KJOAS

ISSN (Print) : 2466-2402
ISSN (Online) : 2466-2410

PLANT & FOREST

Acute toxicity evaluation of drought-tolerant transgenic rice Agb0103 to *Daphnia magna*

Sung-Dug Oh[1], Bum Kyu Lee[1], Soo-Yun Park[1], Doh-Won Yun[1], Soo-In Sohn[1], Ancheol Chang[1], Sang Jae Suh[2]*

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

[2]School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Korea

*Corresponding author: sjsuh@knu.ac.kr

Abstract

A drought-tolerant transgenic rice (Agb0103) was developed using a pepper methionine sulfoxide reductase (*CaMsrB2*) under the control of rice *Rab21* promoter with a selection marker, the phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*) gene. Commercialization of genetically modified (GM) crops will require the evaluation of risks associated with the release of GM crops. With the potential problems associated to GM crops safety testing, the investigation of their effects on non-target organisms is necessary for environmental risk research. This study was carried out to assess acute toxicity of a GM crop using the water flea (*Daphnia magna*) for non-target organism risk evaluation. The effect of acute toxicity on *Daphnia magna* of Agb0103 rice and a non-GM rice, Ilmibyeo, were investigated at different concentrations (0, 625, 1,250, 2,500, 5,000, and 10,000 mg/L). The Agb0103 rice used for the test was confirmed to express the *CaMsrB2*/*PAT* gene by the PCR and ELISA. *Daphnia magna* feeding tests showed no significant differences in cumulative immobility or abnormal response with either Agb0103 rice or non-GM rice. The 48hr-EC_{50} values showed no difference between Agb0103 rice (2243 mg/L) and non-GM rice (2694 mg/L). These results suggest that there is no significant difference in toxicity to *Daphnia magna* between Agb0103 rice and its non-GM counterpart.

Keywords: *Daphnia magna*, drought-tolerant transgenic rice, risk assessment

OPEN ACCESS

Citation: Oh SD, Lee BK, Park SY, Yun DW, Sohn SI, Chang A, Suh SJ. 2016. Acute toxicity evaluation of drought-tolerant transgenic rice Agb0103 to *Daphnia magna*. Korean Journal of Agricultural Science 43:205-214.

DOI: http://dx.doi.org/10.7744/kjoas.20160023

Editor: Kee Woong Park, Chungnam National University, Korea

Received: April 21, 2016

Revised: June 2, 2016

Accepted: June 8, 2016

Copyright: ©2016 Korean Journal of Agricultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

제초제내성 GM (Genetically Modified) 콩이 개발되어 1996년 처음 상업적으로 재배된 이후, 2014년 1억 8,150만 헥타르의 GM작물이 재배되어 GM작물의 재배면적이 무려 106배 이상 증가하였으며, GM종자 시장규모도 157억 달러에 이르고 세계 종자시장의 35%를 차지한 것으로 농업생명공학 응용을 위한 국제서비스(ISAAA)는 보고하고 있다(James, 2014). GM작물은 작물의 생산성과 환경저항성을 높일 수 있어 인구증가에 따른 식량부족, 지구 환경의 변화와 농경지 및 생산성 감소 등의 세계 농업 현안들을 해결할 수 있는 대안으로 제시되고 있으며(Woo et. al., 2015), 농업생명공학 연구는 1988년에 Toriyama et al. (1988)에 의해서 최초 형질전환체 벼 (*Oryza sativa*)가 개발되었고, 중국, 일본, 미국 등에서도 활발하게 GM 벼 개발이 이루어지고 있

다(Toriyama et al., 1988).

국내에서는 제초제저항성, 영양성분 강화, 해충저항성, 가뭄저항성 등의 다양한 기능성 유전자들이 도입된 GM벼의 개발이 집중적으로 이루어지고 있다(Jung et al., 2004; Ha et al., 2010; Shin et al., 2009; Oh et al., 2010). 2014년까지 상업적으로 재배가 승인된 GM작물은 없으나 농촌진흥청, 대학 및 기업에서 벼, 잔디, 고추, 콩, 감자, 토마토 등을 중심으로 다양한 작물에 유전자 도입이 시도되고 있으며, 기능이 검증된 제초제저항성 잔디와 레스베라트롤생합성 벼 등의 일부 GM작물의 이벤트 계통들은 안전성평가를 통한 실용화를 진행하고 있다. GM작물의 실용화를 위해서는 '유전자변형생물체의 국가 간 이동 등에 관한 법률 통합고시'(LMO법)의 별표 10-1의 세부 위해 영향 자료에서 도입된 유전자의 발현에 의한 영양성분 변화, 알레르기와 독성 등에 관한 식품안전성 평가 및 유전자이동성, 잡초(야생)화 및 토착화 가능성, 주변 생물 및 생태계에 미칠 수 있는 영향 등에 대한 환경위해성 평가를 수행해야 하며 그 중에서도, 특히 도입 유전자에 의한 농업환경 생물종에 대한 영향 평가 항목이 GM작물의 안전성 심사서에 필수적으로 요구되고 있다(Oh et al., 2014a; Lee et al., 2015).

GM작물의 비표적 생물체에 대한 영향평가는 국외에서는 해충저항성 옥수수(MON810)과 해충저항성 Bt벼(Huahui 1)에 대한 물벼룩(*Daphnia magna*)의 생존과 번식률 등에 대한 실험이 보고되었으며(Thomas et al., 2010; Li et al., 2014), 국내에서도 국내 개발 GM작물의 실용화와 국외 GM작물 수입량 증가에 따른 수송로 및 경작지 주변의 환경지표 생물종 설정과 이에 대한 영향 평가의 필요성이 요구되고 있으며, 국내 개발된 해충저항성 Bt벼, 비타민 A 강화벼, 레스베라트롤 생합성 GM벼 등에서 보고되고 있으며, 특히 벼는 담수조건에 생육하므로 수서생물인 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 물벼룩 등에 대한 평가가 수행되고 있다(Oh et al., 2012; Moon et al., 2013; Oh et al., 2014b).

가뭄저항성(Agb0103) 벼는 스트레스 유도성 프로모터(*Rab21*)에 의해 발현이 조절되는 고추 유래 *CaMsrB2* 유전자를 일미벼에 도입하여 개발되었으며, 고추 유래 *CaMsrB2* 유전자는 메티오닌 잔기의 산화를 환원상태로 전환하여 식물에서 생물 및 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 갖게 한다. 가뭄저항성(Agb0103)벼의 기능은 건조 등의 환경변화에 따른 산화스트레스 조건에서 엽록체 내에서 메티오닌의 산화를 억제하고 미토콘드리아, 엽록체, 그리고 퍼옥시좀에서 생산되는 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 제거하는 기전을 통해 엽록체의 손상을 방지함으로서 벼의 유묘기와 성숙기에 내한발성 효과를 보였다(Oh et al., 2010; Kim et al., 2014).

본 시험에서는 가뭄저항성(Agb0103)벼에 도입된 *CaMsrB2* 유전자의 검정과 PAT 단백질 발현량을 분석한 후, 모본으로 사용된 일미벼와 함께 가뭄저항성(Agb0103)벼에 대한 환경생물 독성시험을 위해서 환경생물 독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제 2010-29호)에 명시된 환경생태독성시험 생물종인 물벼룩을 대상으로 가뭄저항성(Agb0103)벼에 대한 영향평가를 분석하였으며, GM작물에 대한 생산자와 소비자에게 신뢰성 있는 환경위해성 평가체계 구축하고 국내 개발된 GM벼의 안전성 평가에 대한 기초자료를 제공하기 위하여 본 시험을 수행하였다.

Materials and Methods

물벼룩 급성 독성 평가 시료 제조

가뭄저항성(Agb0103)벼(T7)와 비형질전환 모품종인 일미벼를 경북대학교 LMO 격리 포장(경북 군위군 효령면)과 국립농업과학원 LMO 격리포장(경기도 수원시 권선구)에서 재배하고 줄기와 잎을 출수기에 수확하여 동결 건조를 수행하였다. 동결 건조된 시료를 분쇄기(한일전기, HMF-3100S, Korea)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 600 ㎛의 표준 망체(청계산업, 한국)에 처리하여 선별한 후, 급성독성 평가용 물벼룩의 시험 용액 제조하기 전까지 −20℃에 보관하였다.

Genomic DNA 분리 및 PCR (Polymerase chain reaction) 검정

가뭄저항성(Agb0103)벼와 non-GM벼인 일미벼를 각 1 g씩을 취하고, 막자사발에서 액체질소를 이용하여 분말화하고 분말화된 시료에서 genomic DNA는 DNeasy plant kit (Qiagen, CA, USA)를 사용하여 분리 추출하였다. NanoDrop Spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA)을 이용하여 260/280 nm 측정값이 1.8-2.0 사이인 DNA 시료만을 PCR 분석 실험에 사용하였다. 식물 형질전환된 T-DNA의 유전정보를 기초로 *CaMsrB2, PAT, SPS* 유전자 확인용 특이적 프라이머를 제작하였다(Table 1). PCR (Polymerase chain reaction) 분석 조건으로는 10X PCR buffer 4 ㎕, dNTP (10mM) 1 ㎕, 프라이머 각 20 ㎕, f-Taq DNA polymerase 1 unit (Solgent, Korea), template genomic DNA 200 ng을 추가한 후 최종 반응 부피를 40 ㎕로 하였다. PTC-100 thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 수행하였고, PCR 반응 조건은 1회(95℃, 5분), 35회(95℃, 30초 - 58℃, 30초 - 72℃, 30초), 1회(72℃, 5분)반응을 순차적으로 수행하였다. PCR 결과는 1% 한천겔에 전기영동한 후 UV조사로 확인하였으며, Gel Extraction kit (28704, Qiagen, CA, USA)를 이용하여 정제하고 pGEM T-easy vector (Promega Madison, USA)에 삽입하여 클로닝한 후, 염기 서열 정보를 확인하였다.

Table 1. List of primers used for PCR (polymerase chain reaction) analysis.

Gene	Primer	Primer sequences	Product Size (bp)
CaMsrB2[x]	Forward	5'-CTTGCACACCACAGCAAGAG-3'	361
	Reverse	5'-CTGACTTGTGAACGGAGCCT-3'	
PAT[y]	Forward	5'-GTCGTAGGCGTTGCGTGCCT-3'	250
	Reverse	5'-ATGAGCCCAGAACGACGCCC-3'	
SPS[z]	Forward	5'-AAGTGTTGCATTCCCCAAGC-3'	91
	Reverse	5'-ACATGACTGGTGACAGACCTTCA-3'	

[x]*CaMsrB2*: *Capsicum annuum* L. methionine sulfoxide reductases.
[y]*PAT*: phosphinothricin acetyltransferase.
[z]*SPS*: sucrose-phosphate synthase.

환경 방출 조건에 의한 가뭄저항성(Agb0103)벼의 목적 단백질 함량 분석

경작에 의한 비의도적 환경 방출 조건에 따른 가뭄저항성(Agb0103)벼(T7)의 목적 단백질인 PAT 단백질 함량 변화를 조사하기 위하여 2013년 11월 4일에 수원 LMO 격리포장에 가뭄저항성벼(Agb0103, T7)의 잎과 줄기 등을 10cm 길이로 절단한 후, 100 g씩 그물망(메쉬 규격 1 mm)에 보관하여 토양 매립(표층에서 15 cm 매립), 노지(표층) 노출, 수로 노출(집수정, 침수)의 환경 방출하였다. 다양한 환경 방출된 조건에 따른 방출 기간은 0, 4, 8, 12, 16주의 4주 간격으로 가뭄저항성(Agb0103)벼의 PAT 단백질이 미검출되는 기간까지 분석을 수행하였으며, 가뭄저항성(Agb0103)벼의 PAT 단백질 측정은 ELISA 수행하여 분석하였다.

가뭄저항성벼의 발현 단백질 검정

가뭄저항성(Agb0103)벼에 *CaMsrB2* 유전자와 함께 도입된 Phosphinothricin acetyltransferase (*PAT*) 유전자의 단백질 발현량을 확인하기 위하여 ELISA 검정을 실시하였다. 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼 시료를 각 1 g씩을 취하고, 막자 사발에서 액체질소를 이용하여 분말화하였다. PAT 단백질의 농도를 정량하기 위하여 분말화된 각 시료들을 PBST용액과 함께 균질화하였으며, 저온처리(얼음에서 5분) 및 원심 분리(5,000 g, 5분) 처리하여 상등액을 분리한 후, PAT/bar ELISA kits (EnviroLogix LibertyLink, Portland, USA)를 이용하여 ELISA 실시하였다. 모든 시료들은 상온에서 2시간 반응한 후, 450 nm 파장의 흡광도를 측정하였다(Kim et al., 2010).

물벼룩 급성 독성 평가를 위한 배양 조건

물벼룩(*Daphnia magna*)은 500-1000 Lux 광조건 16시간, 암조건 8시간 조건과 수온 20 ± 2℃의 환경조건에서 사육하였으며, 물벼룩 먹이로는 *Chlorella vulgaris* (ATCC, Manassas, USA)를 1×10^6 cells/mL 농도로 매일 오전에 1회 공급하였다. 물벼룩 배양 용액은 pH 7.6-8.0, 알칼리도는 110-120 mg $CaCO_3$/L, 경도는 160-180 mg $CaCO_3$/L, 용존산소는 3.0 mg/L 이상 유지되도록 하여 사용하기 전 24시간 폭기시켜 이용하였다. 수질의 경도는 한국산업규격 KS I 3206의 Inductively coupled plasma emission spectroscopy에 의해, 알칼리도는 Standard method (22th edition, APHA/AWWA/WEF, USA)의 염산적정법에 의해 측정하였으며, 검사결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

물벼룩 급성 독성 시험의 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼 처리 조건

물벼룩 급성 독성 평가용 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 시료에 대한 유효농도 설정 예비시험결과, 48시간 EC_{50}값이 1,000-10,000 mg/L 범위 내에 있을 것으로 추정되어 625, 1,250, 2,500, 5,000, 및 10,000 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다. 시험용액은 조제된 시료를 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 및 5 g씩 정확히 칭량하여 500 mL의 배양액에 각 반복구당 처리하여 시험용액으로 사용하였으며, 대조구로 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 시료가 무처리된 배양액을 음성대조구로 설정하였다. 시험에는 생후 24시간이내의 어린 물벼룩을 사용하였으며, 시험 개체수는 시험농도당 10마리를 3반복으로 총 각 30마리를 처리하였다. 시험용액은 1800 mL 용량의 원통형유리수조(135mm H. x 130mm φ)에 500 mL를 처리하였으며, 노출환경은 사육조건과 동일한 수온 20 ± 2℃를 유지하였다.

물벼룩 급성 독성 분석을 위한 조사 항목

물벼룩에 대한 급성 독성 여부를 검정하기 위하여 각 처리구에 대하여 24 및 48시간 경과 후 유영저해 개체수, 특이증상 및 일반중독증상 등을 관찰하였다. 유영저해의 판별은 시험 용기 내 용액이 교반되도록 가볍게 흔든 후, 15초 이내에 물벼룩의 일부 기관(후복부, 촉각 등)은 움직이나 유영하지 않는 것을 유영저해로 간주하였다. 시험기간 중 시험용액의 수질 측정은 시료 처리직후와 종료 시의 각 처리구에 대하여 pH와 Dissolved oxygen (DO)를 조사하였으며, 시험 배양액의 수온은 24시간 간격으로 측정하였다. pH, DO와 수온은 Orion 3 star (Thermo Scientific Co., Ltd. USA)를 사용하여 측정하였으며, EC_{50} 산출은 시험물질 처리 후 24시간과 48시간의 유효성분에 대한 반수영향농도(EC_{50}) 및 95% 신뢰한계를 probit분석법(EPA600/4-85/13, 1985)에 의해 산출하였다.

Results and Discussion

가뭄저항성(Agb0103)벼의 분자생물학적 분석

물벼룩 급성 독성 평가 시료인 가뭄저항성(Agb0103)벼의 *CaMsrB2*와 *PAT* 유전자의 삽입 유무 검정을 위하여 PCR 분석용 프라이머를 제작하였다. *CaMsrB2* 유전자는 T-DNA 제작시에 사용된 스트레스 유도성 프로모터(*Rab21*)와 결합된 형태로 검출되도록 프라이머를 제작하였고, 음성 대조군으로 벼 내재유전자 검출 프라이머는 Sucrose-phosphate synthase (*SPS*)유전자의 염기로부터 제작하였다(Table 1). PCR 분석 결과, *CaMsrB2*는 가뭄저항성(Agb0103)벼에서만 361 bp 밴드가 검출되었고, 모품종인 일미벼에서는 검출되지 않았다. *PAT*도 가뭄저항성(Agb0103)벼에서만 250 bp 크기의 밴드가 검출되었고, 일미벼에서는 밴드가 검출되지 않았으며, 벼 내재유전자인 *SPS*에서는 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼 두 품종에서 모두 91 bp 밴드가 검출되었다. 이와 같은 결과는 본 실험의 물벼룩 급성 독성 평가에 이용된 가뭄저항성(Agb0103)벼(T7)에 *CaMsrB2*와 *PAT* 유전자가 도입되었으며, 도입유전자가 안정적으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 1). 수서 환경 생물종인 물벼룩에 미치는 영향을 평가하기 이전에 공시 재료인 가뭄저항성(Agb0103)벼의 PAT 단백질 발현량 검증하고자 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

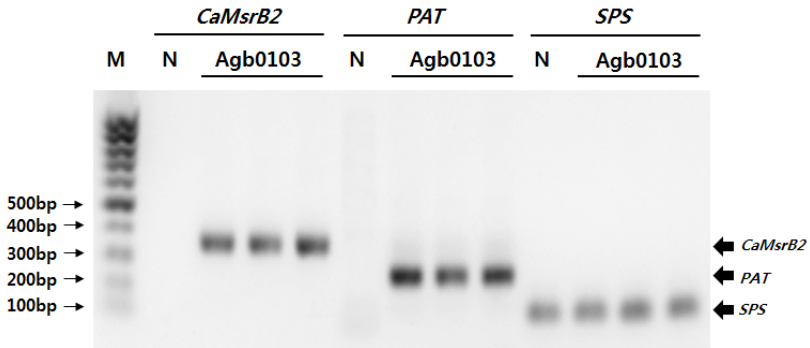

Fig. 1. Confirmation of T-DNA gene presence in drought-tolerant transgenic rice (Agb0103) and non-genetically modified (non-GM) rice. M: 100 bp DNA ladder, N: non-GM rice; Ilmibyeo, GM: Agb0103 rice T7.

법을 이용하여 분석한 결과, 38.18 ± 9.71 ㎍/g 수준의 PAT 단백질이 특이적으로 발현됨을 확인하였다(Table 2). 이는 가뭄저항성(Agb0103)벼에서도 안정적으로 제초제 저항성 PAT 단백질이 발현되며, Oh et al. (2014a)에 의한 병저항성 GM벼와 유사한 PAT 단백질의 발현 수준임을 확인할 수 있었다(Oh et al., 2014a).

Table 2. PAT protein levels (μg/g dry weight) in non-genetically modified rice (Ilmibyeo) and drought-tolerant transgenic rice (Agb0103).

Sample	PAT[x] Concentration (㎍/g Dry weight)
Ilmibyeo	0 (N.D.)
Agb0103	38.18 ± 9.71[y]

[x]PAT: phosphinothricin acetyltransferase.
[y]Values are the average ± SD of triplicate measures.

가뭄저항성(Agb0103)벼의 노출 조건과 시기별 목적 단백질 함량 분석

가뭄저항성(Agb0103)벼의 경작에 의한 비의도적 환경 방출 유형별(토양 매립, 노지, 수로)과 환경 방출 시기별(0, 4, 8, 12, 16주)로 PAT 단백질 함량을 ELISA로 분석한 결과, 환경 방출 유형별에서는 토양 매립 유형에서 0주차의 PAT 발현량이 31.45 ± 1.12 ㎍/g 였으며, 12주차에서 0 ㎍/g으로 분석되었다. 노지 유형에서는 4주차 12.32 ± 0.99 ㎍/g으로 측정되었고, 16주차에서 0 ㎍/g으로 분석되었다. 본 시험에 적용되는 수로 유형에서는 8주차에 0 ㎍/g으로 분석되었다(Table 3). 환경 방출 유형별로 수로, 매립, 노지 순으로 PAT 단백질 함량이 감소되는 것으로 분석되었다. 수환경의 조건이 수중의 미생물에 의한 유기물의 분해와 유수에 의한 물리적인 작용이 다소 증가하여 토양 매립과 노지 유형보다는 PAT 단백질이 급격히 분해되는 것으로 사료된다.

Table 3. PAT protein levels in drought-tolerant transgenic rice (Agb0103) according to environmental release type and exposure times.

Exposure times	PAT Concentration (㎍/g Dry weight)		
	Environmental release type		
	Landfill	Ground	Waterway
0 weeks	31.45 ± 1.12[z]	31.45 ± 1.12	31.45 ± 1.12
4 weeks	6.51 ± 1.05	12.32 ± 0.99	1.56 ± 0.25
8 weeks	0.57 ± 0.27	1.43 ± 0.25	0
12 weeks	0	0.90 ± 0.26	0
16 weeks	0	0	0

[z]Values are the average ± SD of triplicate measures.

물벼룩 급성 독성 시험용수의 수질 측정

본 시험에 사용된 시험용수에 대한 시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 직전과 시험 종료시 수온, pH를 조사하였다. 시험기간 중 시험용수의 수온은 일미벼 처리구에서는 평균 20.9 ± 0.1℃ (20.6-21.1℃)이었고, 가뭄저항성(Agb0103)벼 처리구에서는 평균 20.9 ± 0.1℃ (20.6-21.0℃)로 측정되었다(Table 4). 가뭄저항성(Agb0103)벼 대비 일미벼 처리 농도별 물벼룩의 사육 온도에 대한 t-test 검정결과 0, 625, 1,250, 2,500, 및 5,000 mg/L 처리구의 48시간 후에는 각각 p값이 1, 0.068, 0.19, 0.37, 0.37 이었으며, 모든 처리농도에서 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼 품종간 사육 온도에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$).

Table 4. Changes of water temperature (℃) during cumulative immobility tests of *Daphnia magna* in non-genetically modified rice (Ilmibyeo) and drought-tolerant transgenic rice (Agb0103).

Concentration	Ilmibyeo		Agb0103	
(mg/L)[z]	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr
0	21.2	20.7	21.2	20.7
625	21.4	21.1	21.6	20.8
1,250	21.4	20.8	21.7	21.0
2,500	21.5	21.0	21.7	21.0
5,000	21.5	20.9	21.8	21.0
10,000	21.5	-	21.8	-

[z]Active ingredient: Ilmibyeo; Agb0103 rice T7 100%.

pH는 0시간(시험용수에 시료 현탁시) 처리조건에서 일미벼 처리구는 평균 7.16 ± 0.20 (6.89-7.49), 가뭄저항성(Agb0103)벼 처리구는 평균 7.29 ± 0.16 (7.13-7.60)로 측정되었다. 시험 48시간후에는 일미벼는 평균 6.65 ± 0.39 (6.18-7.14), 가뭄저항성(Agb0103)벼는 평균 6.64 ± 0.18 (6.42-6.87)로 측정되었다. 반면에 음성대조구(0 mg/L)의 0시간 처리에서는 평균 7.88과 48시간후에는 7.74로 측정되었다(Table 5). 예비시험의 측정결과를 바탕으로 물벼룩 영향 평가분석을 위하여 시험용수의 DO는 포화용준산소량의 60% 이하로 내려가는 것을 방지하기 위하여 24시간 간격으로 산소를 30분간 공급하였다.

Table 5. Changes of pH during cumulative immobility tests of *Daphnia magna* in non-genetically modified rice (Ilmibyeo) and drought-tolerant transgenic rice (Agb0103).

Concentration	Ilmibyeo		Agb0103	
(mg/L)[z]	0 hr	48 hr	0 hr	48 hr
0	7.88	7.74	7.88	7.74
625	7.48	7.13	7.59	6.86
1,250	7.28	6.90	7.30	6.74
2,500	7.18	6.39	7.23	6.53
5,000	7.01	6.20	7.21	6.43
10,000	6.90	-	7.14	-

[z]Active ingredient: Ilmibyeo; Agb0103 rice T7 100%.

가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 처리농도에 따른 물벼룩의 유영저해 변화

물벼룩은 유·무기 독성물질에 민감하게 반응하여, 독성 평가를 위해서는 일반적으로 24시간 및 48시간 후의 유영저해 분석 평가가 이용된다. 이에 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 물벼룩 급성독성시험을 48시간 동안 지수식

으로 농도당 노출 물벼룩에 대한 생사수(生死數)를 관찰, 조사하였다. 일미벼 처리구에서 625-10,000 mg/L의 시험농도에서 물벼룩 급성독성시험을 실시한 결과, 24시간 경과시 625 mg/L 처리구에서는 유영저해개체가 없었으나, 1,250, 2,500, 5,000 및 10,000 mg/L 처리구에서 24시간 경과시 각각의 농도에서 10, 30, 53, 및 90%의 유영저해 개체가 관찰되었으며, 48시간 경과시 625 mg/L 처리구에서는 유영저해 개체가 없었으나 1,250, 2,500, 및 5,000 mg/L 처리구에서는 17, 57, 67%의 유영저해 개체가 관찰되었다. 10,000 mg/L 처리구에서는 48시간 후에 모두 100% 유영저해 개체로 관찰되었다. 가뭄저항성(Agb0103)벼 처리구에서 625-10,000 mg/L의 시험농도에서 물벼룩 급성 독성 시험을 실시한 결과, 24시간 경과시 625 mg/L 처리구에서는 유영저해개체가 없었으나, 1,250, 2,500, 5,000 및 10,000 mg/L 처리구에서 각각의 농도에서 3, 23, 67, 90%의 유영저해 개체가 관찰되었으며, 48시간 경과시 625 mg/L 처리구에서는 일미벼와 동일하게 유영저해 개체가 없었으나, 48시간 후에 1,250, 2,500, 및 5,000 mg/L 처리구에서 23, 60, 83%의 유영저해가 관찰되었다. 48시간 경과시에 10,000 mg/L 처리구에서는 모두 100% 유영저해개체가 관찰되었다. 처리 기간 중 음성대조군(0 mg/L)과 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 625 mg/L 처리구에서는 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다. 그러나, 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 625 mg/L 이상의 처리 농도 조건에서 일반중독증상인 수조 상단에서 유영하는 개체가 관찰되었다(Table 6). 각 시험농도에서 GM/non-GM벼 물벼룩의 유영저해 개체수의 t-test 검정결과, 1,250, 2,500, 5,000 및 10,000 mg/L 처리구에서 24시간후에는 각각 p값이 0.11, 0.37, 0.23, 1.00으로 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼간 평균 유영 개체수에는 차이가 없었다. 또한, 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 48시간 처리후의 p값은 1,250, 2,500 및 5,000 mg/L 처리구에서 각각 0.23, 0.64, 0.20이었으며 모든 처리농도에서 GM/non-GM간 평균 유영 개체수에는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$). 따라서 모든 처리구에서 GM/non-GM벼 간에는 유영저해 개체수의 차이는 없는 것으로 분석되었다. 이는 낙동벼가 모품종인 비타민 A강화벼와 병저항성 GM벼의 물벼룩 급성독성에서의 결과와 유사한 경향을 보였다(Oh et al., 2012; Oh et al., 2014a). 또한, 전반적으로 유기물인 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 처리 농도의 증가와 시간이 경과함에 따라 유영저해 개체의 변화가 유사한 경향을 보여, 특별히 가뭄저항성(Agb0103)벼에 의하여 물벼룩의 일반중독에 영향을 미치지 않은 것으로 추정된다.

Table 6. Cumulative immobility of *Daphnia magna* in non-genetically modified rice (Ilmibyeo) and drought-tolerant transgenic rice (Agb0103).

Sample	Concentration (mg/L)[z]	Number of daphnia	Number of immobilized daphnia		immobility (%)	
			24 h	48 h	24 h	48 h
Ilmibyeo	Control	30	0	0	0	0
	625	30	0	0	0	0
	1,250	30	3	5	10	17
	2,500	30	9	17	30	57
	5,000	30	16	20	53	67
	10,000	30	27	30	90	100
Agb0103	Control	30	0	0	0	0
	625	30	0	0	0	0
	1,250	30	1	7	3	23
	2,500	30	7	18	23	60
	5,000	30	20	25	67	83
	10,000	30	27	30	90	100

[z]Active ingredient: Ilmibyeo; Agb0103 rice T7 100%.

가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 급이에 따른 물벼룩의 급성 독성

가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 물벼룩 급성 독성시험을 실시한 결과, 24시간-EC_{50}은 일미벼는 4,023 mg/L, 가뭄저항성(Agb0103)벼는 4,011 mg/L로 가뭄저항성(Agb0103)벼가 측정되었으며, 48시간-EC_{50}은 일미벼는 2,694 mg/L (95% 신뢰한계 : 2,211-3,288 mg/L), 가뭄저항성(Agb0103)벼는 2,243 mg/L (95% 신뢰한계 : 1,858-2,704 mg/L)로 가뭄저항성(Agb0103)벼가 다소 높은 급성독성을 보였으나, 95% 신뢰한계 구간 내의 차이로 유의성은 없는 것으로 나타났다(Table 7). 무영향농도는 GM/non-GM벼 모두 625 mg/L으로 확인되었다. 이는 *CaMsrB2*와 *PAT* 유전자가 도입된 가뭄저항성(Agb0103)벼 및 일미벼에 의한 물벼룩 영향평가 결과, 상대적 동등성을 보였으며, *CaMsrB2*와 *PAT* 유전자의 단백질 노출이 물벼룩에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

국내에서도 국내 개발 GM작물의 실용화와 국외 GM작물 수입량 증가에 따른 수송로 및 경작지 주변의 환경지표생물종 설정과 이에 대한 영향 평가의 필요성이 요구되고 있으며, 국내에서 개발된 GM벼인 병저항성 GM벼와 비타민 A 강화벼에 대한 미꾸리와 잉어의 영향평가 결과, 모품종과 유의함을 확인하였다(Oh et al., 2013; Oh et al., 2014b). 또한, 본 실험과 동일한 실험종인 물벼룩에 대한 해충저항성 Bt벼, 비타민 A 강화벼와 병저항성 GM벼의 영향 평가에서도 본 실험의 결과와 같이 모품종인 낙동벼와 유의적 차이가 없는 것으로 보고되었다. 모품종인 낙동벼에서의 48시간-EC_{50}은 해충저항성 Bt벼 실험시에는 2,889 (95% 신뢰한계: 1,073 - 6,854 mg/L), 비타민 A 강화벼 실험시에는 3,655 mg/L (95% 신뢰한계: 3,156 - 4,232 mg/L), 병저항성 GM벼에서는 3,596 mg/L (95% 신뢰한계: 1,889 - 6,603 mg/L)로 측정되었으며, 또한, 무영향농도는 해충저항성 Bt벼와 병저항성 GM벼에서는 1,000 mg/L, 비타민 A 강화벼에서 1,800 mg/L으로 제시되고 있다(Oh et al., 2011; Oh et al., 2012; Oh et al., 2014a). 이는 Lee et al. (2007)이 물벼룩의 영향평가 실험 시 실험방법, 장소 및 조건의 차이가 있다는 보고와 같이 동일한 모품종임에도 불구하고 시료의 처리조건뿐만 아니라 재배연도와 지역적인 환경요인을 감안하여야 하며, 본 실험에서도 모품종인 일미벼는 기존의 낙동벼와 이를 모품종으로 개발한 GM벼들과 달리 무영향 농도는 625 mg/L로 관측되었으며, 48시간-EC_{50}은 2,694 mg/L (95% 신뢰한계: 2,211-3,288 mg/L)로 측정되었으나, 이는 낙동벼와 일미벼 품종간의 차이로 사료된다(Lee et al., 2007).

국내 개발된 *CaMsrB2*와 *PAT* 유전자가 도입된 가뭄저항성(Agb0103)벼가 수서 농업환경 생물인 물벼룩에 미치는 영향을 분석한 결과, 모품종인 일미벼와 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 따라서, 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼가 농경지 주변의 수로 및 하천 등의 환경에 방출되었을 때 수서생물인 물벼룩에 미치는 생물학적인 영향이 유사하다고 사료된다. 그러나, 가뭄저항성(Agb0103)벼의 비의도적인 환경 방출에 의한 수환경(수로)에서의 PAT 단백질이 미검출되는 시점이 8주(56일)로 분석되어 이 결과를 고려하여 향후, 가뭄저항성(Agb0103)벼를 포함한 GM벼에 대한 환경위해성 평가 요소 중 농업환경 생물종에 대한 급성 독성 평가 시에 GM벼의 장기간 노출에 의한 생물종의 세대별에 따른 유전자 변이 및 생식 독성 분석이 수행되어야 할 것이며, 본 실험의 결과는 이를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

Table 7. REC_{50} (Effective concentration 50) values of *Daphnia magna* after 24 and 48 hours in non-genetically modified rice (Ilmibyeo) and drought-tolerant transgenic rice (Agb0103).

Test item	EC50 (mgmg/L)[y]	
	24 h	48 h
Potassium dichromate (Reference substance)	1.42 (1.15-1.75)[z]	0.96 (0.79-1.16)
Ilmibyeo	4,023 (3,264-5,063)	2,694 (2,211-3,288)
Agb0103	4,011 (3,331-4,874)	2,243 (1,858-2,704)

[y]Active ingredient: Ilmibyeo; Agb0103 rice T7 100%.
[z]95% confidence limits.

Conclusion

본 연구는 내건성 *CaMsrB2* 유전자와 제초제저항성 *PAT* 유전자가 도입된 가뭄저항성(Agb0103)벼에서 도입 유전자의 발현 검증과 수서 환경의 생물종인 물벼룩에 미치는 영향을 분석하기 위해 수행되었다. 가뭄저항성(Agb0103)벼에 도입된 *CaMsrB2* 와 *PAT* 유전자의 PCR 분석 결과, 가뭄저항성(Agb0103)벼에서만 특이적인 밴드가 검출되었으며, PAT 단백질 발현을 ELISA 분석한 결과, 가뭄저항성(Agb0103)벼에서만 발현되었고, 발현량은 38.18 ± 9.71 ㎍/g 수준으로 검출되었으며, 비의도적인 환경 방출 조건인 수로에서 가뭄저항성(Agb0103)벼의 PAT 단백질 함량은 방출 기간이 8주 만에 미검출되었다. 가뭄저항성(Agb0103)벼와 일미벼의 물벼룩에 대한 급성독성시험 결과, 일미벼의 24시간-EC_{50}은 4,023 mg/L (95% 신뢰한계: 3,264-5,063 mg/L), 48시간-EC_{50} 2,694 mg/L (95% 신뢰한계: 2,211- 3,288 mg/L)였고, 가뭄저항성(Agb0103)벼에서는 24시간-EC_{50} 4,011 mg/L (95% 신뢰한계: 3,331-4,874 mg/L), 48시간-EC_{50} 2,243 mg/L (95% 신뢰한계: 1,858-2,704 mg/L)이었다. 또한, 무영향농도는 가뭄저항성(Agb0103)벼과 일미벼에서 동일하게 625 mg/L로 측정되었다. 따라서, 가뭄저항성(Agb0103)벼가 모품종인 일미벼에 비교하여 물벼룩에 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제 번호 PJ01186701)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Ha SH, Liang YS, Jung HR, Ahn MJ, Suh GC, Kweon SJ, Kim DH, Kim YM, Kim JK. 2010. Application of two bicistronic systems involving 2A and IRES sequences to the biosynthesis of carotenoids in rice endosperm. Plant Biotechnology 8:928-938.

James C. 2014. The global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.

Jung S, Lee Y, Yang K, Lee SB, Jang SM, Ha SB, Back K. 2004. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance. Plant Cell Environment 27:1436-1446.

Kim JS, Park HM, Chae SH, Lee TH, Hwang DJ, Oh SD, Song DG, Park JS, Pan CH, Nahm BH, Kim YH, Kim YK. 2014. A pepper Msrb2 gene confers drought tolerance in rice through the protection of chloroplast targeted genes. Plos one 9:e90588.

Kim HJ, Lee SM, Kim JK, Ryu TH, Suh SC, Cho HS. 2010. Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea. Journal of Agriculture & Food Chemistry 58:10906-10910.

Lee CW, Ryu JY, Lim KW. 2007. Acute toxicity test of agricultural chemicals to water fleas. Journal of the Environmental Sciences 16:55-63. [in Korean]

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. Korean Journal International Agriculture 27:69-75. [in Korean]

Li G, Wang Y, Liu B, Zhang G. 2014. Transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) rice is safer to aquatic ecosystems than its non-transgenic counterpart. Plos one. 9:e104270.

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 of Agriculture & Life Science 44:11-16. [in Korean]

Oh SD, Shin HC, Sohn SI, Lee KJ, Kim HJ, Ryu TH, Lee JY, Park BS, Kweon SJ, Suh SC, Park JS. 2011. 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, 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. Korean Journal International Agriculture 24:477-484. [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. Korean Journal of Environmental Agriculture 32:231-239. [in Korean]

Oh SD, Lee KJ, Park SY. Ryu TH, Suh SJ. 2014a. Acute toxicity evaluation to *Daphnia magna* of disease resistant (OsCK1) rice. Korean Journal of Environmental Agriculture 33:121-128. [in Korean]

Oh SD, Sohn SI, Lee KJ, Shin HC, Park JS, Ryu TH. 2014b. Risk assessment and evaluation of carotenoid-biofortified rice: responses of *Misgurnus Anguillicaudatus* and *Cyprinus Carpio* fed on carotenoid-biofortified rice variety. Korean Journal International Agriculture 26:27-34. [in Korean]

Oh SK, Baek KH, Seong ES, Joung YH, Choi GJ, Park JM, Cho HS, Kim EA, Lee S, Choi DI. 2010. *CaMsrB2*, pepper methionine sulfoxide reductase B2, is a novel defense regulator against oxidative stress and pathogen attack. Plant Physiology. 154:245-261.

Shin KS, Lee SM, Lim SH, Woo HJ, Cho HS, Lee KR, Lee MC, Kweon SJ, Suh SC. 2009. Molecular biological characteristics and analysis using the specific markers of leaf folder-resistant GM rice. Plant Biotechnology 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, Arimotoa Y, Uchimiyaa H, Hinata K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Nature Biotechnology 6:1072-1074.

Woo HJ, Shin KS, Lim MH, Lee JH, Qin Y, Park SK. 2015. Comparative nutritional analysis for marker-free transgenic Bt rice and non-transgenic counterparts. Korean Journal of Breeding Science 47:39-44. [in Korean]