

Evaluation of Genetic Safety in Genome-editing Rice Through Comparative Analysis of Genetic and Agronomic Traits

Seung-Kyo Jeong^{1,2}, Dohyeong Gwon^{1,2}, Bae-Hyeon Lee^{1,2}, Jeong-Hwan Suh^{1,2}, Rahmatullah Jan², Jae-Ryoung Park³, Taehun Ryu⁴ and Kyung-Min Kim^{1,2*}

¹Department of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Korea

²Coastal Agriculture Research Institute, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Korea

³Crop Breeding Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju, 55365, Korea

⁴Biosafety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju 54874, Korea

Received July 17, 2024 / Revised August 15, 2024 / Accepted August 17, 2024

New breeding techniques (NBT) recognize specific DNA sequences and remove, modify, or insert DNA at a desired location, and can be used to treat genetic diseases in humans or to improve the traits of livestock or crops. In this study, we conducted a comparative analysis of various agricultural traits and assessed the safety of gene transferability in third-generation genome-editing rice (*OscKq1-G₃*) with T and G nucleotide insertions developed using the CRISPR/Cas9 SDN-1 method, in comparison to its parental line (*Oryza sativa* L., cv IImi). The analyzed traits included heading date, culm length, panicle length, tiller number, yield, germination rate, viviparous germination rate, shattering, after wintering seed viability, the presence of toxins and allergens. The target trait, heading date, exhibited a high significant difference of approximately 5 days. Culm length, panicle length, tiller number, yield showed no significant differences compared to the parental line. No T-DNA bands indicating gene transfer were detected. In the third generation of genome-edited rice, the T-DNA was confirmed to be eliminated as successive generations advanced through self-pollination. Through the analysis of germination rate, viviparous germination rate, shattering, and after wintering viability, we confirmed that the genome-editing rice has no potential for weediness. The ORF and amino acid sequences of the genome-editing rice did not reveal any toxins and allergens. The results of this study can be utilized as important data for the environmental risk assessment of genome-editing rice.

Key words : Genome-editing, heading data, rice, SDN-1

서 론

인구 증가, 환경 변화, 식량 부족 등의 주요 문제를 해결하기 위해 벼(*Oryza sativa* L.) 품종은 더 높은 수확량과 환경 스트레스에 대한 내성을 갖고 개발되어야 한다[26]. 쌀의 품질과 수확량을 높이기 위해 다양한 방법이 개발되고, 사용되었다[3]. 식용 식물의 육종 기술은 선발 육종, 이종 교배, 방사선 돌연변이, 유전자 조작, 유전자 교정 순으로 발달했다[27]. 선발 육종은 우량 작물 간의 교배 방식으로 이루어지고, 이종교배는 다른 종간 교배하여 우량 형질만을 선발하는 방식이다. 전통적이고 가장 문제가 없는 육종 방법이지만, 이 두 방법은 육성 기간이 5년에서

30년 소요된다. 방사선 돌연변이는 무작위 유전자에 돌연변이를 일으켜 목표 유전자의 수정이 어려우며, 유전자 조작은 외래 유전자를 식물에 삽입하는 방식으로 잠재적 위험에 대한 우려가 크다[14]. 유전자 교정 기술은 외부 유전자 삽입 없이 기존 서열을 수정하는 방식으로, 방사선 돌연변이와 유전자 조작에서의 단점이 보완되고, 3년에서 5년의 짧은 시간이 소요되는 장점이 있다[16]. New breeding technology (NBT)는 지난 몇십 년 동안 발전을 이루었으며 zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), CRISPR/Cas9 세 가지 기술이 유전자를 정밀하게 수정할 수 있는 능력을 혁신적으로 높였으며[13]. 각 기술은 정밀성, 효율성 및 편의성 측면에서 큰 진전을 이루어 유전연구와 응용범위를 확대시켰다[7]. CRISPR/Cas9은 특정 유전자를 표적으로 삼아 원하는 부위에 double strand break (DSB)를 생성한다[9]. DSB가 발생하면, non-homologous end joining (NHEJ) 또는 homology directed repair (HDR)같은 DNA repair 메커니즘이 작동한다. 대부분의 DSB는 NHEJ에 의해 복구되며, 이 과정에서 불일치와 유전자 삽입 또는 삭제가 발생

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5711, Fax : +82-53-950-6880

E-mail : kkm@knu.ac.kr

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.

하여 유전자의 비활성화로 이어진다[11]. 앞서 말했듯이 CRISPR/Cas9을 이용하여 유전자 교정을 하면 DSB가 발생하는데 DSB 복구는 복구 경로에 따라 SDN-1, SDN-2와 SDN-3로 나뉘고 다른 결과를 초래할 수 있다[1]. SDN-1은 NHEJ를 이용하여 돌연변이를 유도한다. 반면, SDN-2는 HDR을 통해 짧은 서열의 목표 뉴클레오타이드를 정확하게 대체하는 데 사용된다. SDN-3도 HDR을 사용하지만, 전체 유전자 서열을 포함하는 긴 서열의 DNA를 대체하거나 도입하는 데 주로 사용된다. SDN-2와 SDN-3는 외래 유전자의 도입을 이용하여 돌연변이를 초래하나, SDN-1은 외래 유전자 도입 없이 유전자 단편 내에서 돌연변이가 일어난다. 이 말은 SDN-1은 전통 육종에서 자연 변이와 다른 것이 없다는 것을 시사한다[2, 25]. 유전자 교정 기술인 CRISPR/Cas9을 이용하면 작물을 쉽고 빠르게 개량할 수 있고, 새로운 종자 자원 개발과 다양한 식물, 특히 식량 작물의 특성을 변경하는 데 최적이다[21]. 하지만 유전자 교정을 이용하여 개량된 작물에 대한 규제는 국가나 지역에 따라 다르게 적용된다. 일부 국가와 지역에서는 유전자 교정 작물을 유전자 변형 생물(genetically modified organism, GMO)로 분류하여 규제하는 반면, 다른 곳에서는 이를 GMO로 간주하지 않고 규제를 완화하거나 면제하기도 한다. 이러한 규제의 차이는 각국의 법률과 정책에 따라 달라지며, 유전자 교정 기술의 적용 방식에 대한 다양한 접근 방식을 반영하고 있다[29]. GMO 작물은 유전자 교정 과정에서 발생할 수 있는 잠재적인 환경 및 인간 건강에 대한 위험과 불확실성으로 인해 안전성 문제가 제기된다. 이러한 우려는 GMO 작물이 농업 작물로 사용될 때 농업 및 환경에 미치는 영향과 주변 생태계의 교란 가능성, 의도치 않은 유전자 전이와 환경 방출로 인해 슈퍼 잡초의 출현 등의 위험을 포함한다. 자연환경에서 GMO 작물은 상대적으로 유리한 특성을 획득하여 생태적 불균형을 초래하고 예기치 않은 피해를 일으킬 수 있다[20]. 이에 본 연구에서는 CRISPR/Cas9의 SDN-1으로 유전자 교정된 벼와 모본인 Ilmi의 농업적 특성을 비교분석, 외래유전자 및 그 일부 잔존 여부, 동종 및 야생 근연종으로의 유전자 전달 가능성, 잡초 발생 가능성과 유전자 교정 벼의 교정된 서열의 독소 및 알레르겐 분석을 통하여 유전자 교정 기술의 잠재력과 유전적 및 환경적 안전성을 강조하고, 이러한 평가를 통해 우수한 벼 품종 개발을 위한 유전자 교정의 사용을 지지하는 증거를 증가시키고, 지속 가능한 농업 발전에 기여할 수 있음을 보여주고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험의 실험 식물체인 Ilmi와 유전자 교정 벼를 사용

했다. 유전자 교정에 이용된 유전자는 *OsCKq1* (*PCKP*)는 일장반응을 조절하여 벼 개화 시기 조절과 벼 종자 크기에 관여하는 유전자이다[18, 30]. *OsCKq1* 유전자를 목표로 하여 교정된 벼는 CRISPR/Cas9에 의해 T와 G 염기가 들어갔으며, 장일 조건에서 *OsCKq1* 유전자 교정 벼는 벼 개화를 촉진하는 것으로 알려진 유전자인 *Hd3a*, *Ehd1*, *RFT1*의 mRNA 수치가 증가하는 반면에 *OsCKq1*의 mRNA 수치가 감소하여 출수에 관여한다는 것과, 종자 크기에 관여하는 유전자인 *BR* 신호에 민감성이 낮고 *WG3* 발현이 되지 않아 종자의 크기가 증가한 것을 확인했다.[18]. Ilmi와 유전자 교정 벼는 대한민국 대구광역시 군위군 효령면에 위치한 경북대학교 GMO 포장에서 재배했고, 유전자 교정 벼는 G₄세대까지 세대진전 했다(위도 36° 6' 46.13"N, 경도 128° 38' 25.21"E). 본 실험에서 사용한 유전자 교정 벼 식물체는 G₃세대이고, 유전자 교정 벼의 종자는 G₄세대이다[17].

필드 설계 및 이앙

2023년 4월 16일에 최아 및 종자 소독을 위하여 침종했으며, 물 20 L당 10 mL SPOTAK (Hankooksamgong, Seoul, Korea)을 희석한 희석액에 범씨가 충분히 담기게 하여 24 시간 소독 후 깨끗한 물로 교체했다. 2023년 4월 19일에 파종을 했고, 최아가 된 종자를 50구 트레이(54 cm × 28 cm × 4.8 cm)(Bumngong, Jeongeup, Korea)에 파종했으며, 3일간 암 처리했다. 유전자 전이성을 분석하기 위하여 2023년 5월 26일에 유전자 교정 벼를 중심으로 북동-동서, 남동-북서, 동-서, 북-남 방향으로 모본인 Ilmi를 재식거리 30 × 15 cm로 검정포를 설계했고 손 이앙했고, 유전자 전이 안전성을 확인하기 위해 각 구역의 방향마다 a에서 v까지 나누었다(Fig. 1). 비료는 농촌진흥청의 표준 벼 재배법에 따라 N-P2O₅-K₂O (9.0-4.5-5.7 kg/10a⁻¹)로 구성되었다.

유전자 교정 벼의 농업형질조사

농업형질조사는 이앙한 줄 당 50% 이상의 출수율을 기준으로 출수일을 기록하고, 이후에 지면에서 이삭목까지의 길이인 간장을 측정하고, 지면으로부터 최상위 엽 끝까지의 길이인 초장에서 간장의 길이를 뺀 수장을 측정하고, 분얼 수를 셸다[17]. 마지막으로 수확 후 수분 함량이 15%에서 20%인 상태의 종자를 저울을 사용하여 수량(kg/10a)를 측정했다.

유전자 전이 안전성 스크리닝

유전자 전이 안전성 평가를 위해, Ilmi, 조생수중형 유전자교정체 3세대(*OsCKq1*-G₃) 식물체와 근연종을 실험 재료로 사용했다. 다음 세대의 유전자 전이를 확인하기 위해, 수확기에 유전자 전이성 검정포 각 구역에서 유전자 교정 벼와 Ilmi의 잎과 종자를 채취하여 사용했다. 근연

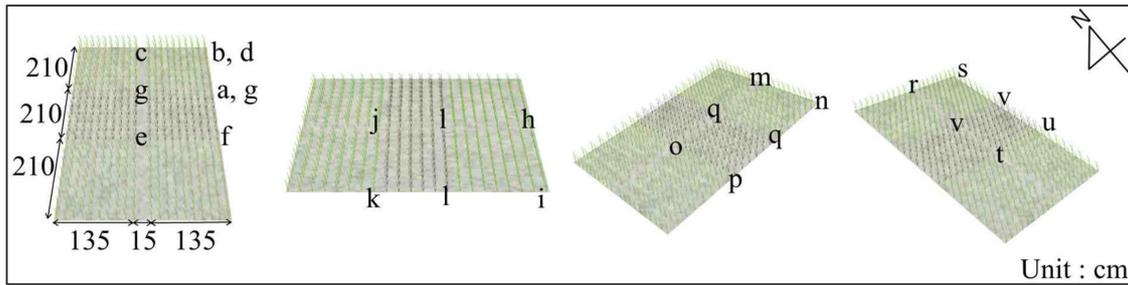


Fig. 1. Field design for assessing gene transferability. The experimental field was divided into four quadrants, oriented north-east-southwest, southeast-northwest, east-west, and north-south. b, c and d are Ilmi in the northeast, e and f are Ilmi in the southwest, a and g are genome-editing rice (*O_sCKq1-G₃*) in the northeast-southwest region, h and i are Ilmi in the southeast, j and k are Ilmi in the northwest, l is genome-editing rice in the southeast-northwest, m and n are Ilmi in the east, o and p are Ilmi in the west, q is genome-editing rice in the east-west region, s and r are Ilmi in the north, t and u are Ilmi in the south, v is genome-editing rice in the north-south region.

중 간의 유전자 전이성을 평가하기 위해, 두 차례(이앙기와 수확기)에 걸쳐 근연종을 채취 및 분석했다. 유전자 교정 벼와 Ilmi는 유전자 전이성 검정포의 a와 b구역에서 채취하였고, 근연종은 경북대학교 GMO 필드의 동쪽 외곽의 다섯 지점으로부터 각각 동쪽으로 7 m, 17 m, 27 m 떨어진 곳과 북쪽 외곽의 세 지점으로부터 각각 북쪽으로 7 m, 17 m, 27 m 떨어진 곳을 c에서 z로 구역을 설정 후 식물체의 잎을 채취하여 분석에 사용했다. 총 24개의 지점에서 근연종의 잎을 채취했다(Fig. 2)[17]. Ilmi와 근연종 모두 DNeasy Plant Mini Kit (Cat. 69104, QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출했고, Prime Taq DNA Polymerase (Cat. G-1000, Genetbio Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR을 진행했다. 유전자 전이성을 평가하기 위해, 유전자 교정에 사용된 *Agrobacterium tumefaciens*의 감염된 식물체에 T-DNA를 넣는 특성과 pRGEB32 vector의 T-DNA에 존재하는 선별마커로 사용되는 *hph* primer (Table 1)를 사용했다.

잡초화 가능성 평가

잡초화 가능성을 평가하기 위해 발아율, 수발아율, 탈립성 평가 및 동토발아 종자 활력 평가를 진행했다. 발아율 평가는 종자를 50립씩 3반복으로 growth chamber 50°C에서 3일간 휴면타파를 처리한 후, 증류수에 적신 멸균지를 깐 petri dish에 배양기 28°C 조건에서 15일간 배양하여 2 mm 이상의 새싹 또는 뿌리가 나온 것을 발아로 기록했다. 평균 발아속도는 발아 수에 발아일을 나누어 계산했다. 평균 발아 일수는 유전자 교정 벼와 Ilmi 각각의 반복



Fig. 2. Image for the collection of related species to verify gene transferability between genome-editing rice and related species. The red area represents the GMO field. c, f, l, o, r, u and x are located 7 m away from the GMO field, d, g, j, m, p, s, v and y are 17 m away from the GMO field, c, h, k, n, q, t, w and z are 27 m away from the GMO field.

된 발아 일수의 평균이다. 발아율은 싹이 나온 종자의 수를 총 종자 수로 나눈 후, 그 값에 100을 곱하여 백분율로 계산했다[16]. 수발아율 평가는 출수 후 50일이 지난 이삭을 하나씩 3반복으로 수분 함량을 12-15%로 유지하고 트레이(38 × 28 × 9)에 펼쳐 증류수에 적신 탈지면으로 덮은 후 암조건에서 25°C에서 15일간 배양하여 최소 2 mm 이상의 싹이나 뿌리가 나온 것을 발아로 기록했다. 평균 수당 영화 수, 최종발아 수, 수발아율을 분석했다. 평균 수당 영화 수는 유전자 교정 벼와 Ilmi의 각 이삭들의 영화 수의

Table 1. Design of hygromycin gene to amplify by PCR

Primer	GC (%)	Tm (°C)	Length (bp)	Sequence	Product size (bp)
5' → 3'	55	60.1	20	AGAAGATGTTGGCGACCTCC	590
3' → 5'	60	60.3	20	GCCCTCTACATCGAAGCTG	

평균이다. 유전자 교정 벼와 Ilmi의 각 이삭에서 발아한 영화 수의 평균으로 최종발아 수를 계산했다. 수발아율은 각 이삭의 발아영화 수를 영화수로 나눈 후, 그 값에 100을 곱하여 백분율로 계산했다[16]. 탈립성 평가는 작물이 익을 때 자연적으로 씨앗이 분산되는 현상을 의미한다. 출수 후 50일이 지난 이삭을 채취하여 수분 함량을 12-15%로 유지했다. 벼 낱알의 당기는 힘은 Digital Force Gauge (DPS-5, Imada Inc., Toyohashi, Japan)와 핀셋을 이용하여 40립씩 3회 반복하여 측정했다. 이삭을 장치에 매달고 이삭 축과 수평방향으로 장력을 측정하고 이삭 축과 수직방향으로 횡력을 측정했다[17, 19]. 당해 수확한 Ilmi와 유전자 교정 벼 종자 100립을 지표면으로부터 0 cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm 깊이의 동토에 2023년 12월 19일부터 2024년 3월 28일까지 100일간 종자를 보관했다. 껍질을 벗긴 종자를 40°C에 1시간 2차 증류수에 침지 후, 배아의 축을 중심으로 세로로 자르고, 1% 농도의 tetrazolium 용액에 30°C 4시간 반응시켜 tetrazolium 환원 분석을 진행했다[5]. 종자 활력은 배아의 정도와 형태를 관찰하여 평가했다[8].

유전자 교정 벼의 독소 및 알레르겐 생성 여부 평가

유전자 교정 벼의 안전성을 확인하기 위해 교정된 서열이 독소 및 알레르기 유발 물질을 생산하는지 평가했다. 교정된 서열의 open reading frame (ORF)의 서열을 분석하여 독소 및 알레르겐 데이터베이스의 아미노산 서열과 유사성을 비교했다. *OsCKq1*의 고유 식별 번호는 AK069612고, AllergenOnline 웹사이트를 통해 독소 생산을 분석하고, Allermatch 웹사이트를 통해 알레르겐 생산을 분석했다[12].

결 과

유전자 교정 벼의 목표형질 모본과 차이가 나는지 확인하기 위해 유전자 교정 벼와 Ilmi의 출수기를 비교했다. Ilmi의 출수는 평균 127.5일 걸렸고, 유전자 교정 벼는 122.5일 걸렸다(Fig. 3). 출수기는 유전자 교정 벼가 Ilmi에 비해 5일 빨랐다.

유전자 교정 벼와 Ilmi의 목표형질인 출수기를 제외하고 농업형질이 동일한지 확인하기 위해 간장, 수장, 분얼수와 수량을 비교분석 하였다. Ilmi 간장의 평균 길이는 66.2±2.7 cm, 유전자 교정 벼는 66.0±4.3 cm였다. Ilmi 수장의 평균 길이는 19.6±1.4 cm 유전자 교정 벼는 19.1±1.8 cm였다. Ilmi의 평균 분얼 수는 10.8±2.4개, 유전자 교정 벼의 평균 분얼 수는 11.1±2.7개였다. Ilmi의 평균 수량 665.6 kg/10a이고 유전자 교정 벼의 평균 수량은 722.2 kg/10a였다(Fig. 4). 유전자 교정 벼와 Ilmi의 간장, 수장, 분얼 수와 수량은 모두 같았다.

유전자 교정 벼의 유전자 전이성을 확인하기 위해, 유

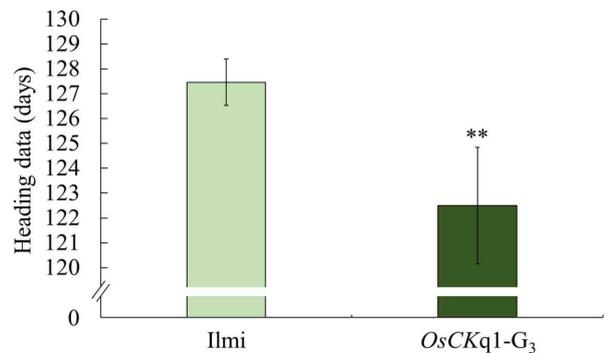


Fig. 3. Heading data of Ilmi and genome-editing rice were investigated and compared. The heading data of the genome-editing rice was 5 days earlier than that of Ilmi. The heading date analysis was conducted with 6 rows of *OsCKq1* and 12 rows of Ilmi. **Significantly different at the level of *t*-test ($p < 0.01$).

전자 전이성 검정포의 a구역에서 v구역까지 채취한 유전자 교정 벼와 Ilmi의 잎과 종자를 PCR 분석했다(Table 2, Fig. 5A). 그 결과, 모든 잎과 종자에서 밴드가 확인되지 않았다. 또한, 이앙기와 수확기 두 시기에 유전자 전이성 검정포의 a구역과 b구역에서 채취한 유전자 교정 벼와

Table 2. Gene transferability between genome-editing rice and Ilmi

Item	Sample	Direction	Tissue of sample	PCR analysis
a	<i>OsCKq1-G3</i>	-	Leaf	Negative
b	Ilmi	Northeast	Leaf	Negative
c	Ilmi	Northeast	Seed	Negative
d	Ilmi	Northeast	Seed	Negative
e	Ilmi	Southwest	Seed	Negative
f	Ilmi	Southwest	Seed	Negative
g	<i>OsCKq1-G4</i>	-	Seed	Negative
h	Ilmi	Southeast	Seed	Negative
i	Ilmi	Southeast	Seed	Negative
j	Ilmi	Northwest	Seed	Negative
k	Ilmi	Northwest	Seed	Negative
l	<i>OsCKq1-G4</i>	-	Seed	Negative
m	Ilmi	East	Seed	Negative
n	Ilmi	East	Seed	Negative
o	Ilmi	West	Seed	Negative
p	Ilmi	West	Seed	Negative
q	<i>OsCKq1-G4</i>	-	Seed	Negative
r	Ilmi	North	Seed	Negative
s	Ilmi	North	Seed	Negative
t	Ilmi	South	Seed	Negative
u	Ilmi	South	Seed	Negative
v	<i>OsCKq1-G4</i>	-	Seed	Negative

- denotes the genome-editing rice located in the middle of each section of the gene transferability test field.

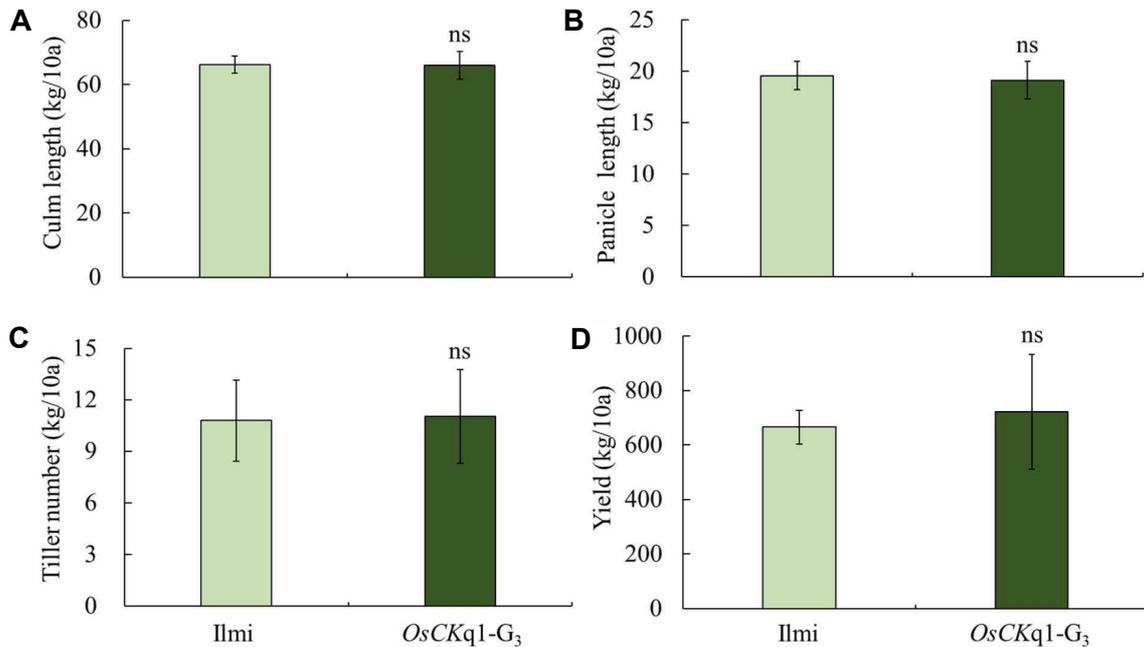


Fig. 4. The agricultural traits of Ilmi and genome-editing rice were investigated and compared. The culm length, panicle length, tiller number and yield were same between the genome-editing rice and Ilmi. (A) culm length, (B) panicle length, and (C) tiller number, (D) yield. The number of plants used for agricultural trait analysis included 40 for the *OsCKq1-G₃* and 80 for the Ilmi. ^{ns}No significantly at the level of *t*-test ($p < 0.05$).

Ilmi의 잎과 GMO 필드의 동쪽과 북쪽에서 채취한 c구역에서 z구역까지의 24개의 근연종 잎을 PCR 분석한 결과 (Table 3, Fig. 5B, 5C), 모든 잎에서 밴드가 확인되지 않았다.

유전자 교정 벼의 잡초화 가능성을 확인하기 위해 유전자 교정 벼와 Ilmi의 발아율을 비교분석 한 결과, 평균 발아 속도(seeds/days)는 동일하게 3.2 ± 0.1 평균 발아 일수는 Ilmi가 3.8 ± 0.5 일 유전자 교정 벼는 4.3 ± 0.3 일 발아율(%)은

동일하게 97.3 ± 3.1 이었다(Table 4). 유전자 교정 벼와 Ilmi의 평균 발아 속도, 평균 발아 일수와 발아율(%) 모두 동일했다.

유전자 교정 벼의 잡초화 가능성을 확인하기 위해 유전자 교정 벼와 Ilmi의 수발아율을 비교분석 한 결과, 최종 발아 수는 Ilmi와 유전자 교정 벼 각각 90.7 ± 12.0 과 14.7 ± 7.8 이었으며, 수발아율(%)은 각각 78.8 ± 18.8 과 13.7 ± 7.3 이



Fig. 5. To verify gene transferability, PCR was performed using *hph* primer on genome-editing rice, Ilmi and related species, followed by electrophoresis to confirm for the presence of bands. (A) confirmation of transferability between genome-editing rice and Ilmi, (B) confirmed the transferability between genome-edited rice and related species during the transplanting stage, (C) confirmed the transferability between genome-edited rice and related species during the harvest stage. No bands were detected in any of the lines. The amplified products were loaded on 0.8% agarose gel. M: λ /Hind III, +: positive marker.

Table 3. Gene transferability between genome-editing rice and related species

Item	Sample	Direction	Distance (m)	Tissue of sample	PCR analysis
a	<i>OsCKq1-G₃</i>	-	-	Leaf	Negative
b	Ilmi	-	-	Leaf	Negative
c	Related species	East	07	Leaf	Negative
d	Related species	East	17	Leaf	Negative
e	Related species	East	27	Leaf	Negative
f	Related species	East	07	Leaf	Negative
g	Related species	East	17	Leaf	Negative
h	Related species	East	27	Leaf	Negative
i	Related species	East	07	Leaf	Negative
j	Related species	East	17	Leaf	Negative
k	Related species	East	27	Leaf	Negative
l	Related species	East	07	Leaf	Negative
m	Related species	East	17	Leaf	Negative
n	Related species	East	27	Leaf	Negative
o	Related species	East	07	Leaf	Negative
p	Related species	East	17	Leaf	Negative
q	Related species	East	27	Leaf	Negative
r	Related species	North	07	Leaf	Negative
s	Related species	North	17	Leaf	Negative
t	Related species	North	27	Leaf	Negative
u	Related species	North	07	Leaf	Negative
v	Related species	North	17	Leaf	Negative
w	Related species	North	27	Leaf	Negative
x	Related species	North	07	Leaf	Negative
y	Related species	North	17	Leaf	Negative
z	Related species	North	27	Leaf	Negative

- denotes the genome-editing rice located in the middle of each section of the gene transferability test field.

Table 4. Weediness potential analysis

Assessment of weediness potential	No. of total seeds (Ilmi/ <i>OsCKq1-G₃</i>)	Pedigree		P-value
		Ilmi	<i>OsCKq1-G₃</i>	
Average germination speed (seeds/days)	150/150	3.2±0.1 ^z	003.2±0.10	1.000
Average days to germination (days)	150/150	3.8±0.5 ^z	004.3±0.30	0.427
Germination rate (%)	150/150	97.3±3.100 ^z	097.3±3.10	1.000
Final germination floret numbers (ea)	438/319	90.7±12.00 ^z	014.7±9.5**	<0.01
Viviparous rate (%)	438/319	62.4±9.15 ^z	013.7±9.0**	<0.01
Tension (g)	120/120	128.3±6.300 ^z	120.2±8.80	0.245
Lateral forces (g)	120/120	19.9±5.40 ^z	016.7±2.30	0.417

^zmean ± SD.

**Significantly different at the level of *t*-test (*p*<0.01)

었다(Table 4). 유전자 교정벼가 Ilmi에 비해 최종발아 수가 적었고, 수발아율(%) 또한 유전자 교정 벼가 Ilmi에 비해 낮았다

유전자 교정 벼의 잡초화 가능성을 확인하기 위해 유전자 교정 벼와 Ilmi의 탈립성을 비교 분석한 결과 Ilmi와 유전자 교정 벼의 장력은 각각 128.3±6.3과 120.2±8.8이었고, 횡력(g)은 각각 19.9±5.4와 16.7±2.3이었다(Table 4). 유전자 교정 벼와 Ilmi의 탈립성은 동일했다.

유전자 교정 벼의 잡초화 가능성을 확인하기 위해 tetra-

zolium 환원 분석을 통해 동결토양(Table 5)에서 유전자 교정 벼와 Ilmi 종자의 활력을 측정했다[17, 20]. 동결토양에서 약 100일 동안 배양된 종자에 tetrazolium 용액을 사용하여 tetrazolium 환원 분석을 한 결과 유전자 교정 벼와 Ilmi 모두 반응이 일어나지 않았다. 유전자 교정 벼와 Ilmi 모두 tetrazolium 환원 분석에서 동일한 결과가 나왔다.

유전자 교정 벼의 안전성을 확인하기 위해 교정된 서열의 ORF를 독소 및 알레르겐 데이터베이스 분석을 한 결과 유전자 교정 벼의 교정된 ORF와 아미노산 서열과 유사성

Table 5. After-wintering seed viability

Wintering depth (cm)	No. of total seeds	Pedigree	
		Ilmi	<i>OsCKq1-G₃</i>
0	100	0	0
10	100	0	0
20	100	0	0
30	100	0	0

을 가지는 독소 및 알레르겐은 없었다(results not shown).

고찰

여러 산업, 농업, 생명공학, 헬스케어뿐만 아니라 식품, 환경, 화장품, 섬유 등 다양한 산업에서 유전자 교정 기술의 산업화와 안전성에 관심을 두고 있으며, GM 식물의 비의도적 표현형과 환경 영향은 연구자와 일반 대중 모두에게 중요한 관심사이다. 전 세계 여러 국가가 환경 위험 평가(ERAs)를 통해 GM 작물을 규제하고 엄격히 관리하여 GMO 작물에 대한 불안을 줄이고 있다[23]. 이에 GMO 위험 평가는 유전자 변형 식물의 안전성 분석 결과를 제공함으로써 소비자 우려를 줄일 수 있다[24]. GMO 위험 평가는 유전자 교정 벼와 모본인 Ilmi의 농업적 특성 비교, 잡초화 가능성, 자연환경에서의 생존력, 독소 및 알레르겐 분석, 비의도적 유전자 전이를 분석했다. 유전자 교정 벼는 Ilmi를 모본으로 출수기에 영향을 주는 유전자 *OsCKq1*을 CRISPR/Cas9으로 교정한 3세대 벼이다. 2023년 유전자 교정 벼와 Ilmi의 농업적 특성에서 *OsCKq1*의 목표 형질인 출수기는 Ilmi보다 5일 빨랐다. 하지만 그 외 형질인 간장, 수장, 분얼 수와 수량은 같으므로 CRISPR/Cas9의 높은 특이성과 유전자 교정 벼의 안전성을 시사한다. 유전자 교정 벼의 잡초화 가능성을 분석하기 위해 발아율, 수발아율, 탈립성 평가를 진행했다. 각 방향과 거리별로 유전자 교정 벼의 유전자 전이 여부를 분석했다. 화분 분사에 따른 환경 방출을 분석한 결과 30×15 cm의 재식 간격으로 실험 설계된 Ilmi와 동쪽의 다섯 지점으로부터 7 m, 17 m, 27 m 거리별로 채취된 15개의 근연종과 북쪽의 세 지점으로부터 7 m, 17 m, 27 m 거리별로 채취된 9개의 근연종 모두 T-DNA가 PCR에 의해서 증폭되지 않았다. 벼 화분은 바람에 의해 비교적 짧은 거리 내에서 많이 퍼지고[28], 상대적으로 수분 함량이 높아 건조에 민감해 공기에 노출된 후 5분이 지나면 수명이 다 하게 된다[22]. 이러한 근거를 통해 1 m 이상 거리가 멀어지면 유전자 전이 위험성이 낮다고 판단했다. 또한 유전자 교정 초기 세대에서는 T-DNA가 이형 접합 상태로 존재할 가능성이 매우 높다. 이 때 T-DNA는 유전자 교정 식물이 자가수정을 통해 유성 생식을 겪을 때 멘델의 분리 법칙에 의해 분리가 되고, 그 분리에 의해 다음 세대의 종자 중 최소

3/4의 종자만이 T-DNA를 포함하는 종자가 만들어진다는 [15]. 따라서 세대를 거듭할수록 유전자 교정 벼 외래유전자인 T-DNA가 외부로 방출될 위험이 없음을 판단했다 [4]. 잡초화 가능성 평가에서 발아율, 수발아율, 탈립성과 통토발아 활력을 평가했다. 발아율 평가에서는 유전자 교정 벼와 Ilmi는 동일했다. 유전자 교정 벼와 Ilmi의 수발아율 평가에서는 유전자 교정 벼가 Ilmi에 비해 수발아율이 낮았다. 탈립성 평가에서 유전자 교정 벼와 Ilmi의 장력 값과 령력 값 모두 동일했다. 동결토양 조건을 처리한 유전자 교정 벼 종자와 Ilmi에 tetrazolium 용액을 이용하여 tetrazolium 환원 분석을 한 결과, 종자의 배가 착색되지 않아 활력이 없는 것으로 조사되었다[17, 20]. 발아율과 탈립성 평가에서 값이 동일한 것은 모본과 차이가 없어 잡초화 가능성이 낮음을 의미하고[17], 잡초의 수발아율이 재배작물의 수발아율보다 높은 경향을 보이므로 수발아율 평가 또한 잡초화 가능성이 적다는 것을 뜻한다[6]. Tetrazolium 환원 분석 평가를 통하여 유전자 교정 벼가 자연환경에 방출되더라도 한국의 계절 특성으로 인해 도태되어 잡초화 가능성이 없음을 확인했다[10, 19, 20]. 교정된 ORF 및 아미노산 서열과 유사성을 가지는 독소 및 알레르겐이 없으므로 유전자 교정 벼는 무해하다는 것을 보여준다. 수발아율 평가에서 유전자 교정 벼와 Ilmi 차이를 보였는데, *OsCKq1*가 벼 개화 시기 조절과 종자 크기에 관련된 유전자이기 때문에 영향을 미쳤을 수 있으나, 본 실험에 사용된 식물체가 3세대이기 때문에 차후 조사가 더 필요하다. 본 연구에서는 다양한 방법으로 농업적 특성과 유전적 특성을 포괄적으로 평가하여 형질 전환 식물의 전반적인 안정성에 대한 다 차원적인 시각을 제공한다. 또한, 제한된 환경이 아닌 실제 농업 현장에서 접할 수 있는 조건을 재현하기 위해 개방된 필드에서 실험을 진행하였다. 이는 안전성 평가에 더 긍정적인 영향을 줄 수 있다 [23]. 따라서 본 연구에서 GMO 위해성 평가 항목 중 모본과의 비교분석, 환경 영향 평가, 독성 및 알레르기 가능성 평가를 통해 유전자 교정 벼에 대한 안전성을 입증했고, 유전자 교정 벼의 환경 위해성 평가에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업의 지원을 받아 수행되었습니다(Project No. RS-2024-00348677).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahmad, A., Khan, S. H. and Khan, Z. 2021. CRISPR Crops: The Future of Food Security, pp. 261-287, 1st ed., Springer Singapore: Singapore.
- Aravind, B., Molla, K., Mangrauthia, S. K. and Mohannath, G. 2023. Strategies to improve genome editing efficiency in crop plants. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **32**, 661-672.
- Ashikari, M. and Matsuoka, M. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends Plant Sci.* **11**, 344-350.
- Azizi-Dargahlou, S. and Pouresmaeil, M. 2023. Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation: A review. *Mol. Biotechnol.* **66**, 1563-1580.
- Carvalho, I. L., Meneghello, G. E., Tunes, L. M. d., Jácome, C. C. and Soares, V. N. 2017. Methodological adjustments to the tetrazolium test in rice seeds. *J. Seed Sci.* **39**, 41-49.
- Choi, H. Y., Kim, E. G., Park, J. R., Jang, Y. H., Jan, R., Farooq, M., Asif, S., Kim, N., Kim, J. H. and Gwon, D. 2023. Volunteer plants' occurrence and the environmental adaptability of genetically modified fodder corn upon unintentional release into the environment. *Plants* **12**, 2653.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. and Voytas, D. F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Cottrell, H. 1947. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. *Nature* **159**, 748-748.
- Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096.
- Eriksson, D., Harwood, W., Hofvander, P., Jones, H., Rogowsky, P., Stöger, E. and Visser, R. G. 2018. A welcome proposal to amend the GMO legislation of the EU. *Trends Biotechnol.* **36**, 1100-1103.
- Fiaz, S., Ahmad, S., Noor, M. A., Wang, X., Younas, A., Riaz, A., Riaz, A. and Ali, F. 2019. Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: Perspectives and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 888.
- Fiers, M. W., Kleter, G. A., Nijland, H., Peijnenburg, A. A., Nap, J. P. and Van Ham, R. C. 2004. Allermatch™, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. *BMC bioinformatics* **5**, 1-6.
- Gaj, T., Gersbach, C. A. and Barbas, C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397-405.
- Gao, C. 2021. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell* **184**, 1621-1635.
- He, Y., Mudgett, M. and Zhao, Y. 2022. Advances in gene editing without residual transgenes in plants. *Plant Physiol.* **188**, 1757-1768.
- Hsu, P. D., Lander, E. S. and Zhang, F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262-1278.
- Jeon, D. W., Park, J. R., Jang, Y. H., Kim, E. G., Ryu, T. and Kim, K. M. 2021. Safety verification of genetically modified rice morphology, hereditary nature, and quality. *Environ. Sci. Eur.* **33**, 73.
- Kim, E. G., Jang, Y. H., Park, J. R., Wang, X. H., Jan, R., Farooq, M., Asaf, S., Asif, S. and Kim, K. M. 2024. *OsCKq1* regulates heading date and grain weight in rice in response to day length. *Rice* **17**, 48.
- Lee, G. H., Kang, I. K. and Kim, K. M. 2016. Mapping of novel QTL regulating grain shattering using doubled haploid population in rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Genomics.* **2016**, 2128010.
- Lee, S. Y., Kim, E. G., Park, J. R., Jang, Y. H., Jan, R., Ryu, T. and Kim, K. M. 2021. Construction of risk assessment manual for genetically modified rice (*Oryza sativa* L.). *J. Crop Sci. Biotechnol.* **24**, 221-228.
- Liu, H., Chen, W., Li, Y., Sun, L., Chai, Y., Chen, H., Nie, H. and Huang, C. 2022. CRISPR/Cas9 technology and its utility for crop improvement. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10442.
- Moon, S. and Jung, K. H. 2020. First steps in the successful fertilization of rice and Arabidopsis: Pollen longevity, adhesion and hydration. *Plants* **9**, 956.
- Nickson, T. E. 2008. Planning environmental risk assessment for genetically modified crops: Problem formulation for stress-tolerant crops. *Plant Physiol.* **147**, 494-502.
- Paoletti, C., Flamm, E., Yan, W., Meek, S., Renckens, S., Fellous, M. and Kuiper, H. 2008. GMO risk assessment around the world: Some examples. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, S70-S78.
- Podevin, N., Davies, H. V., Hartung, F., Nogué, F. and Casacuberta, J. M. 2013. Site-directed nucleases: A paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends Biotechnol.* **31**, 375-383.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C. and Foley, J. A. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE* **8**, e66428.
- Singh, B. D. and Singh, A. K. 2015. Marker-assisted Plant Breeding: Principles and Practices, pp. 3-16, Springer New Delhi: New Delhi, India.
- Song, Z., Lu, B. R. and Chen, J. 2004. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodivers. Conserv.* **13**, 579-590.
- Van Vu, T., Das, S., Hensel, G. and Kim, J. Y. 2022. Genome editing and beyond: What does it mean for the future of plant breeding? *Planta* **255**, 130.
- Wang, X., Chung, I. K., Kim, H. Y. and Kim, K. M. 2018. Plant development of new ecological model related to yield using QTL analysis. *Euphytica* **214**, 1-11.

초록 : 유전적 특성과 농업형질의 비교분석을 통한 유전자 교정 벼의 안전성 평가

정승교^{1,2} · 권도형^{1,2} · 이배현^{1,2} · 서정환^{1,2} · 라마툴라진² · 박재령³ · 류태훈⁴ · 김경민^{1,2*}

(¹경북대학교 응용생명과학과, ²경북대학교 해안농업연구소, ³농촌진흥청 국립식량과학원 작물육종과, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 생물안전성과)

New Breeding Technology (NBT)는 특정 DNA 서열을 인식하여 원하는 위치에서 DNA의 염기서열을 제거, 수정 또는 삽입할 수 있으며, 이는 인간의 유전병 치료나 가축 및 작물의 특성 향상에 사용될 수 있다. 본 연구에서는 모본인 벼(*Oryza sativa* L., cv Ilmi)와 CRISPR/Cas9의 SDN-1에 의해 T와 G염기가 들어간 3세대 유전자 교정 벼(*OsCKq1-G₃*)의 출수기, 간장, 수장, 수수, 수량, 유전자 전이 안전성, 발아율, 수발아율, 탈립성, 동토발아 활력, 독소 및 알레르겐 생성 여부를 분석했다. 목표형질인 출수기는 유전자 교정 벼가 5일 빨랐다. 간장, 수장, 수수, 수량은 Ilmi와 동일했다. 유전자 전이성을 확인하기 위한 T-DNA 밴드는 모두 확인되지 않았다. 3세대 유전자 교정 벼에서 자가 교배를 통한 세대가 지남에 따라 T-DNA가 사라진 것을 확인했다. 발아율, 수발아율, 탈립성과 동토발아 활력검증 분석을 통해 유전자 교정 벼의 잡초화 가능성은 없다는 것을 확인했다. 교정된 벼의 ORF 및 아미노산 서열에서 독소와 알레르겐은 발견되지 않았다. 본 실험을 통해 유전자 교정 벼의 안전성을 입증했고, 유전자 교정 벼의 환경 위해성 평가에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.