senior Researcher

Jae Kwang Kim, Incheon National University, Professor

Jung-Ho Park, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Senior Researcher

Chang-Gi Kim, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Senior

Soo Yun Park, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Reference

- Bae CH, Min SK, Ryu SM, Im SH, Kim SI, Cho IS, Cho JG, Oh JA, Park YK. 2018. A study on the replaceability of reference chemical in ecotoxicity test. *Korean Journal of Pesticide Science* 40:130-142. [in Korean]
- ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications). 2019. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2018: Biotech crops continue to help meet the challenges of increased population and climate change. ISAAA Brief No. 54. ISAAA, Ithaca, NY, USA.
- Kakembo D, Rajendran DK, Lim MH, Seo JS, Lee YH. 2017. Evaluation of disease resistance in transgenic soybean varieties transformed with EGF, IGF-1, and EGF gene and possible horizontal gene transfer to plant pathogens. *Journal of Agriculture & Life Sciences* 48:8-14. [in Korean]
- KBCH (Korea Biosafety Clearing House). 2019. Major statistics on genetically modified organisms in 2018. KBCH, Daejeon, Korea.
- Kim JH, Seo JW, Na YE, An KG. 2007. Ecological health assessments on turbidwater in the downstream after a construction of Yongdam Dam. *Korean Journal of Ecology and Environment* 40:130-142. [in Korean]
- Kim KY, Kim KR, Lee SI. 2010. Acute toxicity test for heavy metals using water fleas. *Journal of Korean Wood Science Technology* 18:37-47. [in Korean]
- Kim MJ, Kim HJ, Pak JH, Cho HS, Choi HK, Jung HW, Lee DH, Chung YS. 2017. Overexpression of *AtSZF2* from *Arabidopsis* showed enhanced tolerance to salt stress in soybean. *Plant Breeding and Biotechnology* 5:1-15.
- Kim MJ, Kim JK, Kim HJ, Pak JH, Lee JH, Kim DH, Choi HK, Jung HW, Lee JD, Chung YS, Ha SH. 2012. Genetic modification of the soybean to enhance the β -carotene content through seed-specific expression. *PLOS ONE* 7:e48287.
- Kwon T, Kim HJ, Yun SY, Kim J, Cho HS, Nam J, Chung YS. 2017. Enhancement of syringin contents in soybean seeds with seed-specific expression of a chimeric *UGT72E3/E2* gene. *Plant Biotechnology Reports* 11:439-447.
- Lee SM, Park SY, Yeo YS, Cho HS, Kwon SJ, Oh SD, Oh SW, Kim JK, Park SK. 2015. The Allergy Assessments of Insect-resistant Agb0101 Rice. *The Journal of the Korean Society of International Agriculture* 27:69-75. [in Korean]
- Moon JH, Moon JM, Lee YH, Lee JJ. 2013. Influence of transgenic rice plant transformed with silbene synthase gene on insect fauna and biosafety evaluation on biological indicators. *Journal Agriculture Life Science* 44:11-16. [in Korean]
- Oh SD, Jang YJ, Park SY, Suh SJ, Lee BK. 2020. Characterization of hybrid soybean seeds between β -carotene enhanced transgenic soybean and wild soybean. *Weed & Turfgrass Science* 9:129-139. [in Korean]

- Oh SD, Kim JS, Lee DY, Ryu TH, Suh SJ. 2015. Risk assessment and evaluation of drought-tolerant transgenic rice: Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on drought-tolerant transgenic rice variety. The Journal of the Korean Society of International Agriculture 27:497-504. [in Korean]
- Oh SD, Lee DY, Sohn SI, Lee KJ, Ryu TH, Lee JY, Park BS, Kweon SJ, Suh SC, Park JS. 2011a. Risk assessment and evaluation of Bt-transgenic rice: Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on Bt-transgenic rice variety. The Journal of the Korean Society of International Agriculture 23:570-577. [in Korean]
- Oh SD, Lee KJ, Park SY, Lee DY, Sohn SI, Kim MY, Ryu TH. 2013. Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on disease resistant (OsCK1) rice variety. The Journal of the Korean Society of International Agriculture 32:231-239. [in Korean]
- Oh SD, Lee KJ, Park SY, Ryu TH, Suh SJ. 2014b. Acute toxicity evaluation to *Daphnia magna* of disease resistant (OsCK1) rice. Korean Journal of Environmental Agriculture 33:121-128. [in Korean]
- Oh SD, Lee KJ, Park SY, Sohn SI, Ryu TH, Kim JK, Kim JS, Ahn HI, Ha SH, Park JS, Ahn BO, Cho HS, Suh SJ. 2012. Molecular biological analysis of carotenoid-biofortified rice and its effect on *Daphnia magna* feeding. The Journal of the Korean Society of International Agriculture 24:477-484. [in Korean]
- Oh SD, Lim MH, Lee BK, Yun DW, Sohn SI, Chang AC, Park SK, Suh SJ. 2018. Effects of insect-resistant genetically modified rice (Bt-9) cultivation on non-target insect diversity. Korean Journal of Agricultural Science 45:28-37. [in Korean]
- Oh SD, Shin HS, Sohn SI, Lee KJ, Kim HJ, Ryu TH, Lee JY, Park BS, Kweon SJ, Suh SC, Park JS. 2011b. Evaluation and assessment of biosafety for Bt-transgenic rice: Responses of *Daphnia magna* fed on Bt-transgenic rice variety. Journal of Applied Biological Chemistry 54:296-302. [in Korean]
- Oh SD, Sohn SI, Lee KJ, Shin HC, Park JS, Ryu TH. 2014c. Risk assessment and evaluation of carotenoid-biofortified rice: Responses of *Misgurnus Anguillicaudatus* and *Cyprinus Carpio* fed on carotenoid-biofortified rice variety. The Journal of the Korean Society of International Agriculture 26:27-34. [in Korean]
- Oh SD, Won SY, Lee KJ, Shon SI, Lee SM, Park SK, Ryu TH. 2014a. Molecular biological characteristics and biosafety assessment for drought tolerant transgenic rice. Korean Journal of Breeding Science 46:389-399. [in Korean]
- Park JS, Kim HJ, Cho HS, Jung HW, Cha JY, Yun DJ, Oh SW, Chung YS. 2019. Overexpression of *AtYUCCA6* in soybean crop results in reduced ROS production and increased drought tolerance. Plant Biotechnology Reports 13:161-168.
- Versteeg DJ, Stalmans MSD, Janssen C. 1997. Ceriodaphnia and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. Chemosphere 34:869-892.