

RAPD PCR에 의한 GM벼의 야생 근연종 벼로의 유전자 전이 분석법

김윤식, 김현순, 정혁, 전재흥*
한국생명공학연구원 식물유전체연구센터

The Investigation of Gene Flows in Artificial Pollination between GM Rice and its Wild Relatives by RAPD Analysis

Yoon-Sik Kim, Hyun-Soon Kim, Joung Hyouk and Jae-Heung Jeon*

Plant Cell Biotechnology Lab., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Oun-dong 52,
Yusong-gu, Daejeon 305-333, Korea

Abstract - In recent years, there has been increasing concerns in gene flow from GM crops to wild or weedy relatives as a potential risk in the commercialization of GM crops. To access the possibility of the environmental impacts by GM rice, small-scale experiments of gene transfer were carried out. Herbicide and drought stress resistant GM rice and non-GM rice Nakdongbyeo, wild rice *Oryza nivara*, and weedy rice Sharebyeo were used for artificial pollination experiments and *bar* gene was used as a tractable marker after pollination. The harvested putative hybrid seeds after artificial pollination were germinated and true hybrid plants were selected by basta treatment. The hybrid plants were verified again by PCR amplification of *bar* and trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) genes and RAPD PCR analysis.

Key words - GM rice, Gene flow, RAPD

서 언

최근 농작물의 생산성 향상에 GMO 작물의 개발과 연관된 농업생명공학기술의 발전은 점차 늘어나는 인구수에 의한 식량부족, 지구 기후 및 환경의 변화, 그리고 각종 오염에 따른 농경지의 감소 및 생산성의 감소 등의 문제점의 해결방안으로 인식되고 있다. GMO 작물의 개발은 높은 생산성을 가지거나 변화된 환경에 적응성을 가지도록 인위적으로 조절이 가능하기 때문에 이러한 문제들을 해결할 수 있는 가장 적절한 대안으로 제시되었다. 이러한 이유로 GMO 작물은 1990년대 중반부터 상업적으로 이용되기 시작하였고, GMO 식물체의 개발과 재배면적이 점차 늘어나고 있는 추세에 있다(Monastra and Rossi, 2003).

개발된 GMO 작물이 사람이나 환경에 미치는 영향은 아주 미세하거나, 장기간에 걸쳐 나타나기 때문에 그 영향을 파악하기 어렵다. 하지만 슈퍼잡초의 발생(Ferber, 1999; Kling, 1996; Roger *et al.*, 2002)이나 수평적 유전자전이 등에 의한 생태계의 교란(Nielsen *et al.*, 1998; Lorenz and Silorski, 2000; Dale *et al.*, 2002; Daniell, 2002)과 도입된 유전자에 의한 독성 또는 알레르기 유발 가능성(Nosey *et al.*, 1999; Spok *et al.*, 2005; D'Agnolo, 2005) 등이 보고되고 있다. 이러한 위험성이 잠재해 있음에도 불구하고 GMO 작물이

가지는 경제성과, 편리성, 높은 생산성 등의 이유 때문에 GMO 작물의 생산은 지속적으로 늘어나고 있는 추세에 있다(Conner, 2002).

근연종간의 교잡은 아주 오래 전부터 행해져 왔고, 오랜 시간에 걸쳐 이런 고전적인 교잡에 의해 유전자의 전이가 일어난 작물의 환경에 대한 무해성이 입증되어왔다. 하지만 GMO작물의 경우 제초제, 곤충, 미생물, 재해 환경에 저항성을 나타낼 수 있는 식물체 유래 이외의 외래유전자도 직접 식물체 내에 생명공학 기술을 사용하여 형질전환 한다(Snow, 2002). 그러므로 GMO 작물들이 자연 환경에 노출될 경우 야생 근연종과의 자연 교잡에 의해 GMO 작물에 도입된 유전자가 잡초성 작물에 전이될 가능성이 제기되었고, 잡초성 작물에 전이된 저항성들이 생태계에 미치게 될 영향에 대한 위험성이 제기되고 있다(Snow, 2002). 하지만 GMO 작물과 야생종과의 교배에 의해 전이된 유전자의 전이의 정도와, GMO 작물에서 야생종으로 전이된 유전자에 의한 환경의 위험성에 대한 평가는 작물의 종류와 재배 환경에 따라 다르고, 오랜 시간이 필요하므로 아직 명확한 결론을 내리지 못하고 있다.

이 실험은 GMO 작물의 개발과 상업적 이용을 위한 GMO의 환경위해성 평가기술 개발의 일환으로, 내재 저항성을 유도하기 위한 trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) 유전자와 제초제 저항성을 유도하는 *bar* 유전자로 형질전환시킨 GM벼(Jang *et al.*, 2003)의 야

*교신저자(E-mail) : jeonjh@kribb.re.kr

생 근연종과의 인공 교잡을 수행하고 교잡 추정종자를 파종한 후 제초제를 처리하여 삽입 유전자의 야생 근연종으로의 유전자 전이를 조사하였고, PCR 및 RAPD PCR 분석방법을 사용하여 전이된 유전자의 이동과 교배를 RAPD 분석에 의해 정확히 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

야생 벼 및 LM 벼의 재배

시험 재료는 명지대 김주근 박사팀이 개발한 내제저항성을 가진 GM벼(Jang *et al.*, 2003)와 대조구인 낙동벼, 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양 받은 야생종 벼인 *Oryza nivara*(003258), 한국화학연구소로부터 분양 받은 잡초성 벼인 샤레벼(강화)를 사용하였다. 각각의 벼는 차폐된 비닐 하우스에서 수도용 상토가 담긴 사각포트에 파종하여 발아시켰고, 발아된 종자는 사각상자(35cm × 45cm)에 옮겨 개화기까지 성장시킨 후 인공 교배를 실시하였다. 인공교배는 개화기 직전의 낙동벼 및 야생근연종인 *Oryza nivara*와 잡초성 벼인 샤레벼(강화)의 수술을 제거하고 인위적으로 GM벼의 수술을 수분시켜 교배하였다.

제초제 살포 인공 및 자연교배에 의해 얻어진 교잡추정 종자들을 사용하여 파종하였고, 파종한지 3주 후 본엽이 1~2장 정도 나왔을 때 3mg/l 농도의 바스타를 처리하고, 약 5일 후에 2, 3차 처리하여 바스타에 저항성을 가지는 개체를 선별하였다.

Genomic DNA 추출 및 RAPD PCR 분석

벼의 genomic DNA는 유묘기의 잎 0.1g을 채취하여 CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 식물의 genomic DNA 분리방법을 변용하여 추출하였다(Doyle and Doyle, 1990). Primer는 60개의 Operon 10-mer kit X, Y, Z primer(Operon Technologies, USA)를 사용하였다. PCR 증폭은 AccuPower[®] PCR PreMix(Bioneer Co., Chungwon, Korea)에 각 품종의 벼로부터 추출한 DNA 2μl와 10 pmole 농도의 각각의 primer 2μl를 넣고 총 부피 20μl로 하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 최초 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C에서 45초, 40°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 40회 반복하였다. 그 후 72°C에서 7분 합성반응을 완성하도록 과정을 거쳤다. PCR 반응 후 PCR 증폭산물은 0.8%의 agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

PCR 분석

교잡추정종자에서 GM벼로부터 *bar* 및 *TPP* 유전자의 전이를 확인하고자 PCR분석을 수행하였다. AccuPower[®] PCR PreMix에 식물체로부터 추출한 0.1 μg/μl 농도의 genomic DNA 1 μl와 10 pmole 농도의 tpp1(5'-gatgacagaaccgttaacc-3'), tpp2(5'-tttagatact-acgactaaa-3') primer(Seo *et al.*, 2000)와 bar-S(5'-tcgtcaa-

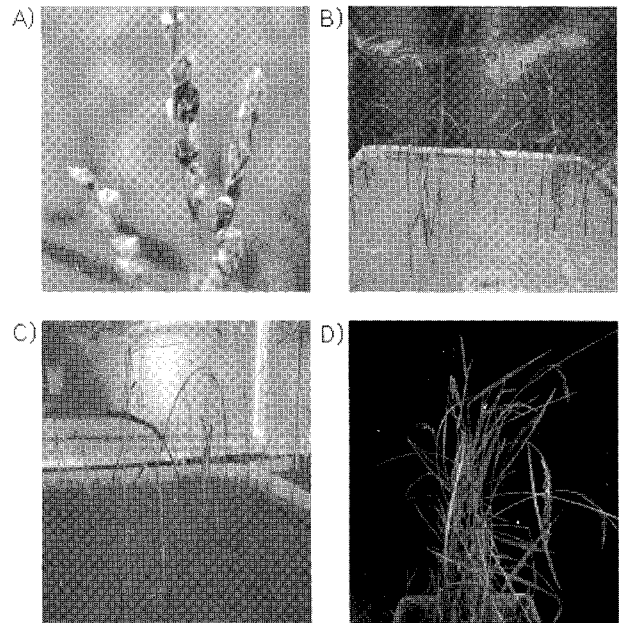


Fig. 1. Putative hybrid rice crossed with GM rice for 1 month after artificial pollination (A). Photographs of germination for 20 days and herbicide treatments (B, C), hybrid rice of weedy rice Sharebyeo × GM rice (B) and after 7 days of basta treatment (3mg/L) (C). Maturation of F2 hybrid seeds from Basta selected hybrid plant (D).

ccactacatcgagac-3'), bar-AS(5'-ctgaagtccagctg ccagaac-3') primer를 각각 1 μl를 넣고 총 부피 20 μl로 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고, 94°C에서 45초, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초 과정을 30회 반복하였고 72°C에서 7분 동안 합성반응을 완성하도록 한 후 agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 반응산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

인공교배에 의한 교잡 식물체 선별 및 분석

인공교배는 개화기인 8월에 GM벼의 모체인 낙동벼와 야생종인 *O. nivara*, 잡초성 벼인 샤레벼의 수술을 각각 제거하고 인위적으로 GM벼의 수술을 수분시켰다(Fig. 1a). 인공교배 결과 샤레벼의 경우 총 2,412개의 인공 수분을 실시하여 최종적으로 5.4%인 131개의 교배 추정 종자를 얻을 수 있었다. *O. nivara*의 경우 총 3,405개의 인공 수분을 실시하여 최종적으로 8.8%인 300개의 교배 추정종자를 얻을 수 있었다. 낙동벼와의 교배에서는 총 4,609개의 인공 수분을 실시하였는데 최종적으로 9.8%인 451개의 종자 결실율을 보였다(Table 1). 유전자의 이동을 추적 조사하기 위하여 이들 교배추정 종자들을 사각포트에서 발아시키고 최종 발아후의 생존율을 조사한 결과 샤레벼, *O. nivara*, 낙동벼를 모본으로 얻어진 교배 추정 종자의 생존율은 각각 55%, 33.7%, 42.6%로 나타났다. GM 벼에 존재하는 제초제 저항성

Table 1. Germination test of various rice cultivars and basta selection of putative hybrid seeds of GM rice by artificial pollination

Character	Number of pollination	Number of putative hybrid seed	Total Number of germination	Number of plants basta selected
Sharebyeo	-	-	196/200(98 %)	0
Nakdongbyeo	-	-	198/200(99 %)	0
GM rice	-	-	186/200(93 %)	186
<i>O. Nivara</i>	-	-	161/200(80.5 %)	0
Nakdongbyeo + GM rice	4609	451(9.8 %)	192/451(42.6 %)	1/192
<i>O. Nivara</i> + GM rice	3405	300(8.8 %)	101/300(33.7 %)	0/101
Sharebyeo + GM rice	2412	131(5.4 %)	72/131(55.0 %)	1/72

유전자의 교잡 종자로의 유전자 전이 여부를 확인하기 위해 인공교배에 의하여 결실된 교잡 추정 종자들을 받아서 20일 정도 생육한 벼에 제초제인 비스타를 살포하여 제초제 저항성 여부를 확인한 결과, 낙동 교잡 벼에서와 사레 교잡 벼에서 각각 1개체가 제초제로부터 저항성을 나타내었다 (Fig. 1b,c). 최종적인 제초제 처리 후 생존한 개체 수를 총 인공수분한 개체수로 나누면 총 인공교배의 시도 횟수를 기준으로 한 유전자의 전이율을 계산할 수 있는데 그 결과는, 낙동벼는 0.022%, 사레벼는 0.041%, *O. nivara*는 0%의 전이율을 각각 나타내었다. 그러므로 GM 벼의 모본인 낙동벼 뿐만 아니라 잡초성 벼인 사레벼로의 제초제 저항성 유전자가 전이되었음을 알 수 있었으며, 야생 벼인 *O. nivara*로의 유전자 전이는 적어도 0.03%의 확률에서는 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 일반적으로 알려진 사레벼 등의 잡초성 벼의 자연교잡율이 평균 0.9% 정도인 것을 생각해보면 결실되어 받아서 100개중에 1개가 잡초성 벼임을 추측할 수 있다. 본 실험 결과에서는 사레벼의 경우 총 72개의 받아서 1개체의 교잡식물체를 얻었으므로 잡초성 벼의 평균 자연교잡율과 유사한 1.4%의 인공교잡율을 보였다. 인공 교잡된 제초제 저항성 사레벼는 생육과 종자의 성숙 등에서 사레벼의 특성을 가짐을 확인할 수 있었으며 종피가 검은 색이며 탈립의 성질을 그대로 지니고 있었다(Fig. 1d).

RAPD PCR 분석에 의한 유전형질 Marker 선발 및 검증

RAPD PCR 반응 후 나타나는 DNA의 형태는 품종에 따라 고유한 특징을 가지며, 각기 다른 품종 사이에 교잡이 일어나면 교잡이 일어난 품종들의 DNA의 형태가 겹쳐지는 것으로 정확히 교잡 여부를 확인할 수 있다. 야생 및 근연종과 GM 벼의 교배 후 교잡 여부에 대해 유전자를 통하여 확인하고 분석하기 위하여 각 품종의 벼로부터 genomic DNA를 분리한 후 RAPD PCR 분석을 실시하였다. 총 60개의 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 각 품종의 유전형질을 구별할 수 있는 아래의 4개의 primer를 선발하였다(OPX-04; 5'-CCGCT-ACCGA-3', OPX-06; 5'-ACGCCAGAGG-3', OPY-17; 5'-GACGTGGTGA -3', OPZ-03; 5'-CAGCACCGCA-3'). 이들 선발된 primer들은 교잡종자들의 유전형질의 이동 여부를 확인하기

위한 RAPD PCR marker로 사용하였다. 교잡산물의 유전형질을 낙동벼와 야생종인 *O. nivara* 및 잡초성인 사레벼 사이의 근연관계 및 교잡 여부를 확인하기 위해 선발된 RAPD marker를 사용하여 RAPD PCR을 수행한 후 비교하였다. Primer OPX-04에서 사레벼는 세개의 굵은 밴드를 가지는데 이중 중앙의 밴드는 다른 품종의 벼들에서는 나타나지 않았다. 이 밴드가 사레 교잡 벼에서 나타난 것으로 보아 사레 교잡 벼의 유전자가 사레벼로부터 전이된 것을 알 수 있었고, 또한 OPX-06의 사레 교잡 벼에서는 사레벼에서는 나타나지 않았지만 GM 벼에서 나타난 밴드를 가지고 있는 것으로 보아 사레벼와 GM 벼의 교잡에 의해 유전자가 전이된 것을 증명할 수 있었다(Fig. 2). 하지만 낙동 교잡 벼의 경우 낙동벼가 GM 벼의 모체로 사용된 품종이기 때문에 RAPD PCR을 통한 marker 선별과정에서 DNA 형태가 대부분 동일하게 나타났다. 그 결과 낙동 교잡 벼의 교잡 여부는 RAPD PCR을 통해서 확인하기 어려웠으며 낙동벼와 GM 벼를 구별할 수 있는 RAPD primer들을 여러 개 확보한 후에나 명확한 구분이 가능하리라 사료된다.

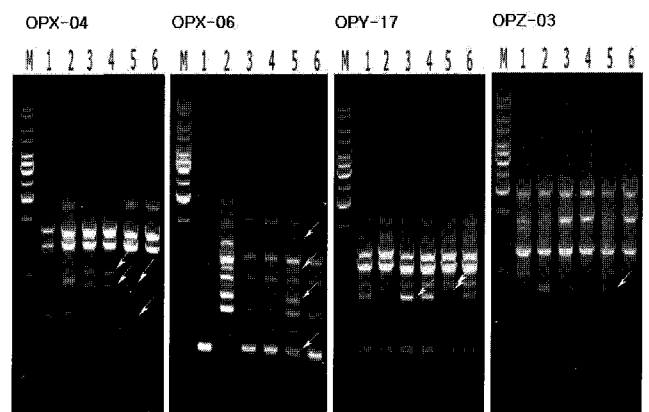


Fig. 2. RAPD PCR analysis from six different rice plants. 1. Wild rice *O. nivara*, 2. weedy rice Sharebyeo from Kangwha, 3. Nakdongbyeo, 4. GM rice from Nakdongbyeo, 5. hybrid rice of weedy rice Sharebyeo × GM rice, 6. hybrid rice of Nakdongbyeo × GM rice, M. DNA molecular size marker.

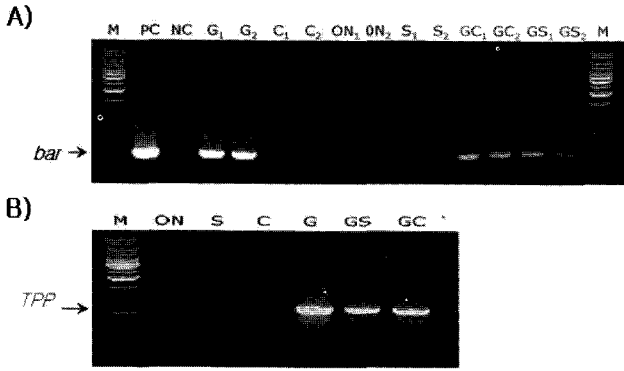


Fig. 3. PCR amplification of *bar* and *TPP* genes from different rice plants. (A) M; DNA molecular size marker, PC; positive control (vector), NC; Negative control of no template, G_{1, 2}, GM rice 1, 2; C_{1, 2}, Nakdongbyeo 1, 2; S_{1, 2}, weedy rice Sharebyeo from Kangwha 1, 2; GC_{1, 2}, Nakdongbyeo × GM rice 1, 2; GS_{1, 2}, weedy rice Sharebyeo × GM rice 1, 2. (B) M, molecular size marker; ON, wild rice *O. nivara*; S, weedy rice Sharebyeo from Kangwha; C, Nakdongbyeo; G, GM rice; GS, hybrid rice of weedy rice Sharebyeo from Kangwha × GM rice; GC, hybrid rice of Nakdongbyeo × GM rice.

내재 저항성 벼에 도입된 유전자의 PCR 검증

제초제 처리에 의해 선별된 교잡종자들을 사용하여 GM벼의 도입 유전자인 *bar* 유전자와 *TPP* 유전자의 전이 여부를 PCR 반응을 통해 검증하였다. 제초제인 바스타를 통한 개체 선별을 거친 교잡 식물체로부터 GM벼에 도입된 *bar* 및 *tpp* 유전자가 교잡벼에서도 안정적으로 유지되어 있는 것을 확인하기 위하여 식물체로부터 추출한 DNA로부터 *bar*-S primer와 *bar*-AS primer를 사용하여 PCR 분석을 수행한 결과 GM벼와 낙동 및 사레 교잡벼에서 *bar* 유전자의 DNA 밴드를 확인하였다. 또한 내재저항성을 유도하기 위해 GM벼에 도입된 유전자인 *TPP* 유전자를 *tpp1*과 *tpp2* primer를 사용하여 PCR 분석을 통해 GM벼와 낙동 교잡벼, 사레 교잡벼의 genomic DNA에 *TPP* 유전자가 존재하고 있음을 확인하였다 (Fig. 3). 이러한 결과로 GM벼에 도입되었던 *bar* 유전자와 *TPP* 유전자가 교배를 통해 낙동 교잡벼와 사레 교잡벼에게 전이 되었음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 위의 실험결과들을 살펴볼 때 GMO의 환경 위해성 평가 기술의 하나인 식물간의 유전자 이동조사 체계의 확립을 위해 유전자 이동의 가능성과 유전자 전이율을 야생 근연종과의 인공교배 실험으로 조사하였고 PCR 및 RAPD PCR 분석방법을 사용하여 전이된 유전자의 이동과 교배여부를 성공적으로 검증할 수 있었다.

적 요

최근 GMO 작물의 재배, 생산이 날로 늘어나며 GMO 작물이 환경에 미칠 수 있는 많은 가능성들이 대두되고 있다. 특히 GMO 작물과 야생

종과의 자연교잡에 의한 유전자 전이로, 잡초화의 문제점이 제기되며 생태계의 변화 및 파괴의 위험성이 우려되고 있다. 본 실험에서는 GM벼와 야생 및 근연종 사이의 교잡가능성 및 유전자 전이율을 조사하기 위한 유전자 이동의 분석 체계를 확립하고자 하였다. 벼의 개화시기에 GM벼와 야생 및 근연종 간의 인공교배 후 수확한 교잡 추정 종자를 받아 시켜서 제초제를 처리하여 교잡종자를 선별하였다. 또한 GM벼 및 야생 근연종벼들 간의 RAPD PCR 분석을 통해 선별한 marker를 사용하여 낙동 교잡벼와 사레 교잡벼가 GM벼와 교배된 식물체임을 확인하였다. PCR 분석을 수행한 결과 GM벼에서 도입된 trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) 유전자와 선별 marker로 사용된 *bar* 유전자가 GM벼 뿐만 아니라 사레 교잡벼에도 존재하였으며, 결과적으로 GM벼의 *bar* 및 *tpp* 유전자가 잡초성벼인 사레 교잡벼에 전이 되었음을 검증할 수 있었다.

사 사

본 연구는 과학기술부의 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부로 이에 감사드리며, 아울러 야생종 벼인 *Oryza nivara*를 분양해주신 농업생명공학연구소의 유전자원과와 잡초성벼인 사레벼를 제공해주신 한국화확연구소 황인택 박사님께도 이에 감사드립니다.

인용문헌

Conner, A. J., T. R. Glare and J. P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. *The Plant Jour.* 33: 19-46.
 D'Agnolo, G. 2005. GMO: Human health risk assessment. *Vet. Res. Commun.* 2: 7-11.
 Dale, P. J., B. Clarke and E. M.G. Fontes. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotech.* 20: 567-574.
 Daniell H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotech.* 20: 581-586.
 Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
 Ferber, D. 1999. Risks and benefit: GM crops in the cross hairs. *Science.* 286: 1622-1666.
 Jang, I. C., S. J. Oh, J. S. Seo, W. B. Choi, S. I. Song, C. H. Kim, Y. S. Kim, H. S. Seo, Y. D. Choi, B. H. Nahm and J. K. Kim. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6 phosphate synthase and trehalose-6 phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.

- Kling, J. 1996. Agricultural Ecology: Could Transgenic Supercrops One Day Breed Superweeds? *Science* 274: 180-181.
- Lorenz, M. G. and J. Sikorski. 2000. The potential for intraspecific horizontal gene exchange by natural genetic transformation: sexual isolation among genomovars of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol.* 146: 3081-3090.
- Monastra, G. and L. Rossi. 2003. Transgenic foods as a tool for malnutrition elimination and their impact on agricultural systems. *Rivista di Biologia. Biology Forum* pp. 363-384.
- Nielsen, K. M., A. M. Bones, K. Smalla and van J. D. Ellass. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria- a rare events? *FEMS Microbiol. Rew* 22: 79-103.
- Nosey, J. E., L. S. Rayor and M. E. Carter. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214-214.
- Roger, M. A., L. Lamond, C. Preston, S. B. Powles and R. T. Roush. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial calnola fields. *Science* 296: 2386-2388.
- Seo, H. S., Y. J. Koo, J. Y. Lim, J. T. Song, S. H. Kim, J. K. Kim, J. S. Lee and Y. D. Choi. 2000. Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2484-2490.
- Snow, A. A. 2002. Transgenic crops - Why gene flow matters. *Nature Biotech* 20: 542-542.
- Spök, A., H. Gaugitsch, S. Laffer, G. Pauli, H. Saito, H. Sampson, E. Sibanda, W. Thomas, M. van Hage and R. Valenta. 2005. Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organisms. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137(2): 167-80.

(접수일 2006.7.14 ; 수락일 2006.9.15)